

# HEMAGLUTININA DE FOLHAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz): PURIFICAÇÃO PARCIAL E TOXICIDADE<sup>1</sup>

## Hemagglutinin of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz): partial purification and toxicity

Chrystian Araujo Pereira<sup>2</sup>, Angelita Duarte Corrêa<sup>3</sup>, Custódio Donizete dos Santos<sup>3</sup>, Celeste Maria Patto de Abreu<sup>3</sup>, Raimundo Vicente de Sousa<sup>4</sup>, Marcelo Murad Magalhães<sup>5</sup>

### RESUMO

Um dos componentes da multimistura para suplementação alimentar de populações carentes é a farinha de folhas de mandioca (FFM) que possui elevado conteúdo em proteínas, vitaminas e minerais. Todavia, as folhas de mandioca também apresentam substâncias antinutritivas e/ou tóxicas, como cianeto, polifenóis, nitrato, ácido oxálico, hemaglutinina, saponinas e inibidores de tripsina. Objetivou-se neste trabalho extrair as proteínas da FFM, purificando-as em coluna cromatográfica e determinar sua atividade hemaglutinante e toxicidade. Foram testadas várias estratégias de extração e precipitação das proteínas, sendo que o maior teor protéico e atividade hemaglutinante foi obtido na extração com água destilada na proporção 1:20 (p/v) seguida da precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação. As proteínas precipitadas foram purificadas em coluna Q-Sepharose. Das quatro frações obtidas na purificação (I, II, III e IV), a I e a II apresentaram maiores atividades hemaglutinantes. As mesmas frações foram injetadas via intraperitoneal em camundongos com doses de 2µg (fração I), 3µg (fração II), 54µg (fração III) e 52µg (fração IV) para cada animal com 20g de peso médio, não sendo observadas mortes ou quaisquer efeitos adversos após 120h.

**Termos para indexação:** Folha de mandioca, lectina, purificação, toxidez.

### ABSTRACT

One of the components of the multimixture to the feed supplementation of low-income populations is cassava leaf flour (FFM), with high content of proteins, vitamins and minerals. However, cassava leaves also present substance regarded as antinutritive and/or toxic, such as cyanide, polyphenols, nitrate, oxalic acid, hemagglutinin, saponins and trypsin inhibitors. The aim of this work was to extract proteins from FFM, purifying them in chromatographic column and determine their hemagglutinating activity and toxicity. A number of strategies of extraction and precipitation of proteins were tested; the highest protein content and hemagglutinating activity were obtained in the extraction with distilled water at the 1:20 ratio (p/v) followed by the precipitation with ammonium sulfate at 80% of saturation. The precipitated proteins were purified in Q-Sepharose Fast Flow column. Out of the four purification fractions (I, II, III e IV), the I and II activities presented higher specific activity. The same fractions were injected intraperitoneal via in mice of 20g weight with doses of 2µg (fraction I), 3µg (fraction II), 54µg (fraction III) and 52µg (fraction IV). No deaths or any adverse effects was observed after 120h.

**Index terms:** Cassava leaf, lectin, purification, toxicity.

(Recebido em 14 de abril de 2007 e aprovado em 1 de novembro de 2007)

### INTRODUÇÃO

No intuito de reduzir os níveis de desnutrição no país, diversos setores da sociedade, como a Pastoral da Criança, vêm buscando alternativas para a suplementação alimentar de populações carentes como, por exemplo, o uso de uma multimistura que é constituída principalmente de alimentos não-convencionais e/ou subprodutos agroindustriais ricos em diferentes nutrientes. Um dos componentes dessa multimistura é a farinha de folhas de mandioca (FFM) que possui elevado conteúdo em

proteínas (CORRÊA et al., 2004; ORTEGA-FLORES et al., 2003; WOBETO et al., 2006), vitaminas (CORRÊA et al., 2004; WOBETO et al., 2006), e minerais (WOBETO et al., 2006) quando comparados a hortaliças folhosas convencionais. Todavia, elas também apresentam algumas substâncias consideradas antinutritivas e/ou tóxicas, como cianeto, polifenóis, nitrato, ácido oxálico, saponinas, hemaglutinina e inibidores de tripsina (CORRÊA, 2000; MELO et al., 2007; WOBETO et al., 2007). Entre as substâncias presentes nas folhas de mandioca, destaca-se a hemaglutinina, cujos estudos disponíveis até a

<sup>1</sup>Parte da dissertação do primeiro autor.

<sup>2</sup>Doutorando – Departamento de Química/DQI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – capfarma@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Doutores, Professores – Departamento de Química/DQI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – angelita@ufla.br; santoscd@ufla.br; celeste@ufla.br

<sup>4</sup>Doutor, Professor – Departamento de Medicina Veterinária/DMV – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – rvsousa@ufla.br

<sup>5</sup>Doutor – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – mmurad@ufla.br

presente data, referem-se apenas à sua atividade hemaglutinante (MELO et al., 2007; WOBETO et al., 2007).

As hemaglutininas, também denominadas lectinas, são glicoproteínas que têm a propriedade específica de se ligar a certos carboidratos. São conhecidas por sua habilidade em aglutinar células, especialmente células vermelhas sanguíneas chamadas de eritrócitos, provocando o fenômeno da hemaglutinação (REYNOSO-CAMACHO et al., 2003). São proteínas com, no mínimo, um domínio não catalítico que ligam reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). Além da especificidade do sítio de ligação, a maioria das lectinas de legumes apresenta como propriedade físico-química geral a necessidade de um íon metálico como  $Ca^{+2}$  e  $Mn^{+2}$  (ou outro metal de transição) para sua ligação (LIENER, 1980; VANDAMME et al., 1998).

De modo geral, as lectinas acarretam efeitos degenerativos nas membranas celulares, podem inibir a ação de enzimas digestivas (VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004), interferindo na absorção dos nutrientes (SGARBIERI, 1987), causando hiperplasia de intestino delgado (PUSZTAI et al., 1998), depressão do crescimento, redução do peso corporal, diminuição de musculatura esquelética, aumento do catabolismo de lípidos, além de redução significativa dos níveis de insulina sanguínea e pancreática (BARDOCZ et al., 1996), alterações no intestino delgado, baço e timo (REYNOSO-CAMACHO et al., 2003) e até mesmo serem letais (ANTUNES et al., 1995; SANTORO et al., 1997). Por outro lado, os potenciais de aplicações farmacológicas dessas proteínas têm estimulado a contínua investigação, isolamento e caracterização de novas lectinas (RAMOS et al., 1998). Portanto, objetivou-se neste trabalho extrair, purificar e avaliar a toxicidade da hemaglutinina da folha de mandioca.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Colheita, secagem das folhas de mandioca e preparo da farinha de folhas de mandioca

Folhas maduras de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivar Cacao originárias da Fazenda Rio Grande, município de Lavras, MG, foram colhidas aos 12 meses de idade da planta e transportadas para o Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras. As folhas foram lavadas em água corrente e destilada, colocadas em bancada para escorrer e, em seguida, secas em estufa ventilada à temperatura de 30°C a 35°C. Com 24h de secagem, os pecíolos foram retirados e as folhas permaneceram na estufa por mais 24h. Em seguida, foram moídas e a farinha armazenada, em geladeira, em frasco hermeticamente fechado.

### Umidade e proteína

A umidade foi determinada, em triplicatas, nas folhas frescas e na farinha de folhas de mandioca (FFM), segundo a metodologia da AOAC (2000). As proteínas foram dosadas segundo o método de Bradford (1976), usando a albumina sérica bovina como padrão.

### Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi determinada segundo Calderón de la Barca et al. (1985). Os resultados foram expressos em número de unidades hemaglutinantes (UH) que é calculado a partir do inverso do título da maior diluição, na base 2 que ainda apresentou aglutinação visível e, em atividade específica obtida pelo cálculo de UH/mg de proteína (KILPATRICK & YEOMAN, 1978). Por exemplo: considerando uma diluição  $2^4$ , o seu título igual a 1/16, e o volume de amostra utilizado no ensaio de 100µL, define-se que a atividade hemaglutinante é de 16 UH/100 µL

### Extração e precipitação das proteínas

As proteínas da FFM foram extraídas com água destilada na proporção 1:20 (p/v), sob agitação mecânica por 3h à temperatura ambiente. Após, a suspensão foi filtrada em tecido de organza e centrifugada a 15.000 x g, por 15 minutos a 5°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante (extrato bruto) foi utilizado para determinação de proteínas e medida da atividade hemaglutinante.

Ao extrato bruto adicionou-se sulfato de amônio sólido, para precipitar as proteínas, em pequenas quantidades até atingir percentuais de saturação de 25%, 50%, 80% e 90%, subseqüentes (MOREIRA & PERRONE, 1977). Durante a adição do sulfato de amônio o extrato bruto foi mantido em recipiente com gelo, sob agitação magnética (COOPER, 1942). Em seguida, a mistura foi colocada em repouso em geladeira, durante 24h. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 1.800 x g por 20 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi usado para a próxima saturação e o precipitado obtido de cada saturação foi dissolvido em 2mL de solução salina tamponada (NaCl 0,15mol/L pH 7,4 tampão fosfato) e dialisado extensivamente contra água. Os dialisados foram então liofilizados e submetidos à dosagem de proteínas e ao ensaio de atividade hemaglutinante.

### pH na precipitação das proteínas com sulfato de amônio

Extratos brutos após a adição de sulfato de amônio a 80% de saturação, sob agitação magnética tiveram seus pH ajustados para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, com soluções de

HCl e NaOH e uso de um peagâmetro, seguindo os mesmos passos descritos anteriormente para a precipitação das proteínas.

### Purificação parcial das proteínas

A purificação das proteínas liofilizadas foi realizada em coluna cromatográfica de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow (26mm/100mm), utilizando um gradiente de NaCl 0,2mol/L a 1,0mol/L para eluição das proteínas ligadas à matriz.

A coluna foi previamente equilibrada com a solução salina tamponada (NaCl 0,15mol/L pH 7,4 tampão fosfato) antes da aplicação da amostra, até que a leitura em 280 nm permanecesse constante com valores abaixo de 0,02. A seguir, 40mg de liofilizado dissolvidos em 30mL da mesma solução salina tamponada foram aplicados à coluna sob um fluxo constante de 4mL/min com auxílio de uma bomba peristáltica. Após, foram aplicados ininterruptamente, 100mL de água destilada para remoção do material não ligado à coluna e, logo em seguida, soluções de 100mL de NaCl de concentrações crescentes, variando de 0,2mol/L até 1,0mol/L, para estabelecer o gradiente de eluição das proteínas ligadas à matriz. O eluato foi continuamente recolhido em frações de 8mL com o auxílio de coletor de frações e monitorado por espectrofotômetro em 280 nm. As frações correspondentes à faixa dos picos foram dialisadas e liofilizadas para posteriores dosagens de proteínas e ensaios de atividade hemaglutinante.

### Avaliação da toxicidade

Uma avaliação preliminar da toxicidade aguda das lectinas foi determinada pela injeção intraperitoneal em camundongos Balb-C machos, de todas as frações protéicas obtidas durante o procedimento de purificação. Foram utilizados para cada fração grupos de 10

camundongos com peso médio de 20g, perfazendo um total de 40 animais. As doses, em µg/animal, das frações I, II, III e IV foram de 2, 3, 54 e 52, respectivamente.

O parâmetro avaliado foi o número de mortes após os períodos de 24h e 48h. Após esse período, os animais foram observados por mais 72h, a fim de detectar eventuais efeitos adversos da administração das frações.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de umidade em triplicatas, das folhas frescas e da farinha de folhas de mandioca (FFM) foram em g/100g de 67,93 ± 0,06 e 8,31 ± 0,04, respectivamente.

### Extração e precipitação das proteínas

O extrato protéico bruto obtido da FFM foi submetido às precipitações sucessivas com valores de saturação crescentes, a fim de determinar em qual fração precipitada estaria concentrada a maior atividade hemaglutinante. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Observa-se que a fração 50% de saturação apresentou as maiores concentrações de proteína e atividade hemaglutinante. No entanto, as frações 25% e 80% também apresentaram concentrações de proteínas e atividade hemaglutinante significativos, ao passo que na fração 90% a concentração protéica foi muito baixa e a atividade hemaglutinante não foi detectada. Já que as proteínas precipitadas com sulfato de amônio a 25%, 50% e 80% de saturação apresentaram atividade hemaglutinante, escolheu-se a precipitação a 80% por incluir todas as proteínas com atividade hemaglutinante.

O rendimento da precipitação de proteínas a 80% de saturação com sulfato de amônio foi de apenas 17,37% (Tabela 1). Com a finalidade de aumentar esse rendimento, foram também realizadas precipitações das proteínas

Tabela 1 – Proteína e atividade hemaglutinante das frações precipitadas com sulfato de amônio.

Sulfato de amônio (% de saturação)	Proteína <sup>a</sup> (mg)	Atividade hemaglutinante <sup>b</sup> (UH/100µL)
25	0,260	4
50	0,420	16
80	0,270	4
90	0,058	nd <sup>c</sup>

<sup>a</sup> O extrato bruto foi obtido de 5g de farinha de folhas de mandioca apresentando 5,47mg de proteínas.

<sup>b</sup> O valor expressa o inverso do título da maior diluição na base 2 que ainda produziu aglutinação visível em número de unidades hemaglutinantes (UH) em cada 100µL de amostra utilizados no ensaio com sangue humano tipo A Rh +.

<sup>c</sup> Não detectada.

extraídas da FFM com sulfato de amônio a 80% de saturação, com períodos de repouso de 48h e 72h em geladeira e constatou-se que não houve aumento significativo na precipitação dessas proteínas.

#### Influência do pH durante a precipitação das proteínas com sulfato de amônio

Os valores de pH do extrato bruto da FFM antes e após a adição do sulfato de amônio foram iguais a 5,9 e 6,1, respectivamente.

Na Figura 1 estão apresentadas a concentração de proteínas e a atividade hemaglutinante dos extratos brutos precipitados com sulfato de amônio a 80% de saturação, em pH variando de 2 a 10. Observa-se que a maior concentração de proteína foi obtida no pH 8, ao passo que a maior atividade hemaglutinante ocorreu no pH 6. Silva et al. (2001) sugerem que se deve escolher o pH em que for detectada a maior atividade hemaglutinante. Optou-se então, por trabalhar em pH 6, priorizando a maior atividade hemaglutinante. Além disso, o pH 6,0 é praticamente igual ao do extrato bruto, não havendo necessidade de ajuste.

#### Purificação parcial das proteínas

Na Figura 2 é mostrado o perfil de eluição das proteínas liofilizadas em coluna Q-Sepharose, sendo recolhido um total de 100 frações. Observa-se quatro picos A, B, C, D, com absorvâncias máximas em 280nm iguais a

0,267, 0,156, 0,186 e 0,167, respectivamente. O pico A corresponde às frações de 7 a 11, o B de 23 a 27, o C de 37 a 41 e o D de 51 a 55. Verifica-se que todas as quatro frações protéicas foram retiradas da coluna antes que a concentração do gradiente atingisse o valor de 0,7mol/L de NaCl. A partir desse ponto até o fim do gradiente em 1,0mol/L de NaCl, não foi demonstrada a presença de qualquer outro pico.

O pico A correspondente à proteína não ligada à matriz e que foi eluída com água destilada foi denominado fração I. Os picos B, C e D cujas proteínas foram retidas na coluna, e eluídas após aplicação do gradiente de NaCl, foram denominados de frações II, III e IV respectivamente. O perfil de eluição se repetiu a cada corrida cromatográfica realizada.

#### Atividade hemaglutinante e dosagem de proteínas das frações purificadas

Os teores de proteínas e atividade hemaglutinante das frações são apresentados na Tabela 2. Verifica-se que as frações purificadas não apresentaram atividade hemaglutinante detectável. Este resultado poderia ter sido em consequência da falta de algum fator perdido durante a purificação por não se ligar à coluna. Assim, testou-se a atividade hemaglutinante em um extrato bruto fervido (ebulição por 20 minutos) e em um extrato bruto não fervido, e a atividade foi detectada apenas no extrato bruto não fervido. A fervura, portanto, acarretou desnaturação das

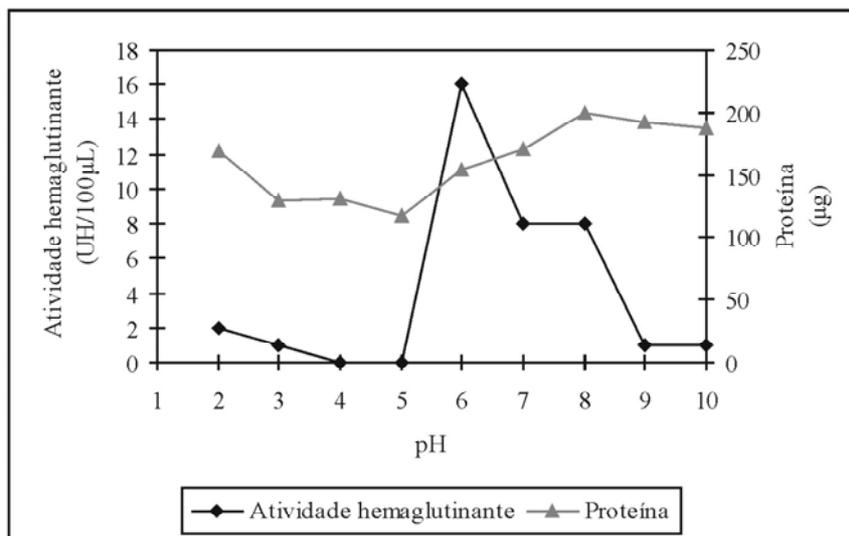


Figura 1 – Proteína e atividade hemaglutinante nos extratos brutos precipitados com sulfato de amônio a 80% de saturação. <sup>a</sup>O valor expressa o inverso do título da maior diluição na base 2 que ainda produziu aglutinação visível em número de unidades hemaglutinantes (UH) em cada 100µL de amostra utilizados no ensaio com sangue humano tipo A Rh +.

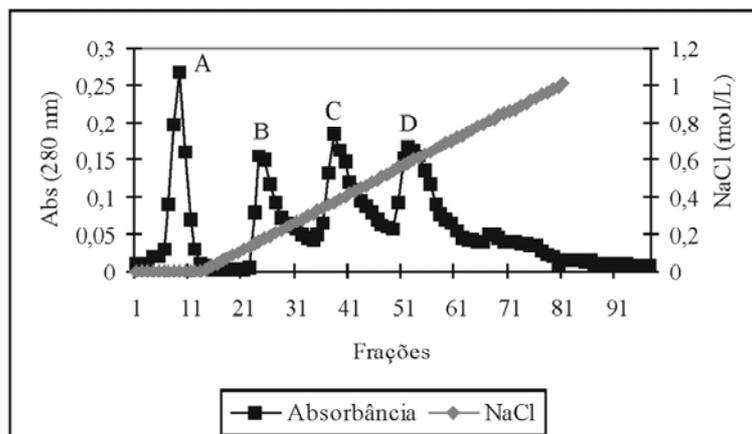


Figura 2 – Perfil de separação das proteínas obtidas do extrato aquoso da farinha de folhas de mandioca. Coluna Q-Sepharose Fast Flow: 26mm x 100mm, volume aproximado de 56mL. Frações de 8mL foram coletadas sob um fluxo constante de 4mL/minuto e lidas em espectrofotômetro em 280 nm. Gradiente de eluição: volumes de 100mL de NaCl 0,2mol/L a 1,0mol/L (500mL).

Tabela 2 – Teores de proteínas e atividade hemaglutinante das frações purificadas.

Fração	Sem adição de extrato bruto fervido		Com adição de extrato bruto fervido	
	Proteínas (µg/100µL) <sup>a</sup>	Atividade hemaglutinante <sup>b</sup> (UH/100µL)	Proteínas (µg/100µL) <sup>d</sup>	Atividade hemaglutinante <sup>c</sup> (UH/100µL)
I	0,10	nd <sup>c</sup>	0,05	AND <sup>f</sup>
II	0,15	nd	0,08	AND
III	1,52	nd	0,76	1
IV	0,76	nd	0,38	1

<sup>a</sup>Teores de proteínas em 100µL das frações utilizadas no ensaio.

<sup>b</sup>O valor expressa o inverso do título da maior diluição na base 2 que ainda produziu aglutinação visível em número de unidades hemaglutinantes (UH) em cada 100µL de amostra utilizados no ensaio com sangue humano tipo A Rh +.

<sup>c</sup>Não detectada.

<sup>d</sup>Teores de proteínas em 100µL da mistura (50µL do extrato bruto fervido + 50µL da fração purificada) utilizada no ensaio.

<sup>e</sup>Maior diluição da mistura (50µL do extrato bruto fervido + 50µL da fração purificada). O valor é expresso como em b.

<sup>f</sup>Atividade detectada apenas na amostra não diluída (AND), correspondente ao primeiro poço da placa de microtitulação, antes de iniciar a diluição com solução salina.

proteínas e, como conseqüência, perda da atividade hemaglutinante. Então, misturou-se o extrato bruto fervido às frações e a atividade hemaglutinante foi detectada, sendo mais elevada nas frações III e IV.

Esses resultados indicam que algum fator necessário à atividade hemaglutinante das frações purificadas foi perdido durante a etapa de purificação. Vários autores relatam que cátions metálicos como Ca<sup>+2</sup> e Mn<sup>+2</sup> são fatores necessários para a atividade hemaglutinante da maioria das lectinas vegetais (LIENER, 1980). Desta forma, os resultados sugerem que os fatores perdidos na purificação podem ser cátions e que as frações

purificadas necessitam desses cátions para apresentar sua atividade hemaglutinante. Ensaio de atividade com adição de Ca<sup>+2</sup> e Mn<sup>+2</sup> às frações purificadas devem ser realizados para avaliar essa hipótese.

#### Recuperação de proteínas e atividade hemaglutinante em vários estágios de purificação.

Na Tabela 3 estão apresentados a atividade específica e teores de proteínas durante os estágios de purificação do extrato aquoso da FFM.

A atividade específica aumentou com a purificação, tendo a fração I (não retida na coluna) a maior atividade

Tabela 3 – Teores de proteínas e atividade específica em vários estágios de purificação das proteínas da farinha de folhas de mandioca.

Amostra	Proteína		Atividade específica (UH <sup>b</sup> /mg proteína)
	Total (µg)	µg/100µL	
Extrato Bruto <sup>a</sup>	87.360,0	8,73	458
Precipitado a 80%	9.600,0	11,83	2.705
Fração I	21,4	0,15	13.334
Fração II	36,6	0,23	8.696
Fração III	641,2	2,29	1.747
Fração IV	526,2	1,14	3.509

<sup>a</sup>Extrato bruto obtido de 50g de farinha de folhas de mandioca.

<sup>b</sup>O valor expressa o inverso do título da maior diluição na base 2 que ainda produziu aglutinação visível em número de unidades hemaglutinantes (UH) em cada 100µL de amostra utilizados no ensaio com sangue humano tipo A Rh +.

(13.334 UH/mg proteína) e, portanto, maior poder hemaglutinante. Entre as frações retidas na coluna (II, III e IV) a II se destacou com uma atividade específica de 8.696 UH/mg proteína.

Wong & Ng (2006) trabalhando com banana *Musa basjoo*, Cavada et al. (1998) com sementes de *Vatairea macrocarpa*, e Zenteno et al. (1988) com cactus *Machaerocereus eruca*, obtiveram frações purificadas com atividade específica em UH/mg de proteína de 5.324, 7.880 e 9.326, respectivamente. Comparando-se com os resultados deste trabalho, verifica-se que a fração II apresenta atividade específica (8.696 UH/mg proteína) intermediária e a fração I, atividade específica (13.334 UH/mg proteína) superior. Como a fração I representa as proteínas não retidas na coluna de troca aniônica, provavelmente, mais uma etapa de purificação usando cromatografia de afinidade poderia complementar os resultados encontrados.

#### Avaliação da toxicidade

A injeção intraperitoneal das frações I, II, III e IV nas doses de 2, 3, 54 e 52µg/20g de peso do animal, respectivamente, não acarretaram nenhuma morte após 24h, 48h e 120h. Também não foi observada qualquer reação adversa ou alteração no comportamento dos animais. Essas doses foram escolhidas em função da quantidade de proteína obtida.

A dose letal (DL<sub>50</sub>) de lectinas vegetais varia bastante. Lectinas isoladas de soja *Glycine max* (VASCONCELOS et al., 1994), de *Abrus pulchellus* (RAMOS et al., 1998) e de feijão *Phaseolus acutifolius* (REYNOSO-CAMACHO et al., 2003) apresentaram DL<sub>50</sub>

iguais a 140, 31 e 22.000 µg/20g de peso do animal, respectivamente.

Não existem informações na literatura sobre a necessidade de metais como Ca<sup>+2</sup> e Mn<sup>+2</sup> para a ocorrência da toxicidade de lectinas, a exemplo do que ocorre com a atividade hemaglutinante. Por isto, novos ensaios com animais, na presença e ausência desses cátions e com doses mais elevadas das frações purificadas, bem como estudos de toxicidade crônica e semi-crônica devem ser realizados, a fim de dar segurança ao uso da FFM como suplemento alimentar.

#### CONCLUSÕES

A saturação com sulfato de amônio escolhida para precipitar as proteínas extraídas das FFM é a de 80%, pH 6,0, na qual a atividade hemaglutinante é maior.

Na purificação das proteínas em coluna Q-Sepharose obtêm-se quatro picos A, B, C e D. Todas as proteínas apresentam atividade hemaglutinante, todavia as dos picos A e B, denominadas frações I (não retida na coluna) e II (retida na coluna) se destacam.

As doses de 2, 3, 54 e 52µg/20g de peso do animal das frações I, II, III e IV, respectivamente, empregadas nos testes de toxicidade, não são letais aos camundongos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, P. L.; BILHALVA, A. B.; ELIAS, M. C.; SOARES, G. J. D. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares rico 23, carioca, piratã-1 e rosinha-G2. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 12-18, jan./abr. 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of the analytical chemists**. 17. ed. Washington, DC, 2000.

BARDOCZ, S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A. The effect of phytohaemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat. **British Journal of Nutrition**, New York, v. 76, n. 4, p. 613-626, Oct. 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

CALDERÓN DE LA BARCA, A. M.; OCHOA, J. L.; VALENCIA, M. E. Effect of the extraction of a hemagglutinin on the nutritive value of *Amaranthus leocarpus* seeds. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1700-1702, Nov./Dec. 1985.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; SOUSA, F. A. M. de; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 675-680, Oct. 1998.

COOPER, T. G. **The tools of biochemistry**. New York: Wiley-Interscience, 1942. 423 p.

CORRÊA, A. D. **Farinha de folhas de mandioca – (Manihot esculenta Crantz cv. Baiana)**: efeito de processamentos sobre alguns nutrientes e antinutrientes. 2000. 108 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CORRÊA, A. D.; SANTOS, S. R. dos; ABREU, C. M. P. de; JOKL, L.; SANTOS, C. D. dos. Remoção de polifenóis da farinha de folhas de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 159-164, abr./jun. 2004.

KILPATRICK, D. C.; YEOMAN, M. M. Purification of the Lectin from *Datura stramonium*. **Biochemical Journal**, London, v. 175, n. 3, p. 1151-1153, 1978.

LIENER, I. E. **Toxic constituents of plant foodstuffs**. 2. ed. New York: Academic, 1980. 502 p.

MELO, D. S. de; CORRÊA, A. D.; MARCOS, F. C. A.; SOUSA, R. V. de; ABREU, C. M. P. de; SANTOS, C. D. dos. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sanguíneo e o peso do fígado de ratos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 420-428, mar./abr. 2007.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 5, p. 783-787, 1977.

ORTEGA-FLORES, C. I.; COSTA, M. L. A. I.; CEREDA, M. P.; PENTEADO, M. V. C. Avaliação da qualidade protéica da folha desidratada de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Nutrire**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 47-59, jun. 2003.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant Lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Hants, v. 15, p. 199-227, 1998.

PUSZTAI, A.; GRANT, G.; GELENCSE, E.; EWEN, S. W. B.; PFÜLLER, U.; EIFLER, R.; BARDOCZ, S. Effects on an orally administered mistletoe (type-2 RIP) lectin on a growth, body composition, small intestinal structure, and insulin levels in young rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 9, n. 1, p. 31-36, Jan. 1998.

RAMOS, M. V.; MOTA, D. M.; TEIXEIRA, C. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. **Toxicon**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 477-484, Mar. 1998.

REYNOSO-CAMACHO, R.; DE-MEJIA, E. G.; LOARCA-PINA, G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 21-27, Jan. 2003.

SANTORO, L. G.; GRANT, G.; PUSZTAI, A. Effects of short-term feeding of rats with a highly purified phaseolin preparation. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 61-70, 1997.

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e nutrição**: fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: Almed, 1987. 387 p.

SILVA, A. L. C. da; HORTA, A. C. G.; MOREIRA, R. de A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) vog. Ex. Steua. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 13, n. 3, p. 251-261, Dec. 2001.

- VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectin: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.
- VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 385-403, Sept. 2004.
- VASCONCELOS, I. M.; TRENTIM, A.; GUIMARÃES, J. A.; CARLINI, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 312, n. 2, p. 357-366, Aug. 1994.
- WOBETO, C.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P. de; SANTOS, C. D. dos; ABREU, J. R. de. Nutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf meal at three ages of the plant. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 865-869, dez. 2006.
- WOBETO, C.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P. de; SANTOS, C. D. dos; PEREIRA, H. V. Antinutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf powder at three ages of the plant. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 108-112, Jan./Mar. 2007.
- WONG, J. H.; NG, T. B. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 234-243, Feb. 2006.
- ZENTENO, E.; DEBRAY, H.; MONTREUIL, J. Purification and partial characterization of two lectins from the cactus *Machaerocereus eruca*. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 95-100, Sept. 1988.