



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO**

MARIA CLERYA ALVINO LEITE

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FOLHAS
ORGÂNICAS DE CENOURA (*Daucus carota* L.)**

**João Pessoa-PB
2010**

MARIA CLERYA ALVINO LEITE

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FOLHAS
ORGÂNICAS DE CENOURA (*Daucus carota* L.)**

Dissertação apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Nutrição do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal da Paraíba,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Nutrição

Orientadoras:

Prof^a. Dra. Tatiane Santi Gadelha

Prof^a. Dra. Maria José de Carvalho Costa

**João Pessoa-PB
2010**

MARIA CLERYA ALVINO LEITE

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FOLHAS
ORGÂNICAS DE CENOURA (*Daucus carota* L.)**

Dissertação apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Nutrição do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal da Paraíba,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Nutrição

APROVADA EM: 15/12/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Tatiane Santi Gadelha - Orientadora titular
UFPB/Departamento de Biologia Molecular/Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição

Prof^ª. Dra. Maria José de Carvalho Costa - Orientadora suplente
UFPB/Departamento de Nutrição/Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição

Prof. Dr. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva - Examinador externo titular
UFCG/Centro de Saúde e Tecnologia Rural/Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Prof^ª. M.Sc. Joana Filomena Magalhães Leite - Examinador externo suplente
UFC/Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/Doutoranda do Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica

Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza - Examinador interno titular
UFPB/Departamento de Biologia Molecular/Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição

Prof^ª. Dra. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves - Examinador interno suplente
UFPB/Departamento de Nutrição/Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição

**João Pessoa-PB
2010**

Dedico a meus pais, Jozefa Vigó Leite
Alvino e Claro Alvino da Silva (*in
memorian*)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus, fonte de todo o saber, pela oportunidade de ter vindo ao mundo e poder conquistar essa vitória tão importante para mim. “Obrigada senhor, por sempre estar do meu lado, me dando força e coragem para nunca desistir dos meus objetivos e hoje tenho certeza de que nada disso seria possível sem a tua misericórdia derramada em minha vida e por muitas vezes ter pensado em desistir pelas dificuldades, cansaço, solidão, ausência das pessoas que amo, mas logo em seguida, pensava na oportunidade que o Senhor estava me dando e a vontade de seguir em frente se sobressaiu em todos os momentos”.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Tatiane Santi Gadelha, minha orientadora, pela confiança, dedicação, pela forma com que me recebeu e me ensinou e por ter acreditado na minha capacidade, permitindo assim a realização desse trabalho.

À Prof.^a Maria José de Carvalho Costa, por sua co-orientação, dedicação, atenção e estímulos constantes na execução deste trabalho.

Ao Prof. Carlos Alberto de Almeida Gadelha pela colaboração e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof.^a Hilzeth Luna de Freire Pessoa, pela grande colaboração no desenvolvimento nas análises de atividade hemolítica e antibacteriana.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Campina Grande, Dr. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva, por autorizar as análises de composição centesimal.

À Alexandre José Moraes dos Santos e Otávio Sá dos Santos do Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, pela enorme contribuição nas análises de composição centesimal.

À Prof^ª Dra. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves, coordenadora do Mestrado em Ciências da Nutrição da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), pelo incentivo e apoio.

Aos secretários do Mestrado em Ciências da Nutrição Seu Carlos e Seu Marcos.

Aos colegas, pesquisadores e companheiros do Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BioGeR) Geórgia Soares, Vanessa Érika, Andrezza, Carolina Leal, Cynthia, Luana Sóstenes, Maria Emília, Henrique, Gregório, Arthur Trindade, pela convivência, companheirismo e cumplicidade do dia-a-dia de um laboratório de pesquisa.

À Joana Filomena Magalhães Leite, pela sua orientação, dedicação e paciência no BioGeR.

À Vinicius de Moraes Gomes, companheiro de laboratório, que me auxiliou no desenvolvimento deste trabalho, pela responsabilidade e compromisso na execução dos experimentos.

À Rodrigo Rodrigues e Lacerda, pela colaboração no teste de atividade antifúngica.

Ao técnico do BioGeR Normando Alexandre da Silva Costa, pela ajuda constante, paciência e auxílio em todos os momentos solicitados.

À Prof.^a Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, Renata Mesquita Marinho, Yasmim Régis Formiga de Sousa e Cybelle do Laboratório de Bromatologia da UFPB.

À Gilvandro do Centro de Tecnologia da UFPB, pela grande contribuição na análise de taninos.

À turma do mestrado de 2009 do Departamento de Nutrição da UFPB, Allana Quintans, Bárbara Melo, Élide Mara, Eliseuda Marinho, Estevam Luiz, Fernanda Patrícia, Laura Camila, Mayara Barbosa, Mussara Monteiro, Noádia Priscila, Quênia Gramile, Rafaella Pordeus, Taiz Siqueira e Talita Maria pela forma carinhosa com que me receberam.

À Edilson Mendes Nunes, pelo exemplo de inteligência, dedicação, paciência, pela amizade, compreensão, incentivo ao início do mestrado e acima de tudo pelo seu amor.

As meninas da Residência Universitária Feminina Elizabeth Teixeira, Anna Karla, Keyla, Merilaine Dayana, Viviane Martins, Dayanne e Maria José Gadelha pela forma como fui recebida e pela convivência diária.

À minha família, de quem sempre recebi todo o carinho e estímulo em todos os momentos da minha vida. As minhas irmãs Clarany, Elba, Cloe, Islanny e aos meus irmãos Alvino e Claro Filho. Um agradecimento especial à minha mãe Jozefa Vigó Leite Alvino, a quem devo tudo o que sou hoje.

A todos os professores do Mestrado Acadêmico de Ciências da Nutrição pelos ensinamentos prestados e contribuição em minha formação científica.

À Coordenação de Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado como apoio financeiro ao desenvolvimento científico.

A todos, que não mencionei, mas que estiveram presentes nesta caminhada, a minha mais sincera gratidão. Obrigada!

“Nem sempre, o que temos nas mãos é o melhor pra nós. O que vemos então é o que Deus preparou. Os planos do Senhor vão além do que podemos ver. Nem sempre, a melhor decisão é seguir em frente. Em momentos talvez se calar por completo, é o melhor para ouvir a Deus. Nossos planos são enganos se não forem projetados por Deus”.

Marcelo Manhães

RESUMO

Os vegetais folhosos não convencionais podem ser utilizados na alimentação humana em quantidades adequadas como fonte alternativa de nutrientes. Entretanto, antes de seu consumo, deve-se levar em conta sua composição nutricional, que depende de sua biodisponibilidade e ausência de citotoxicidade e fatores antinutricionais. Neste estudo, folhas de cenoura foram analisadas para se determinar a composição centesimal, fatores antinutricionais e atividade hemolítica, antibacteriana e antifúngica. A composição centesimal e o teor de fatores antinutricionais (lectinas, taninos e saponinas) foram determinados na folha fresca, branqueada, cozida e liofilizada. Para a extração das proteínas, foram utilizadas seis soluções sob agitação constante durante 3 horas à temperatura de 25°C, obtendo-se o extrato bruto. O ensaio de hemaglutinação foi determinado por meio de diluição duplo-seriada do extrato em tubos de ensaio contendo solução salina e eritrócitos a 3% de sangue humano A, B e O e de coelho. Foi investigada a especificidade da lectina por açúcares utilizando inibição com diversos carboidratos simples. O teor de proteínas solúveis foi realizado pelo método de Bradford. A inativação da lectina foi testada com o extrato bruto com uma variação de pH (2,08 a 13,08) e temperatura (40 a 100°C). O extrato protéico foi precipitado com sulfato de amônio a 80% de saturação, obtendo a fração ativa (0-80). Esta foi submetida à cromatografia de afinidade (estroma-poliacrilamida) e utilizada na verificação da resistência da lectina frente a agentes quelantes, desnaturantes, redutores, oxidantes e enzimas proteolíticas (tripsina, papaína e bromelaína). Após tratamento da lectina com estes agentes, realizou-se teste de atividade hemaglutinante (AH). Os taninos totais foram determinados usando o ácido tânico como padrão e a atividade hemolítica para a procura de saponina. Realizaram-se testes de atividade antibacteriana, antifúngica e hemolítica com a fração protéica. A AH foi melhor verificada quando se utilizou NaCl 0,15 M. Dentre os eritrócitos testados a lectina aglutinou preferencialmente os de coelho tratado e não tratado com enzimas proteolíticas (154,26 UH/mgP), apresentando especificidade pelos carboidratos lactose, galactose e arabinose. Verificou-se que a lectina é inativada em temperaturas, a partir de 100°C e em pH ácido 2,08. A amostra lectínica se mostrou resistente a ação de enzimas proteolíticas, agente redutor, oxidante e desnaturante por 30 minutos. Porém, a perda total da AH ocorreu com a administração do quelante no dia e do agente desnaturante após overnight. Na presença de íons isolados a AH foi mantida. A cromatografia mostrou um pico que apresentou AH e o perfil protéico das frações e dos picos ativos e não ativos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) indicando uma purificação parcial. Os teores de taninos totais variaram de 0,16% para folha cozida a 0,60% para a folha fresca. A pesquisa de saponina foi negativa na amostra analisada. A fração protéica não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de fungos dermatófitos, todavia, apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* com uma concentração inibitória mínima de 1,9 µg/mL de proteína. As amostras testadas não causaram efeito hemolítico frente a eritrócitos humanos A e B. Conclui-se a partir do presente estudo, que as folhas de cenoura possuem propriedades nutricionais que a habilitam para consumo. Possui ainda fatores antinutricionais que são inativados pelo calor.

Palavras-chave: Folhas de cenoura. Composição nutricional. Vegetais folhosos. Fatores antinutricionais. Lectinas.

ABSTRACT

Non-conventional leafy vegetables can be used as food in adequate quantities as an alternative source of nutrients. However, before its consumption, should take into account their nutritional composition, which depends on its bioavailability and the absence of cytotoxicity and anti-nutritional factors. In this study, leaves of carrot were analyzed to determine the proximate composition, antinutritional factors and haemolytic activity, antibacterial and antifungal. Chemical composition and content of antinutritional factors (lectins, tannins and saponins) were determined in fresh leaves, bleached, boiled and lyophilized. For extraction of proteins, we used six solutions under stirring for 3 hours at 25°C, and the crude extract. Hemagglutination assay was determined by double serial dilution of the extract in test tubes containing saline and erythrocytes at 3% of human blood A and B, and rabbit. We investigated the specificity of the lectin by sugars using inhibition with many simple carbohydrates. Soluble proteins was performed by Bradford method. The inactivation of the lectin was tested with the crude extract with a pH variation (2.08 to 13.08) and temperature (40 to 100° C). Protein extract was precipitated with ammonium sulfate at 80% saturation, obtaining the active fraction (0-80). This was subjected to affinity chromatography (stroma-polyacrylamide) and used to check the resistance of the lectin against chelating agents, denaturants, reducing agents, oxidants and proteolytic enzymes (trypsin, papain and bromelain). After treatment of the lectin with these agents, there was testing hemagglutination activity (HA). Tannins were determined using tannic acid as standard and the hemolytic activity of saponin for the search. Tests were carried out for antibacterial, antifungal and haemolytic with the protein fraction. The HA was best seen when using 0.15 M NaCl. Among the erythrocytes tested lectin preferentially agglutinated rabbit treated and not treated with proteolytic enzymes (154.26 HU/mgP), with specificity for the carbohydrate lactose, galactose and arabinose. It was found that the lectin is inactivated at temperatures from 100°C and at acid pH 2.08. Lectin sample was resistant to proteolytic enzymes, reducing agent, oxidizing and denaturing for 30 minutes. However, the total loss of HA occurred with the administration of chelating agent on the day and overnight after denaturing. Ions in the presence of isolated HA was maintained. Chromatography showed a peak that had HA and protein profile of fractions and the active peaks and no assets were subjected to electrophoresis on polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS), indicating a partial purification. Total tannin contents ranged from 0,16% to 0,60% cooked leaf to fresh leaf. Research saponin was negative in the sample. The protein fraction showed no inhibitory effect on the growth of dermatophyte fungi, however, showed activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with a minimum inhibitory concentration of 1,9 µg/mL of protein. Samples tested did not cause hemolytic effect against human erythrocytes A and B. We conclude from this study that the carrot leaves have nutritional properties that enable it to use. It also has anti-nutritional factors that are inactivated by heat.

Key-words: Carrot leaves. Nutritional composition. Leafy vegetables. Antinutritional factors. Lectins.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Representação hipotética do sítio específico de reconhecimento a carboidratos de uma lectina e seus açúcares ligantes	27
Figura 2 - Representação esquemática da aglutinação por lectinas	28
Figura 3 - Representação esquemática das lectinas de plantas conforme característica estrutural	31
Figura 4 - Esquema estrutural da parede celular de fungos. Glicofosfatidilinositol (GPI)	43
Figura 5 - Curva padrão da solução de glicose: concentração de glicose em µg/mL versus absorvância (490 nm)	48
Figura 6 - Curva de calibração de Bradford: concentração de albumina sérica bovina em µg/mL versus absorvância (595 nm)	53
Figura 7 - Curva de calibração de taninos totais: concentração de ácido tânico em mg/mL versus absorvância (760 nm)	56
Figura 8 - Cromatografia de afinidade	58

FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1 - Efeito da variação de temperatura na atividade hemaglutinante da lectina de <i>Daucus carota</i> . Atividade hemaglutinante determinada a cada aumento da temperatura em 10°C após 30 minutos de incubação nas referidas temperaturas	96
Figura 2 - Efeito da variação de pH na atividade hemaglutinante da lectina de <i>Daucus carota</i> . Atividade hemaglutinante da lectina verificada após 30 minutos de incubação com pH variando de 2,08 a 13,08	97

FIGURAS DE OUTROS RESULTADOS

- Figura 1** - Cromatografia de afinidade em coluna de estroma-poliacrilamida (8,6 mL) da fração 0-80 de folhas de *Daucus carota* **108**
- Figura 2** - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em presença de SDS e β -Mercaptoetanol **109**

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1 - Reagentes para a confecção do gel de concentração e de separação da eletroforese	60
Tabela 2 - Bactérias utilizadas para o teste de atividade antibacteriana da fração protéica e seus respectivos números de registros	62
Tabela 3 - Fungos utilizados para o teste de atividade antifúngica e seus respectivos números de registros na Micoteca	64

TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da composição centesimal (%) e valor calórico das folhas de <i>Daucus carota</i> expressos em base seca	91
Tabela 2 - Médias referentes a alguns fatores antinutricionais das folhas de cenoura submetidas a quatro tratamentos	95

TABELAS DE OUTROS RESULTADOS

Tabela 1 - Teor de proteínas solúveis e atividade hemaglutinante com a farinha delipidada de folhas de <i>Daucus carota</i> contra eritrócitos de coelho a 3%	104
Tabela 2 - Teor de proteínas solúveis e atividade hemaglutinante das folhas de <i>Daucus carota</i> fresca, branqueada, cozida, liofilizada e a fração protéica 0-80 obtidas da solução de NaCl 0,15M, utilizando eritrócitos de coelho a 3%	105
Tabela 3 - Efeito de carboidratos simples sobre a atividade hemaglutinante da lectina de <i>Daucus carota</i> frente a eritrócitos nativos de coelho a 3%	106

TABELAS DE OUTROS RESULTADOS

Tabela 4 - Efeito de diferentes agentes desnaturante, redutor e oxidante na atividade lectínica de <i>Daucus carota</i>	107
Tabela 5 - Efeito de enzimas proteolíticas (500µg/mL) sobre a atividade lectínica de <i>Daucus carota</i>	107
Tabela 6 - Efeito do agente quelante e cátions divalentes na atividade lectínica de <i>Daucus carota</i>	108
Tabela 7 - Atividade antibacteriana da fração protéica 0-80 das folhas de <i>Daucus carota</i> frente às bactérias	110
Tabela 8 - Resultados do teste de microdiluição (4 mg/mL) da fração protéica 0-80 das folhas de <i>Daucus carota</i> frente aos dermatófitos	110
Tabela 9 - Resultados do teste de difusão em disco da fração protéica 0-80 (4mg/mL) frente aos dermatófitos	111
Tabela 10 - Atividade hemolítica da fração protéica e das folhas de <i>Daucus carota</i> fresca, branqueada e cozida (%)	112

LISTA DE SIGLAS

AH	Atividade hemaglutinante
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APS	Ammonium Persulfate
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine Serum Albumin
CAPES	Coordenação de Apoio ao Pessoal de Nível Superior
CCT	Coleção de Cultura Tropical
CHT	Carboidratos Totais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DRC	Domínio Reconhecedor de Carboidratos
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
GPI	Glicofosfatidilinositol
IC	Inhibitory Concentration
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LM	Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba
MLL	Mulberry Leaf Lectin
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCR	Proteína C Reativa
PRP	Proline-rich Protein
RIP	Ribosome-Inactivating Protein
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TCA	Trichloroacetic Acid
TEMED	N, N, N, N-tetra-methyl-ethylenediamine

TRIS	Hidroximetil aminometano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UH	Unidades Hemaglutinantes

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BioGeR	Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. mkhuzense</i>	<i>Combretum mkhuzense</i>
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformes</i> ou Concanavalina A
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
Cramoll	Lectina de sementes de <i>Cratylia mollis</i>
CrpL	Lectina isolada de semente de <i>Crotalaria paulina</i>
cv.	Cultivar
<i>D. carota</i>	<i>Daucus carota</i>
<i>E. hirta</i>	<i>Euphorbia hirta</i>
<i>F. moniliforme</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>H. brasiliensis</i>	<i>Heves brasiliensis</i>
Immunod	Imunodeprimido
<i>L. alba</i>	<i>Lippia alba</i>
pH	Logarítmo negativo da concentração de íons hidrogênio [H ⁺]
<i>P. syringae pv mori</i>	<i>Pseudomonas syringae pv mori</i>
PtLec	Lectina de <i>Pouteria torta</i>
<i>R. communis</i>	<i>Ricinus communis</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Var.	Variedade cultivada
<i>X. mafaffa</i>	<i>Xanthosomas mafaffa</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 <i>Daucus carota</i> L.	22
2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA DIETA	23
2.3 FATORES ANTINUTRICIONAIS	25
2.3.1 Lectinas	26
2.3.2 Taninos	36
2.3.3 Saponinas	38
2.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	39
2.4.1 Infecções causadas por fungos	39
2.4.2 Dermatofitoses	41
2.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	46
3.1.1 Folhas de cenoura	46
3.1.2 Células sanguíneas	46
3.2 MÉTODOS	46
3.2.1 Análise da composição centesimal	46
3.2.2 Preparo do sangue	49
3.2.3 Preparação da farinha de folhas de cenoura	49
3.2.4 Extração de proteínas solúveis das amostras	50
3.2.5 Determinação da atividade hemaglutinante	50
3.2.6 Especificidade por açúcares	51
3.2.7 Fracionamento salino por sulfato de amônio	52
3.2.8 Determinação do teor de proteínas solúveis	52
3.2.9 Caracterização físico-química	53
3.2.10 Determinação do teor de taninos totais	56
3.2.11 Detecção de saponinas por hemólise	57
3.2.12 Purificação parcial de proteínas	57
3.2.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol	59

3.2.14 Detecção da proteína por nitrato de prata	61
3.2.15 Ensaio da atividade antibacteriana da fração protéica	62
3.2.16 Ensaio da atividade antifúngica da fração protéica	63
3.2.17 Avaliação da atividade hemolítica	65
3.2.18 Análise estatística	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICES	81
ARTIGO	82
OUTROS RESULTADOS	104

1 INTRODUÇÃO

A busca pela maximização da produção de gêneros alimentícios tem levado a um uso cada vez maior e mais disseminado de agrotóxicos. A utilização destes produtos em tubérculos inviabiliza o aproveitamento total das partes da planta, em virtude do acúmulo tóxico em áreas mais expostas como folhas, pecíolos e caule. Uma alternativa a esta situação é a produção orgânica destes vegetais tão presentes e necessários à alimentação humana. Neste tipo de produção além de se obter um tubérculo e folhas isentas de substâncias prejudiciais à saúde, promove uma melhor qualidade de vida da população com acesso a uma alimentação com adequado valor nutritivo e a sustentabilidade do ambiente. Além disso, cria-se a possibilidade de aproveitamento de partes da planta não consumidas e, portanto, descartadas.

Dentre esses subprodutos estão incluídas as folhas de cenoura (*Daucus carota* L.), as quais possuem, principalmente, teores significativos de vitamina C total e β -caroteno, sendo este último, maior que o teor encontrado na porção comestível convencional, a raiz, podendo assim, ser considerada como fonte de fibras dietéticas e minerais, destacando-se o cálcio e o ferro (PEREIRA et al., 2003).

D. carota, é uma espécie da família Apiaceae, composta por plantas normalmente aromáticas e de caule oco, incluindo espécies como a salsa, o aipo, o coentro e outras espécies do mesmo gênero. Em virtude da importância nutricional atribuída à família Apiaceae, e do desperdício das folhas de cenoura, que geralmente não são consumidas na dieta habitual, o consumo dessas folhas poderia estar sendo utilizado de forma integral por grupos populacionais, podendo contribuir para aumentar a disponibilidade dos nutrientes da dieta. Entretanto, apenas as raízes da cenoura são aproveitadas, correspondendo a parte que é comestível e industrializada. A parte folhosa da planta considerada resíduo agrícola, é subutilizada e poderia ser consumida como fonte alternativa de nutrientes com um papel importante no balanço dietético.

No entanto, há a necessidade de investigar a presença de fatores antinutricionais e/ou tóxicos que possam afetar o valor nutricional dos alimentos, antes da recomendação de folhas vegetais como fonte alternativa de nutrientes (SANTOS, 2006), já que, a maioria das substâncias que compõem os alimentos consumidos pelo homem, com exceção dos nutrientes, ainda não está quimicamente caracterizada. Como consequência, seus eventuais efeitos nocivos são ainda desconhecidos, seja de forma isolada ou resultante de interações (SILVA, 2008).

O termo fator antinutricional tem sido usado para descrever compostos químicos que podem provocar efeitos fisiológicos adversos e interferir na biodisponibilidade, digestibilidade e absorção de nutrientes ou serem tóxicos, dependendo da quantidade em que são consumidos (NAVES et al., 2010). Alguns fatores antinutricionais são inativados ou inibidos pelo calor, em maior ou menor extensão, em função da intensidade e duração do tratamento térmico (OETTERER; D'ARCE; SPOTO, 2006).

Vários tipos de fatores antinutricionais têm sido identificados nas folhas de vegetais, tais como lectinas, taninos e saponinas. Por outro lado, e não menos importante é a verificação de algumas atividades benéficas à saúde que causam as proteínas denominadas lectinas.

Lectinas são proteínas de origem não imune com a capacidade de aglutinar células, principalmente eritrócitos, contendo pelo menos um domínio não catalítico de ligação específica e reversível a mono e oligossacarídeos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza sendo encontradas em animais e plantas. Nas plantas, as lectinas podem ser detectadas em tecidos tais como folhas (PEREIRA et al., 2008; SALAZAR et al., 2006), sementes (COELHO, 2006; SANTI-GADELHA et al., 2008), cascas (WITITSUWANNAKUL; WITTSUWANNKU; SAKULBORIRUG, 1998) raízes (YAN et al., 2010) e caules (ZANETTI, 2007).

A purificação e a caracterização das lectinas são de extrema importância, não só em relação à sua atividade antinutricional, como também devido ao seu uso potencial em pesquisas nas áreas biológicas e médicas (SILVA, 2008), apresentando atividade cicatrizante (SILVA et al., 2009), coagulante (SANTOS, 2007), analgésica (BITENCOURT et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009), antibacteriana (GAIDAMASHVILI; VAN STADEN, 2002), antifúngica (NGAI; NG, 2007; VAZ et al., 2010), inseticida (BOLETI, 2003), nematocida (ZANETTI, 2007), antiinflamatória (BITENCOURT et al., 2008; SANTI-GADELHA, 2006), antitumoral (YAN et al., 2010), mitogênica (MACIEL, 2002), antioxidante (SANTOS, 2007), dentre outras atividades.

Taninos são polifenóis hidrossolúveis, exceto taninos condensados de grande dimensão, que estão presentes em muitos alimentos de origem vegetal. Eles têm sido relatados por serem responsáveis pela diminuição de crescimento, eficiência alimentar, energia metabolizável e digestibilidade protéica em animais experimentais (CHUNG et al., 1998) por se ligarem a proteínas formando complexos que, por sua vez, diminui a solubilidade de proteínas, sendo resistentes a enzimas proteolíticas. Além disso, os taninos podem se ligar a alguns minerais essenciais da dieta, tornando-os indisponíveis ou parcialmente disponíveis

para absorção (GUZMÁN-MALDONADO, ACOSTA-GALLEGOS, PAREDES-LÓPEZ, 2000; WHO, 1998). Santos (2006) atribui aos taninos outros efeitos prejudiciais à dieta, como cor indesejável aos alimentos, devido as reações de escurecimento enzimático, e diminuição da sua palatabilidade, devido à adstringência.

As saponinas são glicosídeos comuns em plantas superiores, e apresentam diversas ações biológicas nos animais. Dentre os efeitos indesejáveis que podem causar, destacam-se as alterações que afetam significativamente o crescimento e a reprodução em animais, prejudicam a digestão de proteínas e reduzem na absorção de vitaminas e minerais, em função de modificações na permeabilidade de membranas celulares (FRANCIS et al., 2002). Vários efeitos biológicos foram atribuídos as saponinas como, atividade hemolítica (SUN, 2006), atividade antibacteriana (HASSAN et al., 2010) e propriedade de adjuvante imunológico (SUN, 2006; SUN; XIE; YE, 2009).

Considerando a importância de se encontrar fontes alternativas de alimentos e de outros nutrientes que são subutilizados pela população, bem como as várias aplicações biológicas das lectinas vegetais, o objetivo deste trabalho foi investigar o conteúdo nutricional, teor de fatores antinutricionais das folhas, atividade hemolítica, antibacteriana e antifúngica da lectina de folhas de cenoura (*D. carota* L.).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Daucus carota* L.

O número crescente de doenças crônicas e os custos crescentes dos cuidados à saúde levaram os pesquisadores a rever as atuais orientações relativas à alimentação. Atualmente, a nutrição como ciência precisa expandir para além das suas funções básicas, como a prevenção da deficiência alimentar e criação de normas e orientações dietéticas, deve-se focar no apoio ao estado de bem-estar e saúde, minimizando o risco de doenças relacionadas à dieta associada a excesso ou deficiência de alguns nutrientes (KRUPA, 2008).

A busca de ingredientes de alimentos alternativos, principalmente para países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, é de extrema importância, especialmente por causa do alto custo das fontes de proteína animal (OLIVEIRA et al., 2000).

A cenoura é uma hortaliça da família Apiácea, uma das principais cultivadas no Brasil, sendo do grupo das raízes tuberosas, produzida em larga escala nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. Os maiores produtores são os municípios de Cirandai, Maria da Fé, São Gotardo e Rio Paranaíba-MG, Piedade, Ibiúna e Mogi das Cruzes-SP, Ponta Grossa-PR, e Irecê-BA (OLIVEIRA et al., 2003). A cenoura é a quinta olerícola cultivada no Brasil em ordem de importância econômica. A área média anual colhida é de 27 mil hectares e a produção de 760 mil toneladas, correspondendo a um valor bruto no atacado de 690 milhões de reais. Seu cultivo é de alta relevância socioeconômica, principalmente nas Regiões do Alto Paranaíba e Irecê, localizadas respectivamente nos Estados de Minas Gerais e Bahia. Outras unidades da Federação com produção significativa são: São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Distrito Federal (MAROUELLI; OLIVEIRA; SILVA, 2007).

A cenoura destaca-se das outras hortaliças pela grande quantidade de vitamina A que possui, nutriente de extrema importância para a visão, na prevenção da cegueira noturna, xerofthalmia e no crescimento e desenvolvimento saudável das crianças. Ela é muito rica em outras vitaminas como B1 e B2 e em sais minerais (GALLAGHER, 2005). A cenoura destinada ao consumo “*in natura*” deve apresentar as características do cultivar bem definidas, estar desenvolvida na sua fisiologia, não lenhosa, bem formada, limpa, com coloração uniforme, livre de danos mecânicos, fisiológicos, pragas, doenças e isenta de qualquer substância nociva à saúde humana (LUENGO et al., 1999).

Em pesquisa realizada na cidade de Viçosa (MG), Campos et al. (2006) analisaram o conteúdo de α e β -caroteno e o teor de vitamina A de sete hortaliças (batata-doce, cenoura, moranga, pimentão, quiabo, tomate e vagem), tendo a cenoura apresentado os teores mais elevados de α e β -caroteno.

Pereira et al. (2003) analisaram a folha de cenoura visando seu aproveitamento na alimentação humana. Os resultados demonstraram que a folha de cenoura destaca-se como importante fonte de vitamina C, β -caroteno e minerais, sobressaindo-se o cálcio e o ferro. A folha de cenoura pode ser indicada como boa fonte de fibras, as quais são recomendadas na prevenção de doenças gastrointestinais, regularização da glicemia e aumento da saciedade; o nitrato presente está dentro do aceitável pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e, assim, as folhas de cenoura podem ser aproveitadas na alimentação humana, sem riscos à saúde. Portanto, para que ela seja indicada como fonte alimentar, principalmente protéica e/ou fonte potencial de compostos bioativos para humanos, deve ser determinada a composição química da proteína, sua qualidade nutricional, presença de fatores antinutricionais ou tóxicos bem como atividade biológica contra microrganismos patogênicos.

2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA DIETA

Dados sobre a composição de alimentos são importantes na realização de balanços para avaliar o suprimento e o consumo alimentar de uma população. Assim, estudos que caracterizem nutrientes essenciais tornam-se necessários na área de Nutrição e Saúde Pública para medir o estado nutricional ou nível de risco, desenvolver pesquisas sobre as relações entre dieta e doença e avaliar a qualidade de matérias-primas disponíveis para aproveitamento e/ou processamento (HIANE, 2006).

Para que uma alimentação seja de boa qualidade deve ser constituída de macroelementos como proteínas, lipídeos e carboidratos, bem como de vitaminas, minerais e fibras em quantidades adequadas para suprir a necessidade requerida pelos seres humanos. No entanto, para que um produto possa ser utilizado como alimento, é necessário que, além de se determinar o teor destes nutrientes, seja determinada a composição de ácidos graxos dos lipídeos, principalmente os ácidos graxos essenciais, o teor de proteínas e sua composição em aminoácidos, bem como a qualidade protéica (DENADAI, 2006). Além destes, os produtos

que são provenientes de vegetais é importante a verificação de fatores antinutricionais e/ou tóxicos.

As proteínas foram os primeiros nutrientes a serem considerados essenciais para o organismo. O termo vem do grego e significa *de primeira importância* (BORSOI, 2001). As proteínas são indispensáveis na dieta, pois são necessárias para o crescimento e manutenção da vida. Exercem funções biocatalisadoras, hormonais, estruturais de regulação gênica, de defesa e transporte nos fluidos biológicos (MURRAY et al., 2002). Sendo um nutriente essencial aos seres humanos e animais, as proteínas devem estar presentes na dieta em quantidades adequadas (DENADAI, 2006). Os aminoácidos constituintes de proteínas também são utilizados como precursores de substâncias biologicamente ativas e importantes como hormônios, porfirinas, pigmentos entre outros (SGARBIERI, 1996).

Além do aspecto quantitativo das proteínas, deve-se levar em conta também o aspecto qualitativo, ou seja, seu valor nutricional (DENADAI, 2006) que dependerá de sua composição, digestibilidade, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais e principalmente ausência de fatores citotóxicos e/ou antinutricionais (FAO/WHO, 1991).

Os parâmetros conhecidos para investigar a qualidade de proteína são a relação de eficiência protéica, digestibilidade, valor biológico, utilização protéica líquida, escore químico de aminoácidos e escore químico corrigido pela digestibilidade protéica, sendo este, determinado em parte, quimicamente analisando a composição de aminoácidos e em parte por meio de ensaio biológico utilizando a digestibilidade verdadeira (FAO/WHO, 1991).

Algumas frações protéicas como as globulinas são relatadas por Araújo et al. (2002) como isentas de fatores antinutricionais como lectinas e inibidores de proteinases. Entretanto, Osborn et al. (1984) detectaram a presença de lectina na fração globulina em diferentes cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. A fração das albuminas foi relatada como contendo lectinas que apresentam atividades biológicas como antiinflamatória e contra microrganismos fitopatogênicos (SANTI-GADELHA, 2005).

Para determinar a qualidade nutricional das proteínas são utilizados métodos químicos e biológicos. Quimicamente podemos avaliar a qualidade nutricional das proteínas baseando-se nos índices de digestibilidade *in vitro*, perfil de aminoácidos e na determinação de fatores antinutricionais e/ou tóxicos. Digestibilidade de proteínas significa a porção da proteína capaz de ser hidrolisada pelas enzimas digestivas até aminoácidos e ser absorvida pelo organismo, portanto, disponível biologicamente.

A digestibilidade protéica é o principal índice de qualidade protéica, visto que um determinado aminoácido pode estar presente na proteína, mas não estar necessariamente

disponível para o organismo. Dessa forma, proteínas não podem ser utilizadas pelo organismo se não forem digeridas. A digestibilidade é estimada usando enzimas proteolíticas que agem na digestão (PIRES, 2005).

A verificação e a distinção entre fatores antinutricionais e tóxicos é que os fatores tóxicos agem de forma aguda produzindo lesões nos órgãos e tecidos, produzem alterações fisiológicas que resultam em enfermidades que podem levar a óbito as pessoas que os ingerem. Os fatores antinutricionais embora causem algumas alterações teciduais e fisiológicas, atuam diminuindo a eficiência do metabolismo interferindo muitas vezes na eficiência de utilização, perda de nutrientes e função metabólica (CRUZ et al., 2004). Estes podem ocorrer de forma natural ou ainda ser formados durante o processo térmico/alcalino, o que pode reduzir o valor nutricional dos alimentos (GILANI; COCKLER; SEPEHR, 2005).

2.3 FATORES ANTINUTRICIONAIS

Os vegetais geralmente fornecem nutrientes essenciais para o corpo e podem ser uma fonte de nutrientes para as pessoas de todas as classes sociais, devido o seu custo razoável e acessibilidade, que pode ser cultivada sem a necessidade de grandes investimentos financeiros. No entanto, a biodisponibilidade de seus nutrientes pode ser comprometida pela presença de fatores antinutricionais, tais como lectinas, taninos (LEITE et al., 2009) e saponinas.

Fatores antinutricionais são compostos químicos que podem provocar efeitos fisiológicos adversos e interferir na biodisponibilidade, digestibilidade e absorção de nutrientes ou serem tóxicos, dependendo da quantidade em que são consumidos (NAVES et al., 2010; SILVA; SILVA, 2000).

A biodisponibilidade de um nutriente ingerido pode ser definida como sua acessibilidade aos processos metabólicos e fisiológicos normais. A biodisponibilidade influencia o efeito benéfico de um nutriente em níveis fisiológicos de ingestão, mas também pode afetar a natureza e a gravidade da toxicidade quando a ingestão for excessiva. Fatores que afetam a biodisponibilidade incluem a concentração, a forma química do nutriente, a nutrição, a saúde do indivíduo e as perdas por excreção. Fitatos, fosfatos e taninos estão entre os depressores mais potentes da biodisponibilidade, ao passo que os ácidos orgânicos, como

ácido cítrico e ascórbico, são promotores fortes para alguns minerais (COMINETTI; COZZOLINO, 2009).

A maior questão sobre os riscos à saúde humana provocados por compostos antinutricionais é o desconhecimento dos níveis de tolerância, do grau de variação do risco individual e da influência de fatores ambientais sobre a capacidade de eliminação de substâncias tóxicas do organismo (SILVA; SILVA, 2000).

De acordo com Brum (2008), os fatores antinutricionais incluem as lectinas, os taninos, as saponinas, os inibidores de proteases e os fitatos, entretanto, outros são também conhecidos como o nitrato e o ácido oxálico.

Muitos dos fatores antinutricionais como inibidores de proteinases, lectinas, saponinas e taninos podem ser inativados por meio de tratamento térmico ou processamento adequado durante o preparo do alimento (RANGEL et al., 2004). Salazar et al. (2006) observaram uma diminuição considerável dos fatores antinutricionais (lectina e inibidores de alfa-amilase) de folhas de *Lycianthes synanthera* quando utilizaram tratamento térmico com 15 minutos de fervura.

O mecanismo de ação desses fatores antinutricionais envolve a inativação de nutrientes, diminuição da digestibilidade e diminuição da utilização metabólica (BRUM, 2008).

2.3.1 Lectinas

2.3.1.1 Considerações gerais

Lectinas ou aglutininas são um grupo heterogêneo de proteínas e/ou glicoproteínas distribuídas na natureza, inclusive em vegetais consumidos como parte da dieta (LAJOLO; GENOVESE, 2002), desprovidas de atividade enzimática que se ligam de maneira reversível e específica a carboidratos, sem, contudo, alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas dos sítios (GABIUS et al., 2002; LORIS, 2002). As lectinas se distinguem das imunoglobulinas, que reconhecem especificamente antígenos, eventualmente sacarídeos, seja estruturalmente, ou dependem de estímulo antigênico para serem sintetizadas. Essa classe de proteínas estruturalmente diversificada e amplamente distribuída, geralmente, está relacionada

a processos de reconhecimento celular mediados por suas interações com carboidratos (LORIS, 2002).

As lectinas são conhecidas por sua habilidade em aglutinar células, especialmente eritrócitos, provocando o fenômeno da aglutinação (REYNOSO-CAMACHO; MEJÍA; LOARCA-PIÑA, 2003).

As lectinas interagem com os açúcares por meio de uma região denominada domínio reconhecedor de carboidratos (DRC), que é altamente conservada em cada tipo de lectina (NI; TIZARD, 1996). O processo de interação a carboidratos ocorre por meio de pontes de hidrogênio, dado o grande número de hidroxilas disponíveis nas moléculas dos açúcares e forças de van der Waals, entre as hidroxilas dos carboidratos e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da lectina (WEIS; DRICKAMER, 1996).

A Figura 1 mostra a representação dos sítios de ligação de uma lectina hipotética, envolvendo três monossacarídeos (dois terminais e um sub-terminal) da cadeia oligossacarídica, apresentando um arranjo espacial próprio.

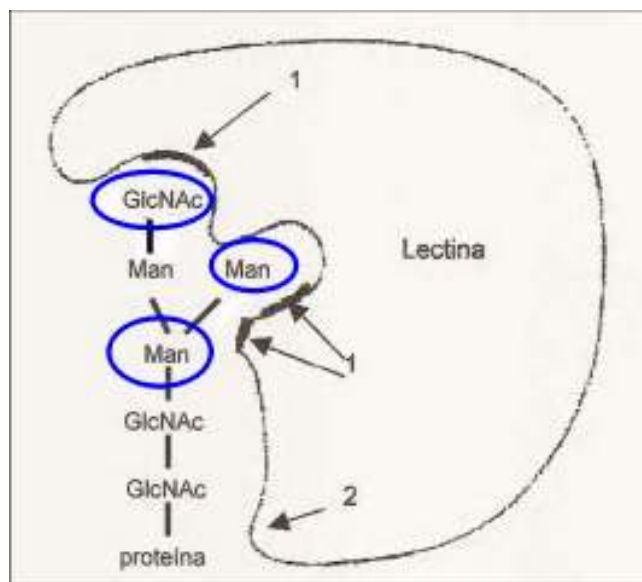


Figura 1 - Representação hipotética do sítio específico de reconhecimento a carboidratos de uma lectina e seus açúcares ligantes. Legenda: 1.domínio de reconhecimento das lectinas ao carboidrato. 2. Ligação hidrofóbica específica entre a proteína e o carboidrato. Zanetti, 2007 adaptado de Brooks et al. (1997).

No final do século XIX, evidências começaram a se acumular para a presença na natureza de proteínas que possuem a capacidade de aglutinar eritrócitos. Tais proteínas foram referidas como hemaglutininas ou fitoaglutininas, porque foram originalmente encontradas

em extratos de plantas. A primeira descrição de tal hemaglutinina foi feita por Peter Hermann Stillmark em sua tese de doutorado apresentada em 1888 à Universidade de Dorpat (hoje Tartu, Estónia). Esta hemaglutinina foi isolada por Stillmark a partir de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.), uma proteína altamente tóxica, denominada ricina, com capacidade de aglutinar eritrócitos humanos e animais (SHARON; LIS, 2004).

O termo “lectina”, (do latim *legere* = escolher, selecionar), foi proposto, em 1954, por Boyd e Sharpleigh, para enfatizar a capacidade de algumas hemaglutininas de se ligar seletivamente a eritrócitos do sistema ABO de grupos sanguíneos (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004).

As lectinas inicialmente foram denominadas hemaglutininas, termo derivado de sua capacidade de aglutinar eritrócitos (Figura 2). Somente em 1952, Watkins e Morgan demonstraram que a propriedade de aglutinação das lectinas estava baseada na atividade específica de ligação da lectina a carboidratos na superfície celular (VAN DAMME et al., 1998). A partir de então, as lectinas puderam ser distinguidas de outras proteínas com base em critérios funcionais bem definidos. Por esta razão, atualmente, as lectinas são consideradas proteínas ligantes a carboidratos em vez de hem(aglutininas) (SILVA, 2008).

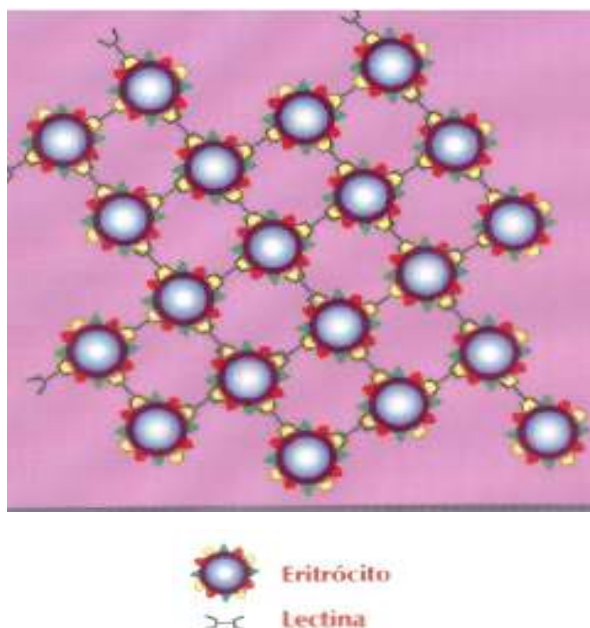


Figura 2 - Representação esquemática da aglutinação por lectinas. Santos, 2007.

Desde a caracterização das primeiras lectinas até a proposta de Boyd e Sharpleigh, duas questões básicas sofreram modificações: no início do século XX, Landsteiner e

Raubitschek (1907) relataram pela primeira vez que lectinas isoladas de sementes como o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), a ervilha (*Pisum sativum* L.) e a lentilha (*Lens culinaris* L.), não apresentavam atividade tóxica (VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS, 2008), sendo abandonada a idéia de que a toxicidade era uma propriedade geral destas proteínas e, com a descoberta de lectinas em animais, vírus e outros organismos, também foi descartada a suposição de que estas proteínas eram exclusivas de vegetais (ZANETTI, 2007).

A especificidade das lectinas com relação a diferentes carboidratos possibilita a sua utilização em pesquisas na área biológica e médica tais como: reconhecimento de células-alvo, adesão celular, interação entre células, interação entre célula-matriz, fertilização, aglutinação de células e bactérias (CAVADA et al., 2001).

A especificidade de uma lectina pode ser feita por meio de um ensaio de inibição da atividade hemaglutinante (AH) fazendo uso de monossacarídeos simples ou carboidratos complexos. As lectinas são classificadas em grupos de reconhecimento e especificidade de acordo com o monossacarídeo e/ou oligossacarídeo que mais efetivamente inibe sua aglutinação por eritrócitos (VIANA, 2002).

Melgarejo, Vega e Pérez (2005) demonstraram que a inibição de eritroaglutinação por carboidratos mostrou que açúcares simples foram fracamente reconhecidos pelas lectinas.

A ação mútua das lectinas com receptores glicídicos da membrana celular é a base molecular para as diversas respostas que essas proteínas são capazes de induzir nos mais variados sistemas biológicos. A interação das lectinas com glicoconjugados da superfície celular, pode promover a formação de ligações cruzadas entre células adjacentes, causando aglutinação das mesmas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

As lectinas são utilizadas em várias pesquisas, como nos processos de purificação e caracterização de polissacarídeo ou glicoconjugados, caracterização de grupos sanguíneos, identificação de células malignas, diferenciação de células patogênicas e caracterização dos estágios de desenvolvimento de microrganismos (MATSUI et al., 2001).

A maioria das lectinas vegetais apresenta como propriedade físico-química geral a presença de um íon metálico como o Ca^{2+} e Mn^{2+} (ou outro metal de transição), para estabilizar os sítios de ligação dos carboidratos (VAN DAMME et al., 1998).

As lectinas geralmente são ricas em aminoácidos ácidos e básicos e pobres em aminoácidos contendo enxofre, sendo que a maioria é glicoproteína com conteúdo de açúcar variável (BOLETI, 2003).

As lectinas vegetais apresentam grande estabilidade sob condições desfavoráveis, característica comum à maioria das proteínas que estão diretamente envolvidas no mecanismo

de defesa de plantas. A maioria das lectinas são estáveis ao longo de uma ampla faixa de pH, são capazes de suportar altas temperaturas e são resistentes a uma grande variedade de enzimas proteolíticas. Dentre as proteínas relacionadas com a defesa, podemos citar os inibidores de proteases, quitinases e glucanases, proteínas inativadoras de ribossomos (RIP), inibidores de alfa-amilase, proteínas antifúngicas e tioninas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

2.3.1.2 Distribuição e função das lectinas nas plantas

As lectinas estão presentes em todos os organismos, sendo encontradas em vegetais superiores, vírus, bactérias, mamíferos e vários grupos de invertebrados (KILPATRICK, 2002).

Em vegetais, elas são detectadas em centenas de espécies de plantas. A maioria das lectinas vegetais é obtida de semente, embora a sua presença já tenha sido observada em todos os tipos de tecidos, como casca, folhas, caule, frutos e raízes (SHARON; LIS, 2001).

Já que as lectinas se diferenciam de todas as outras proteínas vegetais por sua atividade específica de se ligar a carboidratos, pode-se razoavelmente supor que o seu papel fisiológico envolve a sua propriedade de ligação ao açúcar. A princípio, qualquer processo ou reação mediada por lectina depende da ligação específica da lectina a um receptor glicoconjugado (independentemente de saber se esse receptor está localizando dentro ou fora da planta) (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Portanto, a pesquisa do papel fisiológico das lectinas vegetais sempre esteve intimamente ligada à busca de seus receptores naturais. No caso das lectinas, os receptores podem ser definidos como glicoconjugados que possuem um agrupamento de carboidratos com uma estrutura complementar ao sítio de ligação da lectina. Sendo assim, glicoconjugados de diferente natureza (como glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos), porém com carboidrato idêntico (ou estruturalmente semelhante) podem agir como receptores para a mesma lectina (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

2.3.1.3 Classificação das lectinas vegetais

Atualmente, existem três sistemas de classificação para as lectinas vegetais: com base em semelhanças na estrutura da molécula, na especificidade ao carboidrato ou na ocorrência, estrutura e especificidade destas moléculas (ZANETTI, 2007).

Com base na estrutura global e propriedades de aglutinação e precipitação, são distinguidas cinco classes de lectinas: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995), superlectinas (VAN DAMME et al., 1998) (Figura 3) e multilectinas (MOREIRA; AINOUS, 1978; MOREIRA et al., 1998), a saber:

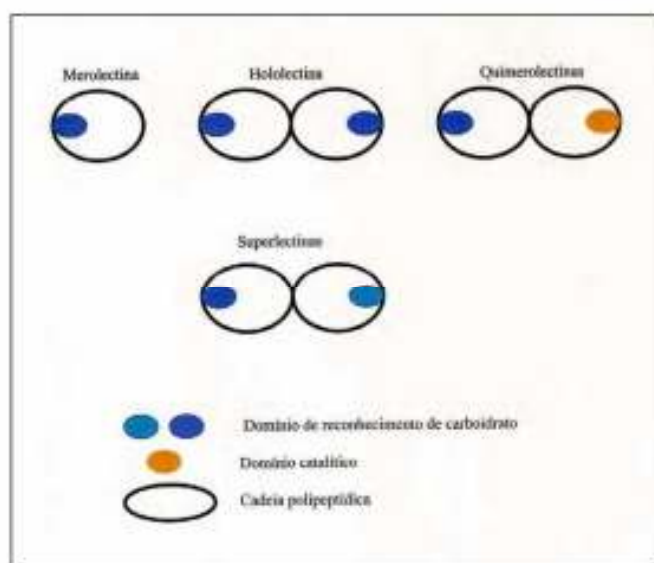


Figura 3 - Representação esquemática das lectinas de plantas conforme característica estrutural. Zanetti, 2007 modificado de Van Damme et al. (1998).

1. Merolectinas - são proteínas de pequeno tamanho e que possuem apenas um sítio de ligação para carboidrato, podem se ligar a células, produzindo modificações fisiológicas, sem, no entanto, precipitar glicoconjugados ou aglutinar células, devido a sua natureza monovalente. A heveína, uma pequena proteína do látex de seringueira que se liga à quitina (*Heves brasiliensis*), é um exemplo típico de merolectinas.
2. Hololectinas - possuem no mínimo, dois domínios idênticos ou muito similares que se ligam ao mesmo carboidrato ou a açúcares de estrutura semelhante. As hololectinas são usualmente designadas como moléculas di ou multivalentes, capazes de promover a aglutinação de células e/ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas

conhecidas são hololectinas, porque elas se comportam como hemaglutininas. A lectina de *Canavalia ensiformes* ou Concanavalina A (ConA) é um exemplo deste grupo.

3. Quimerolectinas - são moléculas que possuem pelo menos dois sítios ligantes de carboidratos, com atividades diferentes: um capaz de se ligar a carboidratos ou glicoconjugados e outro capaz de exercer atividade enzimática ou outra atividade biológica que funciona independentemente do domínio ligante do carboidrato. Dependendo do número de domínios para carboidratos, quimerolectinas agem como merolectinas ou hololectinas. Um representante desse grupo são as proteínas que inativam ribossomos tipo 2, como por exemplo a ricina de *R. communis* L. (toxina da mamona), a qual possui dois sítios de ligação a carboidratos comportando-se como uma hololectina. A lectina de *Viscum album* L., exemplificam também esse grupo de lectinas.

4. Superlectinas - são proteínas que constituem de, pelo menos dois DRC, porém, cada sítio reconhece um tipo de carboidrato estruturalmente diferente do outro. A lectina do bulbo de tulipa (*Tulipa gesneriana* L.), um exemplo de superlectina, possui dois domínios, sendo um específico para manose e outro para N-acetilgalactosamina.

5. Multilectinas – lectinas possuindo dois ou mais sítios ligantes a açúcares, idênticos, mas que podem se ligar a carboidratos diferentes, por exemplo, galactose e manose. É o caso da jacalina (lectina de sementes *Artocarpus integrifolia*) (MOREIRA; AINOUS, 1978) e da frutalina (lectina de sementes de *Artocarpus incisa*) (MOREIRA et al., 1998) que se ligam tanto a D-galactose como a D-manose.

Lectinas vegetais são também subdivididas em seis grupos, de acordo com o monossacarídeo para o qual apresentam maior afinidade: D-manose; D-galactose/N-acetilgalactosamina; N-acetil-D-glicosamina, L-fucose, ácido siálico e grupos de glicanos complexos (VAN DAMME et al., 1998).

Van Damme et al. (1998) propuseram uma classificação das lectinas vegetais em sete famílias de proteínas relacionadas estruturalmente e evolutivamente com o respectivo número de lectinas identificadas: lectina de leguminosas (>100), lectinas ligantes à quitina (>100), RIP tipo 2 e lectinas relacionadas (>20), lectinas relacionadas à jacalina (<10), monocotiledôneas ligantes de manose (>50), floema de cucurbitáceas (<10) e a família das amarantáceas (<10).

2.3.1.4 Atividade antinutricional

Os vegetais oferecem uma enorme variedade de macro e micronutrientes necessários aos organismos heterotróficos, como os microorganismos e organismos herbívoros, incluindo nematódeos, insetos, vários outros invertebrados e animais superiores. Alimentos para consumo humano são obtidos a partir de fontes vegetais ou animais. Os próprios animais são, em última análise, dependentes das plantas para sua sobrevivência. Como as lectinas estão presentes mais comumente nos alimentos vegetais comestíveis, como tomate, batata, feijão, ervilha, cenoura, soja, cerejas, amoras, trigo, germe de trigo, arroz, milho, alho, amendoim, cogumelos, abacate, beterraba, alho-poró, repolho, chá, salsa, orégano, especiarias e nozes, e também em várias espécies de plantas não-cultivadas, a exposição de organismos heterotróficos, incluindo os seres humanos, às lectinas funcionalmente ativas é um evento comum. Na verdade, a presença de quantidades nutricionalmente significativas de lectinas ativas em alimentos frescos e processados e a falta de conhecimento do público sobre os efeitos deletérios das lectinas no intestino e na saúde têm levado a uma série de surtos de intoxicação alimentar (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004).

As lectinas, quando ingeridas com os alimentos, podem reconhecer resíduos de carboidratos presentes nas células intestinais, onde se ligam (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). O fato de as lectinas reconhecerem e se ligarem a receptores glicosilados presentes nas células intestinais confere a estas proteínas propriedades negativas quanto à interferência nos processos de digestão, absorção e utilização de nutrientes, devido à paralisação do transporte desses nutrientes e à absorção de substâncias nocivas. Contudo, o exato mecanismo de ação das lectinas ainda não está claro (TINGJUANGJUN, 2002).

A diminuição da absorção de nutrientes, com conseqüente perda de proteínas e outros materiais celulares de origem endógena, leva a uma rápida perda de peso e inibição do crescimento de animais experimentais (SGARBIERI, 1987). Além dos efeitos degenerativos nas membranas celulares, as lectinas mostram a capacidade de inibir várias enzimas intestinais (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). Entretanto, deve-se enfatizar que nem todas as lectinas são tóxicas, e algumas delas não apresentam qualquer reação adversa.

Efeitos deletérios sistêmicos em vários órgãos e tecidos também podem ocorrer a partir da absorção intestinal, por endocitose e posterior exocitose de lectinas, com liberação na circulação sistêmica (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004).

As lectinas podem também se ligar a receptores glicoprotéico do trato digestivo de insetos e provocar efeitos deletérios locais ou sistêmicos que podem repelir ou retardar o crescimento ou, até mesmo, matar o inseto (PEUMANS et al., 2000).

Os possíveis efeitos adversos de lectinas em humanos podem ser inferidos somente de experimentos com animais de laboratório. Sob esse aspecto, as alterações observados no intestino e em outros órgãos de camundongos, ratos e porcos demonstram que as lectinas são capazes de provocar reações específicas importantes sob o aspecto de segurança alimentar (PEUMANS; VAM DAMME, 1996).

2.3.1.5 Aplicações biotecnológicas das lectinas vegetais

Em glicobiologia e glicobioquímica, as lectinas vegetais são utilizadas na investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos, de glicoproteínas para examinar mudanças decorrentes de processos fisiológicos e patológicos na superfície celular (GABIUS et al., 2002).

A caracterização de grupos sanguíneos é também uma das muitas aplicações atribuídas a essa classe de proteínas. Lectinas de *Lotus tetragonolobus* (Lótus) e *Ulex europaeus* (Tojo), ambas específicas de fucose, são empregadas para identificar células tipo O; a lectina de *Dilichos biflorus* é usada para distinguir entre os subgrupos A1 e A2 e a aglutinina de amendoim, específica para galactose (β 1-3) N-acetilgalactosamina, é empregada na detecção de poliaglutinação, uma condição que acompanha processos de infecção viral e bacteriana, nos quais eritrócitos humanos tornam-se aglutináveis por anticorpos normalmente presentes no soro de indivíduos adultos (LIS; SHARON, 1998).

A habilidade das lectinas de plantas para interagirem com carboidratos expostos na superfície de bactérias e fungos impede o desenvolvimento destes microrganismos. Além disso, essa propriedade tem possibilitado o uso dessas proteínas como ferramenta na identificação de bactérias patogênicas (GRAHAMSTOWN; VAN STADEN, 2002).

No que se refere ao processo inflamatório, algumas pesquisas destacam a ação pro-inflamatória (ALENCAR et al., 2005a; MOTA et al., 2006; NUNES et al., 2009), embora já tenha sido demonstrado que as lectinas são também anti-inflamatórias (ALENCAR et al., 2005b; ASSREUY et al., 1997; SANTI-GADELHA et al., 2006), dependendo da via de

administração e do carboidrato ligante. Talvez isso junto com a capacidade de imunomodulação das lectinas, explique todas as suas ações benéficas e deletérias.

As lectinas têm sido usadas como ferramentas para o estudo de processos antinociceptivos (BITENCOURT et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009), cicatrizantes (MELO, 2007; SILVA et al., 2009), atividade mitogênica sobre linfócitos humanos (MACIEL, 2002), atividade inseticida (BOLETI, 2003), antitumoral (PEREIRA, 2005), efeitos insulino-miméticos (CAVADA et al., 2001) e indução de óxido nítrico em aorta de rato (GADELHA et al., 2005).

Lectinas de *Canavalia grandiflora* apresentaram potencial antiinflamatório e analgésico (NUNES et al., 2009). Silva et al. (2009) determinaram o perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr). A ConBr influenciou a expressão de proteases com atividade colagenolítica podendo assim, interferir no processo cicatricial das lesões cutâneas em camundongos.

Melo-Júnior et al. (2008) ao avaliarem as mudanças qualitativas na expressão de glicoconjugados em tecidos gástrico humano de pacientes infectados ou não pelo *Helicobacter pylori*, observaram que as lectinas reconheceram diferentemente os glicoconjugados nas camadas mucosas superficiais do tecido gástrico.

Lectina de sementes de *Cratylia mollis*, experimentalmente chamada Cramoll 1,4, foi usada no tratamento de feridas cutâneas (1 cm de diâmetro) em camundongos normais e imunodeprimidos (Immunod). As lesões foram tratadas com administração tópica (T) e intraperitoneal (Ip). Parâmetros como edema, hiperemia, crosta, tecidos de granulação e cicatricial como também a contração das feridas foi analisada por 12 dias. O fechamento de todas as lesões foi observado no dia 10 para o grupo Cramoll Immunod Ip e dia 11 para os grupos Cramoll T, Cramoll Ip e Cramoll Immunod T. Os grupos controle obtiveram fechamento das feridas no dia 12 para o grupo NaCl Immunod T e 90% dos grupos NaCl T, NaCl Ip e NaCl Immunod Ip. Os animais saudáveis ou imunocomprometidos tratados com Cramoll 1,4 tiveram suas lesões eficientemente reparadas e em menor tempo que o grupo controle (MELO, 2007).

Figueiredo (2008) investigou os efeitos do tratamento tópico diário com a lectina de *Cratylia floribunda*, uma espécie de leguminosa, em um modelo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos. Feridas cirúrgicas (1cm²) foram produzidas sob condições assépticas na região dorsal dos camundongos. Esta lectina reduziu a frequência, intensidade e a duração dos sinais flogísticos edema e hiperemia e no 10º e 11º dias do período pós-

operatório a presença de crosta nas feridas do grupo tratado com a lectina foi significativamente menor que no grupo controle (solução salina).

Yan et al. (2010) purificaram uma lectina monomérica de raízes de uma erva chinesa *Astragalus membranaceus* (Fisch.) (D-galactose-específica) que foi capaz de inibir a proliferação de linhagens celulares HeLa e K562. Assim, esta lectina apresenta um elevado potencial para atividade antitumoral.

A ação fungicida, antimicrobiana e inseticida das lectinas torna viável o uso dessas proteínas como agentes defensivos de pragas na agricultura (SILVA, 2008).

2.3.2 Taninos

São componentes polifenólicos, amplamente distribuídas nas plantas e geralmente são classificados como taninos condensados ou hidrolisáveis (KHATTAB et al., 2010). O peso molecular varia entre 3000-20,000. O grupo ativo no tanino é o grupo hidroxílica fenólico; fenóis se dissolvem facilmente em solução de hidróxido de sódio (NaOH) (ALI et al., 2009).

Os taninos são amplamente distribuídos em alimentos de origem vegetal, que têm efeitos nocivos sobre os animais, incluindo humanos. As proteínas salivares ricas em prolina (PRP) podem atuar como defesa contra os taninos por formar complexos com estes e, assim, impedir sua interação com outros compostos biológicos e absorção no canal intestinal (LU; BENNICK, 1998).

Os taninos presentes no vinho são moléculas fenólicas que resultam da polimerização de moléculas elementares que contêm a função fenol, e sua massa molecular varia de 600 a 3500 Da. Segundo a natureza das moléculas elementares, estes compostos se classificam em taninos condensados (ou catéquicos) e taninos hidrolisáveis ou gálicos (GALIOTTI, 2007).

Os taninos condensados, atualmente denominados proantocianidinas, são polímeros de alto peso molecular, derivados da polimerização das catequinas, que são as unidades flavanólicas básicas. Já os taninos hidrolisáveis também são denominados galotaninos e elagitaninos, em função de liberarem ao meio maior quantidade de ácido gálico ou ácido elágico, após hidrólise ácida (MANFROI et al., 2010).

Os níveis de polifenóis acima de 1.000 mg/100 g de peso seco são considerados altos e prejudiciais a digestibilidade de proteínas (HOSENEY; VARRIANO-MARSTON; DENDY, 1981).

Pinto et al. (2001) caracterizaram as folhas de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schoot) quanto aos fatores antinutricionais (taninos, inibidores de tripsina, ácido oxálico e nitratos). Os resultados expressos em matéria fresca e seca mostraram que esses fatores antinutricionais apresentaram teores aceitáveis, podendo a taioba ser vista como fonte nutritiva e de baixo custo.

Naves et al. (2010) estudaram os polifenóis das sementes da abóbora *Cucurbita máxima*. As sementes foram submetidas aos seguintes tratamentos: utilizadas na forma crua, cozidas em água em ebulição por três tempos: 5, 10 e 15 minutos e cozidas no vapor por 10 minutos. Quanto aos níveis de polifenóis, os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Santos (2006) determinou os teores de polifenóis, nitrato e ácido oxálico em folhas de brócoli, couve-flor e couve submetidas à cocção por seis tempos diferentes (0, 2, 4, 6, 8 e 10 minutos). Verificou-se queda nos teores de fatores antinutricionais com o aumento do tempo de cozimento, mostrando-se aceitáveis para o consumo. Contudo, os tratamentos utilizados não foram suficientes para reduzir os teores de polifenóis das folhas de brócoli e couve a valores considerados adequados ao consumo humano, sugerindo a utilização conjunta de outra metodologia para a redução dos polifenóis presentes nesses vegetais.

A farinha de folhas de mandioca possui um teor relativamente elevado de proteínas, porém, apresenta baixa digestibilidade, principalmente, devido à presença de substâncias como os polifenóis. Visando melhorar o aproveitamento protéico desta farinha, Corrêa et al. (2004) utilizaram três solventes (água, etanol 50mL/100mL e hidróxido de amônio 1mol/L) para remover os polifenóis. Dos solventes empregados, o hidróxido de amônio foi o mais eficaz, com índice de remoção de 94%, seguido pelo etanol (83%) e água (65%). A digestibilidade da proteína *in vitro* aumentou em 74%, quando o solvente empregado na remoção dos polifenóis foi o hidróxido de amônio.

Recentemente, Khattab et al. (2010) investigaram o teor de taninos condensados em sementes, farinhas e bolos de 27 variedades de canola (*Brassica napus* L.) cultivada no Canadá e uma variedade de mostarda-da-índia, também chamada mostarda-oriental, mostarda chinesa, mostarda-castanha ou mostarda-marron (*Brassica juncea* L.). Os valores de taninos condensados variaram de 0,46 a 1,53, 1,12 a 1,32 e 0,59 a 1,19 g/100 g de sementes, bolos e farinhas de canola, respectivamente.

2.3.3 Saponinas

Saponinas constitui uma classe ampla, sendo compostos glicosídeos comuns em plantas superiores. Possui uma parte com núcleo lipofílico (aglicona) que pode ser um triterpenóide ou esteróide ligada a uma ou mais cadeias laterais de açúcares hidrofílicos (glicona) por meio de ligações éster para o núcleo de carbono aglicona em locais diferentes (HASSAN et al., 2010).

Saponinas consistem em uma molécula de açúcar geralmente contendo glicose, galactose, ácido glucurônico, xilose, ramnose ou metilpentose, glicosidicamente ligados a uma aglicona hidrofóbica (sapogeninas) que podem ser triterpenóides ou esteróides na natureza.

A aglicona pode conter uma ou mais ligações insaturadas C-C. A cadeia de oligossacarídeos está normalmente ligado à posição C3 (monodesmosídico), mas muitas saponinas tem uma molécula de açúcar adicional na posição C26 e C28 (bidesmosídico). A grande complexidade da estrutura das saponinas surge da variabilidade da estrutura de aglicona, a natureza das cadeias laterais e à posição de ligação dessas moléculas na aglicona. Experimentos demonstrando propriedades fisiológicas, imunológicas e farmacológicas das saponinas têm provocado considerável interesse clínico destas substâncias (FRANCIS et al., 2002).

A propriedade mais característica de saponinas é a sua capacidade de causar hemólise: quando adicionado a uma suspensão de sangue, as saponinas produzem alterações em membranas de eritrócitos, fazendo a hemoglobina se difundir no meio circundante (WHO, 1998). As saponinas são estáveis a ação do calor, são tóxicas para animais de sangue frio, como os peixes e anfíbios e provocam inibição respiratória e enzimática (boi e galinha) (BRUM, 2008).

Naves et al. (2010) observaram redução significativa dos níveis de saponinas na farinha de sementes de abóbora quando cozidas em água destilada por 10 minutos (0,24 g.100 g⁻¹ MS), não sendo observada diferença nos teores desse antinutriente, entre as sementes cozidas em água destilada por 15 minutos e cozidas no vapor por 10 minutos (0,31 g.100 g⁻¹ MS).

Wallace, Marfo e Plahar (1998) analisaram o valor nutricional e fatores antinutricionais de quatro vegetais folhosos não convencionais: *Xanthosomas mafaffa*, *Ipomoea involucrata*, *Lauaea taxaracifolia* e *Euphorbia hirta*. Os autores concluíram que

todas as folhas estudadas têm comparativamente baixas concentrações de oxalato, fitato taninos, alcalóides e saponinas, tendo os teores destas últimas variado de 6.67 mg% para *E. hirta* para 481 mg% em *X. mafaffa* em base fresca.

Misturas de saponinas presentes nas plantas e em produtos vegetais possuem diversos efeitos biológicos, quando presentes no corpo do animal. Com a informação atualmente disponível, é difícil estabelecer claramente quanto a funcionalidade e a relação atividade-estrutura sobre os efeitos de saponinas em sistemas biológicos. Devido principalmente à ocorrência de um vasto número de saponinas com estruturas químicas semelhantes, e à complexidade das reações fisiológicas celulares. Outros fatores que podem ter uma influência considerável sobre as ações das saponinas podem ser as suas interações com outros constituintes dietéticos (FRANCIS et al., 2002).

2.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

2.4.1 Infecções causadas por fungos

O aumento da frequência e gravidade das infecções fúngicas sistêmicas em pacientes com alterações imunológicas e o surgimento de diferentes formas de apresentações clínicas das micoses clássicas e de novas infecções fúngicas, tem sido uma tendência clara nas últimas décadas do século XX. Este papel cada vez mais importante dos fungos na patologia humana, levou a um aumento no uso dos antifúngicos sistêmicos e exerceu uma importante pressão sobre a investigação necessária para a obtenção e desenvolvimento de novas moléculas (CARRILO-MUÑOZ; BRIÓ; QUINDÓS, 2001).

Durante a última década, a incidência de infecções causadas por fungos aumentou drasticamente. Essas infecções estão ocorrendo como infecções hospitalares e em indivíduos imunocomprometidos. Além disso, milhares de doenças fúngicas afetam plantas economicamente importantes, custando anualmente, mais de um bilhão de dólares (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Os fungos são um grupo extremamente diversificado de organismos, com cerca de 250.000 espécies amplamente distribuídas em todos os ecossistemas. Os seres humanos e outros animais são expostos aos fungos desde o momento do nascimento. Das várias espécies

conhecidas de fungos, apenas aproximadamente 200 espécies são patogênicas aos humanos e aos animais, apesar de muitos fungos não patogênicos causarem sintomas alérgicos (SELITRENNIKOFF, 2001).

Toda infecção de origem fúngica é denominada de micose. As micoses geralmente são infecções de longa duração (crônicas) porque os fungos crescem lentamente. As micoses são classificadas em cinco grupos conforme o grau de envolvimento no tecido e modo de entrada no hospedeiro em: infecção sistêmica, subcutânea, cutânea, superficial e oportunista (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

As micoses sistêmicas são infecções fúngicas profundas no interior do corpo. Não são restritas a nenhuma região específica do corpo, podendo afetar vários tecidos e órgãos. São geralmente causadas por fungos que estão no solo, sendo transmitida pela inalação dos esporos. As micoses sistêmicas não são contagiosas entre animais e humanos ou entre indivíduos. São exemplos a histoplasmose e a paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana) causadas respectivamente pelos fungos dimórficos *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

As micoses subcutâneas são infecções causadas por um grupo diversificado de fungos que vive no solo e na vegetação, estando localizadas abaixo da pele. As principais micoses subcutâneas são: cromoblastomicose, esporotricose, micetoma, zigomicose, rinosporidiose, doença de Jorge Lobo, feo-hifomicose e hialo-hifomicose (ALMEIDA, 2006).

As micoses cutâneas ou dermatomicoses são causadas por um grupo de fungos denominados de dermatófitos, que invadem apenas a epiderme, o couro cabeludo e as unhas. A infecção é transmitida entre indivíduos ou entre animais e humanos por contato direto ou contato com fios e células epidérmicas infectadas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Micoses superficiais são causadas por fungos que estão localizados ao longo dos fios dos cabelos e apenas em células da camada mais superficial e não induz, na maioria das vezes, nenhuma resposta inflamatória ao hospedeiro. Essas infecções são prevalentes em climas tropicais. As principais doenças e seus respectivos agentes etiológicos são: pitíriase versicolor - “micose de praia, pano branco” (*Malassezia furfur*), piedra negra (*Piedraia hortae*) e piedra branca (*Trichosporon beigelii*) (ALMEIDA, 2006).

Fungos oportunistas não induzem doença na maioria das pessoas normais, ou seja, geralmente são inofensivos em seu habitat normal, mas pode tornar-se patogênico em um hospedeiro que se encontra debilitado ou traumatizado, ou em indivíduos sobre tratamento com antibióticos de amplo espectro, ou com o sistema imune comprometido por drogas (TORTORA; FUNKE, CASE, 2005).

Os fungos mais implicados nas infecções oportunistas pertencem ao gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pneumocystis*, *Pseudallescheria* (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

2.4.2 Dermatofitoses

Com o aumento progressivo de doenças causadas por dermatófitos em seres humanos, tornou-se mais evidente a carência de estudos e a necessidade da adoção de novas técnicas de prevenção, objetivando minimizar a ação desses patógenos. A evolução terapêutica dos últimos anos, com o surgimento de drogas para uso tópico, oral e/ou parenteral, como a amorolfina, ciclopirox, itraconazol, terbinafina, fluconazol, dentre outras, tem permitido índices de cura altos, menor tempo de tratamento e maior segurança para os pacientes, em comparação com as drogas anti-fúngicas disponíveis antes da década de 90, a griseofulvina e o cetoconazol (RAMOS-E-SILVA, 2000).

As dermatofitoses, dermatomicoses ou tíneas são micoses superficiais provocadas por fungos do grupo dos dermatófitos. Elas receberam várias denominações não científicas como, por exemplo, pé-de-atleta, também conhecida por *Tinea pedis* (TIMBY; SMITH, 2005).

Os dermatófitos (também denominados *tinea*) são um grupo de fungos parasitários que têm a habilidade para infectar somente a pele, o cabelo e as unhas (estruturas superficiais queratinizadas). As expressões: tinha do pé, tinha da cabeça, tinha do corpo e tinha crural identificam as áreas cutâneas de infecção - respectivamente os pés, a cabeça, o corpo e a virilha (TIMBY; SMITH, 2005). Dermatófitos estão entre os parasitas mais comuns observados no humano e na pele de animais. As infecções são geralmente cutâneas e restringidas às camadas superficiais da pele. Reações a uma infecção por dermatófitos podem variar de leves a graves em consequência de reações do hospedeiro aos produtos metabólicos do fungo, a virulência da infecção, tensão ou espécie, a localização anatômica da infecção e os fatores ambientais locais (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

Os dermatófitos que mais frequentemente afetam seres humanos e animais estão distribuídos em diversas espécies pertencentes aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*. Esses gêneros podem ser divididos em três grandes grupos com base no habitat preferencial: geofílico (solos), zoofílico (animais) e antropofílico (humanos) (GURGEL, 2005).

Os medicamentos utilizados no tratamento das dermatofitoses exibem alguns efeitos adversos e possuem uma eficácia limitada (GUPTA et al., 1998). Assim, há a necessidade do descobrimento de drogas antifúngicas mais seguras e de maior eficácia.

As dermatomicoses têm frequência alta na população com uma incidência ao redor de 20%, de acordo com a OMS (MARQUES et al., 2000). Hoje em dia, as onicomicoses podem ser observadas em mais de 10% da população humana (KORTING; SCHALLER, 2001).

A descoberta de lectinas presentes em fungos teve início por meio de pesquisas na toxicologia de fungos superiores, seguindo descobertas de toxinas de sementes com propriedades coagulantes do sangue, como por exemplo, a ricina encontrada em *R. communis* e a abrina encontrada em *Abrus precatorius*, sendo que se objetivava encontrar em fungos, moléculas com propriedades semelhantes às encontradas em plantas (DAMICO, 2002).

Os fungos apresentam na sua parede celular (Figura 4) a quitina, um polissacarídeo composto de longas cadeias de açúcares do tipo N-acetilglicosamina. A parede celular fúngica contém outros polissacarídeos, sendo o β -glicano, um longo polímero de D-glicose, o mais importante (LEVINSON; JAWETZ, 2005). As lectinas pela sua capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos são usadas em investigações citológicas e de glicoconjugados constituintes de membranas celulares e subcelulares.

Interações de lectinas vegetais com fungos, têm sido demonstradas através da capacidade da lectina de *Urtica dioica*, com especificidade para quitina em inibir o crescimento de alguns fungos fitopatogênicos (BROEKAERT et al., 1989).

A heveína, uma proteína do látex de *H. brasiliensis*, é um outro exemplo de proteína ligante de quitina que apresenta propriedades antifúngicas (VAN PARIJS et al., 1991).

Suspensões de células de levedura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) foram testadas quanto sua certificação básica para fazer parte de um controle de qualidade relativo à atividade micorrizal de fungos ectomicorrizal. A lectina ConA e a lectina de *Agaricus biporus*, quando testadas com *Saccharomyces cerevisiae*, apresentaram atividade hemaglutinante. Os resultados indicam que a suspensão de células de leveduras é apropriada não somente para a investigação da lectina em essência, mas também para monitorar a mudança da atividade lectínica de isolados de fungos na presença de planta hospedeira latente durante a síntese de micorriza (BUSCH; LELLEY, 2000). A presença de ácido siálico na superfície celular de dois isolados de *Candida albicans* foi identificada e a sua distribuição na superfície íntegra foi inferida por marcação com *Limulus polyphemus* fluoresceína e aglutinina de *Limax flavus* e observada por microscopia ótica com aglutinina de *Sambucus nigra* FITC e anulada por tratamento prévio da levedura com sialidase bacteriana. O ácido

siálico contribui também para a eletronegatividade de *C. albicans*, um fator decisivo na interação fúngica *in vivo*.

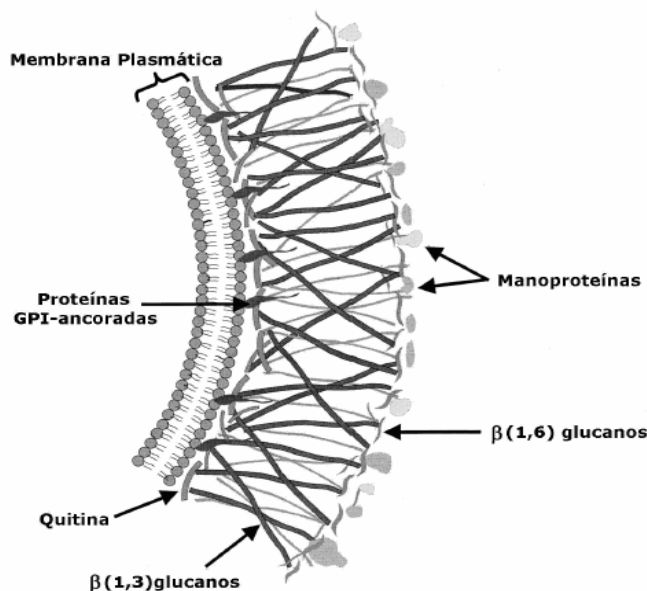


Figura 4 - Esquema estrutural da parede celular de fungos. Glicofosfatidilinositol (GPI). Selitrenkoff, 2001.

A parede celular dos fungos é altamente versátil, sendo continuamente expandida durante o crescimento e extensivamente remodelada durante o desenvolvimento. Quimicamente, a parede contém de 80 a 90% de polissacarídeos, sendo o restante constituído de proteínas e lipídeos. Em algumas espécies, são encontradas quantidades apreciáveis de pigmentos (melanina), polifosfatos e íons inorgânicos (BOLETI, 2003; SILVA, 2008).

Uma lectina de sementes manose específica de *Pisum sativum* apresentou atividade antifúngica, inibindo o crescimento de *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride* e *Fusarium oxysporum* (SITOHY; DOHEIM; BADR, 2007).

O estudo da atividade de lectina de sementes de *Pouteria torta* (PtLec), ou abiu piloso (nome vulgar) sobre os fungos *F. oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *Saccharomyces cerevisiae* revelou que PtLec retardou o crescimento destes fungos, exibindo uma inibição de 100 % sobre o crescimento de *S. cerevisiae*. A PtLec possui especificidade por D-manose e D-glicose (BOLETI, 2003).

Uma lectina monomérica glicose-manose específica isolada de um grupo de sementes de pimenta-malagueta (*Capsicum frutescens* L. var. *fasciculatum*) mostrou inibir a germinação de esporos de *A. flavus* e *Fusarium moniliforme* e o crescimento de hifas nestes fungos (NGAI; NG, 2007).

Recentemente, Vaz et al. (2010) purificaram uma lectina de casca de *Sebastiania jacobinensis*. Esta lectina mostrou inibir o crescimento micelial de dois fungos, *F. moniliforme* e *F. oxysporum*, com um valor de concentração de inibição (IC₅₀) de $123 \pm 0,5$ e $303 \pm 0,9$ µg, respectivamente.

2.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A busca de novas drogas antibacterianas é realizada por vários grupos de pesquisadores em todo o mundo, não só para combater as infecções por bactérias multiresistentes e em uso clínico, mas também para a utilização em diversas atividades como na indústria e no comércio (BATISTA, 2008).

Ainda de acordo com o autor supracitado, a preocupação para que se busque novos fármacos é crescente devido a disseminação de estirpes resistentes, tanto a nível ambulatorial quanto hospitalar e a diminuição de registro nos últimos anos de novas drogas com potencial de controle das infecções.

A resistência bacteriana adquirida é descrita em praticamente todas as espécies de bactérias, conhecendo-se detalhes dos mecanismos de aquisição de resistência e os mecanismos moleculares da manifestação da resistência. A resistência das várias espécies bacterianas aos antimicrobianos é muito variável entre os países, regiões e a origem hospitalar ou comunitária das estirpes. Algumas espécies apresentam resistência amplamente difundida em todo o mundo, como é o caso do *Staphylococcus aureus*, enquanto que outras mantêm em todos os países notável sensibilidade às drogas ativas, como exemplificado pelo *Streptococcus pyogenes* e as penicilinas (TAVARES, 2000).

Dentre os microrganismos que sofreram grandes modificações na sensibilidade aos antimicrobianos com o decorrer dos anos, destacam-se os estafilococos, as enterobactérias, a *Pseudomonas aeruginosa*, o *Acinetobacter baumannii* e, mais recentemente, os hemófilos, gonococos, enterococos e pneumococos. Na atualidade, é motivo de grande preocupação entre os cientistas, os microbiologistas e os médicos clínicos a resistência entre as bactérias gram-positivas, que vêm se tornando bactérias problemas na terapêutica anti-infecciosa (TAVARES, 2000).

A parede celular das bactérias não apenas previne qualquer interação entre glicoconjugados de suas membranas e proteínas que se ligam a açúcares, mas também impede

que estas proteínas penetrem no citoplasma. Portanto, lectinas vegetais não podem alterar a estrutura e/ou permeabilidade da membrana ou alterar o processo intracelular normal de invasão destas bactérias. No entanto, se as lectinas desempenharem um papel no mecanismo de defesa de plantas contra bactérias, deve ser de forma indireta, baseando-se na interação com carboidratos da parede celular ou glicanos extracelulares (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Ensaio biológico utilizando uma lectina isolada de semente de *Crotalaria paulina* (CrpL) em culturas de bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, demonstraram que esta lectina foi capaz de afetar o crescimento dessas bactérias (PANDO, 2001).

Duas lectinas (ácido N-glicolilneuramínico-específica) de folhas de amora (*Morus alba* L.) (MLL 1 e 2), foram estudadas para testar sua atividade antibacteriana contra a bactéria patogênica *Pseudomonas syringae* pv. *mori* (RATANAPO; NGAMJUNYAPORN; CHULAVATNATOL, 2001). A MLL 1, mas não a MLL 2 foi capaz de induzir a aglutinação de *P. syringae* pv. *mori*. A MLL 1 pode induzir a aglutinação apenas na fase exponencial do crescimento bacteriano em meio líquido e a aglutinação foi especificamente inibida pelo ácido N-glicolilneuramínico e N-acetilgalactosamina a 12,5 mM.

Aglutininas de sete espécies de plantas medicinais da África do Sul foram examinadas com relação à interação com duas bactérias gram-positivas, *S. aureus* e *Bacillus subtilis*. As aglutininas *Hypoxis hemerocallidea* e *Combretum mkhuzense* agregaram *S. aureus* em baixas concentrações, 4 e 5 µg/ml de proteína, respectivamente. Em contrapartida, concentrações relativamente altas de aglutininas foram necessárias para aglutinação de *B. subtilis*. As concentrações mínimas de aglutinina de *C. mkhuzense*, *Kniphofia* spp. e *Tulbaghia violacea* necessária para a agregação de *B. subtilis* foram de 20, 33,7 e 45 µg/ml de proteína, respectivamente (GAIDAMASHVILI; VAN STADEN, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 Folhas de cenoura

As folhas orgânicas de cenoura (*D. carota* L. cv. Brasília Irecê) utilizadas na pesquisa foram adquiridas na propriedade agro-ecológica Assentamento Padre Gino no município de Sapé, Paraíba, Brasil.

A folha de cenoura apresenta a seguinte classificação filogenética: Reino: Plantae; Divisão: Magnoliophyta; Classe: Magnoliopsida; Ordem: Apiales; Família: Apiaceae; Gênero: *Daucus*; Espécie: *Daucus carota*.

3.1.2 Células sanguíneas

Os eritrócitos humanos foram obtidos por meio de doações de bolsas de sangue pelo Hospital Universitário Lauro Wanderley da UFPB. Foram utilizadas também amostras de sangue de coelho obtidas do Departamento de Biologia Molecular da UFPB.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Análise da composição centesimal

3.2.1.1 Preparo das amostras

Os tratamentos utilizados para as análises físico-químicas foram: 1. fresca (forma natural); 2. branqueada em água destilada fervente por 15-20 segundos; 3. cozida por 10

minutos; 4. folha liofilizada. As folhas foram espalhadas sobre papel filtro e secas a temperatura de 25°C por cerca de 2 horas. O material foi levado para estufa a 55°C por 48 horas (tratamentos 1, 2 e 3). No quarto tratamento, as folhas frescas foram congeladas e submetidas à liofilização durante 48 horas a -40°C. As amostras assim determinadas, foram trituradas em moinho elétrico tipo Willey, homogeneizado e armazenado em frascos de vidro hermeticamente fechados à temperatura ambiente até o momento das análises.

As folhas de cenoura submetidas aos quatro tratamentos descritos acima foram utilizadas também para determinar o teor de fatores antinutricionais (lectinas, taninos e saponinas), teor de proteínas solúveis e teste de atividade hemolítica.

3.2.1.2 Análise físico-química

Os valores de umidade, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), cinzas, proteína bruta, gordura bruta e energia bruta foram obtidos segundo metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002) com base na Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) (1990).

A umidade foi estimada utilizando o método de secagem em estufa, por secagem de uma amostra representativa de 1,5 g a 105°C por 16 horas.

Os teores de FDN e FDA foram determinados conforme método de Van Soest em um digestor de fibras (Modelo MA 444 - MARCONI), usando 0,6 g das amostras por 1 hora. Esse método é baseado no fracionamento dos componentes fibrosos, por meio de reagentes específicos, denominados detergentes.

O teor de cinzas ou matéria mineral foi obtido pela incineração de 1,5 g da amostra seca ao ar em um forno mufla (Modelo F 1800 1P, EDGCON) a 600°C por 4 horas.

A proteína bruta (% N x 6,25) foi obtida pelo método de Kjeldahl pela conversão do conteúdo de nitrogênio usando 0,1 g de cada amostra. Este método para determinação de nitrogênio e proteína em compostos orgânicos e inorgânicos foi realizado em três fases principais: 1) digestão de 100 mg da amostra em 5 mL de ácido sulfúrico concentrado com um catalisador (1,5 g de mistura digestora), que resulta em conversão do nitrogênio em sulfato de amônio; 2) destilação, onde o sulfato de amônio é tratado com NaOH, ocorrendo a liberação da amônia em uma solução receptora (ácido bórico a 2 %) que tem a finalidade de

fixar a amônia; e 3) quantificação da amônia por titulação com uma solução padrão de ácido clorídrico 0,02 N com fator conhecido.

A gordura bruta foi determinada pela extração exaustiva de 2,5 g das amostras por 2 horas, em um aparelho extrator de óleo e graxas (Modelo MA 044/8/50 – MARCONI) com éter de petróleo.

Os carboidratos solúveis foram determinados pelo método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico, usando glicose como padrão (Figura 5). O sistema de reação compreende 1 mL de amostra ou da solução padrão e 1 mL de fenol a 5%, ao qual se adiciona, rapidamente, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Como a reação é exotérmica, resfriou a temperatura ambiente antes de fazer a leitura da absorbância a 490 nm (DUBOIS et al., 1956). De acordo com Dubois et al. (1956), esse método fundamenta-se no fato de que carboidratos simples ou complexos e seus derivados, incluindo metil ésteres com grupos redutores livres ou potencialmente livres, quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado dão coloração amarelo-alaranjado, com uma reação sensível e coloração estável; o método é simples, rápido, sensível e com resultados reprodutíveis. Carboidratos totais (CHT) foram estimados segundo Mertens (1997), onde: $CHT = \% FDN + \% \text{carboidrato solúvel}$.

O teor de energia bruta foi determinado usando uma bomba calorimétrica e expresso em kcal/100 g da amostra. Todas essas análises foram realizadas com quatro repetições.

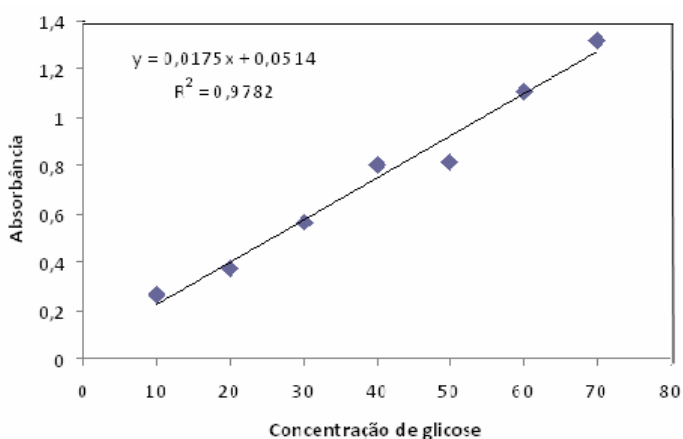


Figura 5 - Curva padrão da solução de glicose: concentração de glicose em µg/mL versus absorbância (490 nm).

3.2.2 Preparo do sangue

3.2.2.1 Lavagem dos eritrócitos para testes de atividade hemaglutinante

Foram utilizados no presente estudo amostras de sangue humano (A, B, O) e de coelho. Foi distribuído 2 mL de sangue por tubo de ensaio e completado seu volume com NaCl 0,15M, sendo em seguida, centrifugado pelo menos 5 vezes a 2.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a lavagem do sangue foi prosseguida, até a obtenção de uma massa de eritrócitos livre de soro e material hemolisado. O objetivo da lavagem é retirar o anticoagulante e o plasma. Aliquotas de 300 µL foram retiradas e adicionadas em 10 mL de NaCl 0,15 M e utilizados em ensaios de hemaglutinação (3%).

3.2.2.2 Tratamento dos eritrócitos com enzimas proteolíticas

Com o objetivo de remover o glicocálice e facilitar uma maior exposição dos carboidratos de superfície, os eritrócitos foram submetidos a tratamentos enzimáticos com tripsina, papaína e bromelaína.

Para o tratamento enzimático dos eritrócitos, foi utilizada a técnica descrita por Lis e Sharon (1972). Uma solução estoque de 1mg/mL das enzimas foi adicionada em NaCl 0,15 e acrescentado o sangue, previamente lavado. A mistura foi incubada a 37° C por 30 minutos, em seguida, centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos e os precipitados lavados no mínimo 5 vezes com solução salina. Foram preparadas as suspensões de eritrócitos a 3% diluído em NaCl 0,15M.

3.2.3 Preparação da farinha de folhas de cenoura

As folhas de cenoura foram previamente lavadas com água corrente e destilada, colocadas em bancada para escorrer e, em seguida, foram armazenadas em sacos plásticos

para congelar e submetidas ao processo de liofilização. Posteriormente as folhas foram trituradas em moinho elétrico tipo Willey e a farinha obtida foi submetida a tratamento com álcool a 70% para remoção dos pigmentos. A farinha de fina granulação foi armazenada em frascos hermeticamente fechados para uso posterior.

3.2.4 Extração de proteínas solúveis das amostras

Para escolher o método de extração das proteínas da farinha das folhas de cenoura que proporcionasse maior quantidade de proteína e maior AH, foram testadas seis soluções tampão: NaCl 0,15 M, NaCl 0,5 M, Glicina-HCl 0,1 M com NaCl 0,15 M, pH 2,6, Acetato de Sódio pH 4,0, Tris-HCl 0,1 M com NaCl 0,15 M pH 7,6 e Glicina-NaOH 0,1 M com NaCl 0,15 M pH 9,0.

A farinha obtida a partir da trituração das folhas de cenoura foram submetidas à extração com essas soluções tampão na proporção 1:10 (m/v).

As amostras foram extraídas em agitador magnético, a 100 rpm durante 3 horas consecutivas à temperatura ambiente. A suspensão obtida foi centrifugada a 5.000 rpm por 20 minutos a 4°C, o precipitado foi descartado. O sobrenadante, denominado de extrato bruto, foi filtrado em papel filtro e utilizado para análises posteriores (medida da atividade hemaglutinante, dosagem de proteínas, especificidade por açúcares, teor de taninos, dentre outras).

3.2.5 Determinação da atividade hemaglutinante

A AH foi realizada segundo a metodologia descrita por Correia e Coelho (1995). A AH dos diferentes extratos protéicos foi determinada por meio de diluições duplo-seriadas com repetições. Em cada tubo foram adicionados 100µL de NaCl 0,15M; no primeiro tubo foram adicionados 100µL da amostra (extrato/fração) e uma série de diluições duplas foram realizadas (1:2, 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64), homogeneizando completamente antes de cada transferência. A cada um dos tubos (com exceção do último) foram adicionados 100 µL de

eritrócitos de coelho e do sistema ABO a 3%. Os tubos foram então incubados em estufa a 37°C por 30 minutos e a presença da AH foi determinada macroscopicamente.

Os resultados foram expressos em número de unidades hemaglutinantes (UH) que é calculado como sendo o inverso do título da maior diluição, na base 2 que ainda apresentou nítida aglutinação e, em atividade específica da lectina obtida pelo cálculo de UH/mgP (KILPATRICK; YEOMAN, 1978). Por exemplo: considerando uma diluição 2^5 , o seu título igual a 1/32, e o volume de extrato utilizado no ensaio de 100 μ L, define-se que a AH é de 32 UH/100 μ L. Os tubos em duplicata que continham somente NaCl 0,15 M e a suspensão de eritrócitos serviram como controle.

3.2.6 Especificidade por açúcares

A especificidade da lectina por açúcares foi determinada segundo descrito por Moreira e Perrone (1977). Para os ensaios de inibição da AH, uma alíquota de 100 μ L de uma solução de NaCl 0,15 M foi colocada em todos os tubos. No primeiro tubo foram adicionados 100 μ L de soluções estoque de carboidratos simples na concentração de 0,5M e destas soluções foram feitas diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc). Em seguida, foram adicionados 100 μ L da amostra contendo a lectina em todos os tubos que permaneceram em estufa a 37°C por 30 minutos. Após este período, foram adicionados 200 μ L de uma suspensão de eritrócitos de coelho nativas a 3%. Esta mistura foi deixada em estufa a 37°C por 30 minutos, seguidos de outros 30 minutos a temperatura de 25°C e os resultados foram lidos macroscopicamente.

Foram testados 14 açúcares simples, a saber: D-glicose, D-frutose, D-trehalose, D-manose, D-fucose, D-arabinose, L-sorbose, α -lactose, sacarose, xilose, maltose, galactose, N-acetil-D-glicosamina, metil- α -D-glicopiranosídeo.

A especificidade da lectina foi determinada analisando-se quais açúcares inibiram a AH e os resultados foram expressos com base na concentração inibitória mínima (CIM) do açúcar que foi capaz de inibir a hemaglutinação.

O branco do extrato foi considerado como controle positivo por conter 100 μ L de NaCl 0,15 M + 100 μ L da amostra + 200 μ L de sangue de coelho a 3%. O controle negativo (branco do açúcar) utilizado constou de 100 μ L de NaCl 0,15 M + 100 μ L do açúcar + 200 μ L

de suspensão de eritrócitos de coelho nativos a 3%. O branco do sangue foi constituído de 100 μ L de NaCl 0,15M + 100 μ L de sangue a 3%.

3.2.7 Fracionamento salino por sulfato de amônio

O extrato bruto obtido da farinha da folha de cenoura, tendo como solução de extração o NaCl 0,15 M (1:10, m/v) em um tempo de extração de 3 horas, foi submetido ao processo de precipitação. O sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi usado como agente precipitante. Ao extrato protéico adicionou-se sulfato de amônio sólido, empregando-se 3 faixas de concentração: 0-30% (m/m), 30-60% (m/m), 60-90% (m/m), que, para atingir essa saturação, a quantidade de sulfato de amônio adicionada foi de 16,4g/100 mL, 18,1g/100 mL e 20,1g/100 mL, respectivamente, conforme metodologia descrita por Scopes (1994).

Durante cada uma das etapas de adição de sal, o extrato protéico foi mantido sob agitação magnética e, em seguida, a suspensão foi colocada em repouso, à temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 5.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Os precipitados resultantes de cada intervalo de saturação foi dialisado exaustivamente contra água destilada (8 trocas diárias, durante 48 horas) para a retirada do sulfato de amônio. Em seguida, a amostra foi congelada e liofilizada.

As frações obtidas foram diluídas na proporção de 1mg para 1 mL da solução de extração sendo submetida ao ensaio de hemaglutinação, dosagem de proteínas, atividade hemolítica, atividade microbiológica e cromatografia de afinidade.

3.2.8 Determinação do teor de proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis presentes nos diferentes extratos protéicos e na fração ativa (0-80) foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976). A concentração de proteína foi avaliada utilizando a BSA como padrão (Figura 6). As amostras foram submetidas a extração, na proporção (1:10) com os seguintes tampões: Glicina-HCl 0,1 M pH 2,6, Acetato de Sódio pH 4,0, Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, Glicina-NaOH 0,1 M pH 9,0

(todos com NaCl 0,15 M), NaCl 0,15 M e NaCl 0,5 M, com agitação a 100 rpm durante 3 h em temperatura ambiente. Depois, cada suspensão foi centrifugada a 5000 rpm, por 20 min a 4 °C e os sobrenadantes (extrato bruto) foram utilizados para análise.

O método consiste de 100 µL da amostra, mais 2,5 mL de reagente de Bradford. Após a agitação e repouso por 10 minutos à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro.

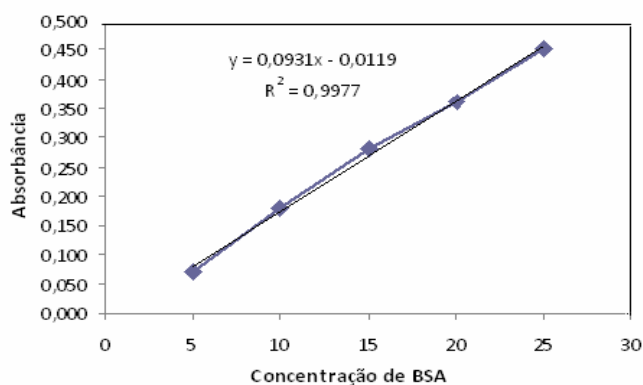


Figura 6 - Curva de calibração de Bradford: concentração de albumina sérica bovina em µg/mL versus absorbância (595 nm).

3.2.9 Caracterização físico-química

3.2.9.1 Teste de termoestabilidade

O efeito da temperatura sobre AH da lectina de *D. carota* foi analisado utilizando-se o extrato bruto o qual foi aquecido em Banho-Maria com temperaturas que variaram de 40 a 100° C por cerca de 10 minutos.

A cada 10°C de variação foi retirado uma alíquota de 100 µL que foi resfriada e, em seguida, adicionada em 100 µL de NaCl 0,15 M e igual volume de uma suspensão de eritrócitos de coelhos a 3% (100 µL). Em seguida, foi incubada por 30 minutos em estufa a 37°C, sendo a amostra testada em diluição seriada e em duplicata.

3.2.9.2 Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante

A influência do pH sobre a AH da lectina foi realizado da seguinte maneira: inicialmente o extrato bruto (pH 6,08) foi separado em dois beckeres, no primeiro acrescentou-se HCl 1M e no outro NaOH 1M. Após a variação de uma unidade de pH foi retirada uma alíquota de 100 µL e realizada a AH em diluição seriada. O extrato foi testado em duplicata para cada valor de pH, que variou de 2,08 a 13,08.

3.2.9.3 Efeito de enzimas proteolíticas

A estabilidade da lectina frente a enzimas proteolíticas foi determinada pela AH, tomando por base Coelho (2002).

A resistência da lectina de *D. carota* à hidrólise enzimática foi realizada utilizando a fração 0-80. 1 mg desta fração foi diluída em um volume de 900 µL de NaCl 0,15M e em seguida foi adicionado 100 µL das enzimas tripsina, papaína e bromelaína (500µg/mL). Esta mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. Logo após, realizou-se o teste de hemaglutinação com eritrócitos nativos de coelho a 3% e analisado com relação à inibição da AH da lectina.

Foram feitos os controles das enzimas (100 µL da solução de tripsina, papaína ou bromelaína, 100 µL de salina e 100 µL de eritrócitos a 3%), do sangue (100 µL de salina e 100 µL de eritrócitos a 3%) e da hemaglutinação (100 µL da lectina sem tratamento, 100 µL de salina e 100 µL de eritrócitos).

3.2.9.4 Efeito de agentes quelantes e de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+})

A dependência de cátions divalentes sobre a atividade de lectina de *D. carota*, especificamente Ca^{2+} e Mn^{2+} , foi determinada pela AH, por dupla diluição serial, usando EDTA como agente quelante, conforme Coelho (2002) e Pajic et al. (2002) citados por Zanetti (2007).

A lectina foi diluída em EDTA 250 mM (em NaCl 0,15 M) na concentração de 1 mg/mL e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado cloreto de cálcio (CaCl_2) ou sulfato de manganês (MnSO_4), na concentração final de 40 mM, com nova incubação de 30 minutos a 25°C. As amostras assim tratadas foram diluídas serialmente em NaCl 0,15M, quando então os eritrócitos nativos de coelho a 3% foram acrescentados. Paralelamente, a atividade da lectina foi determinada após incubação com EDTA 250 mM, e ainda após incubação com os cátions divalentes sem tratamento prévio com EDTA. Como controle foi utilizado somente solução da lectina sem os íons e o agente quelante (PAJIC et al., 2002 apud ZANETTI, 2007).

3.2.9.5 Estabilidade a agentes redutores e desnaturantes

O efeito de agente redutor (β -mercaptoetanol) e desnaturante (uréia) sobre a AH da lectina de *D. carota* foi realizado segundo metodologia descrita por Coelho (2002) com modificações.

A lectina (1mg) foi diluída em 1mL de β -mercaptoetanol 10 mM (em NaCl 0,15M) e incubados por 30 minutos a 37°C. Logo após, realizou-se o teste de hemaglutinação com essa mistura em diluição seriada como nos ensaios descritos acima. Foram feitos os controles de hemaglutinação (lectina sem tratamento, salina e hemácia), da solução de β -mercaptoetanol (100 μL da solução de β -mercaptoetanol, 100 μL de salina e 100 μL de eritrócitos a 3%) e do sangue (100 μL de salina e 100 μL de eritrócitos a 3%).

Uma alíquota de lectina de *D. carota* (1mg) foi diluída em 1mL de uréia 8 M (em NaCl 0,15M) e incubadas em dois tempos diferentes: 30 minutos e overnight a 25°C. Os ensaios de hemaglutinação procederam-se conforme protocolo já mencionado. Foram feitos os controles de hemaglutinação (lectina sem tratamento, salina e eritrócitos), da solução de uréia (100 μL da solução de uréia 8 M, 100 μL de salina e 100 μL de eritrócitos a 3 %) e do sangue (100 μL de salina e 100 μL de eritrócitos a 3%).

Os ensaios foram realizados pelo método de dupla diluição seriada (lectina + uréia) e o resultado foi avaliado com relação à inibição da AH da lectina.

3.2.9.6 Estabilidade a agentes oxidantes

Uma alíquota de lectina de *D. carota* (1mg) foi preparada e diluída em 1mL de metaperiodato de sódio (NaIO₄) 10 mM (em tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,5) e em seguida, incubada em temperatura ambiente desprovido de luz por 10 minutos. Logo após, a amostra juntamente com seu controle (somente NaIO₄) foram dialisados contra NaCl 0,15M por 16 horas. Após esse período, o ensaio de hemaglutinação foi realizado em duplicata e analisado conforme a atuação do agente oxidante sobre o efeito da lectina.

3.2.10 Determinação do teor de taninos totais

Os taninos totais foram determinados espectrofotometricamente pelo método colorimétrico segundo técnica recomendada por Ranganna (1977). Os teores de taninos totais foram determinados nas folhas de cenoura fresca, branqueada, cozida e liofilizada (farinha).

O processo de extração empregado foi a fervura das amostras por 30 minutos em água destilada, onde uma amostra de 5 g das folhas foi diluída para um volume final de 500 mL com água. Em seguida, a suspensão foi filtrada e deste filtrado, foram retiradas alíquotas que variaram de 1 a 20 mL, dependendo do tratamento das folhas, de modo que o valor da absorbância ficasse dentro da curva padrão de ácido tânico (Figura 7).

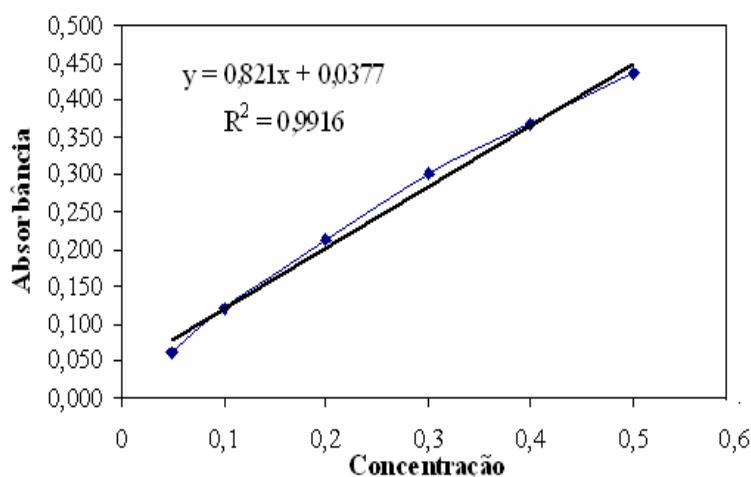


Figura 7 - Curva de calibração de taninos totais: concentração de ácido tânico em mg/mL versus absorbância (760 nm).

Para a folha fresca, branqueada, cozida e liofilizada utilizou-se 4, 8, 20 e 1 mL do filtrado, respectivamente. A estas alíquotas, contendo 25 mL de água destilada adicionaram-se 2,5 mL do reagente de Follin-Denis, 5 mL da solução de carbonato de sódio (35%), e o volume completado para 50 mL com água destilada. A solução resultante foi agitada e depois deixada em repouso por 30 minutos. Após esse período, a absorbância foi medida a 760 nm e um branco foi utilizado na ausência da solução padrão de ácido tânico.

O mesmo procedimento foi adotado para as soluções-padrão de ácido tânico diluído em água destilada (50 mg/500 mL), nas seguintes concentrações: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL, onde foi construída a curva de calibração analítica, utilizada em seguida para o cálculo dos teores de taninos totais nas amostras estudadas. Foi realizado em triplicata em espectrofotômetro Ultrospec 1100 pro.

3.2.11 Detecção de saponinas por hemólise

Foi pesado 6 g de ágar e dissolvido em 200 ml de solução fisiológica a 60°C. A solução foi tamponada com fosfato bibásico 25 mM pH 7,4. Da solução de ágar foi retirado 5 mL a qual foi colocada em uma placa de Petri e adicionado 0,5 mL de eritrócitos de coelhos a 10%, que, após a homogeneização foi colocado em temperatura ambiente para solidificar. Após a solidificação, foi adicionado 200 µL do extrato proveniente dos quatro tratamentos das folhas nos poços previamente feitos na solução gelatinosa. O resultado positivo foi verificado após 30 min por meio da evidência do halo hemolítico. Como controle foi utilizado a fração de sementes de *Luffa operculata* que apresentou o halo hemolítico.

3.2.12 Purificação parcial de proteínas

Os extratos obtidos da farinha das folhas de cenoura e a fração 0-80 que continham a lectina foram submetidos à cromatografia de afinidade (determinada previamente por meio da especificidade por açúcares).

3.2.12.1 Cromatografia de afinidade

Por meio da propriedade de reconhecimento a carboidratos, as lectinas podem ser purificadas por cromatografia de afinidade. Estas proteínas podem ser adsorvidas especificamente e com alta afinidade a molécula ligante imobilizada em suportes inorgânicos ou polissacarídeos insolúveis. A dessorção da lectina da matriz de afinidade pode ser efetuada biosseletivamente, usando um carboidrato como competidor, ou por mudanças de pH ou de força iônica (Figura 8). As matrizes de afinidade são escolhidas de acordo com a especificidade da lectinas a carboidratos.

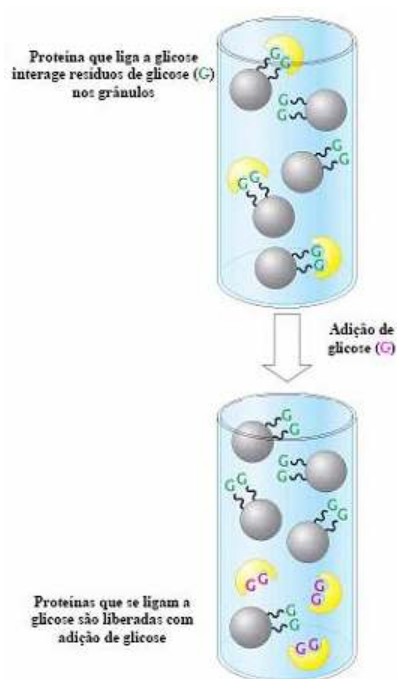


Figura 8 - Cromatografia de afinidade. Stryer et al., 2002 citados por Santos (2007).

Cromatografia de afinidade em gel de estroma-poliacrilamida

O extrato protéico foi passado em coluna cromatográfica de afinidade de estroma-poliacrilamida com um volume de coluna de 8,6 mL. A matriz foi preparada a partir de

eritrócitos de coelho e os estromas incorporados em gel de poliacrilamida, conforme Betail et al. (1975) citados por Zanetti (2007).

Na obtenção dos estromas, o sangue de coelho foi lavado com NaCl 0,15 M, conforme item 3.4.2.1. Em um erlenmeyer, os eritrócitos foram adicionados a uma solução aquosa de ácido acético 0,0004%, na proporção de 2:8 (v/v) e incubados por 18 horas, a 4°C sob lenta agitação. O material foi centrifugado a 3.000 rpm, por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi lavado sequencialmente com ácido acético 1 mM, pH 5,0, fosfato de sódio a 0,013 M em NaCl 0,15 M pH 7,2 e NaCl a 0,9%. Após a lavagem, o material suspenso em 8 mL de NaCl 0,9% foi incubado a 100°C por 1 hora.

Para a preparação da matriz cromatográfica, os estromas foram homogeneizados em solução contendo acrilamida a 14,2%, bis-acrilamida a 0,76%, APS a 0,90% e Tetrametil-etilenodiamina (TEMED) a 0,90%, na proporção de 2:5 (v/v). Após polimerização, o gel obtido foi passado numa peneira, para a formação da matriz cromatográfica.

No processo cromatográfico a coluna de estroma-poliacrilamida foi lavada sequencialmente com água destilada, tampão Glicina-NaOH 0,1M com NaCl 0,15 M pH 9,0 e água destilada e equilibrada com NaCl 0,15 M. Após aplicação da amostra protéica na coluna, a mesma permaneceu em contato com a matriz de afinidade por 3 horas. A fração protéica não retida (pico I) foi eluída com a mesma solução de equilíbrio e o material retido na matriz (pico II) foi eluído com tampão Glicina-NaOH com NaCl 0,15 M pH 9,0. Todas as trocas de soluções respeitaram a obtenção de absorbância menor que 0,050, medidas a 280 nm.

A fração ativa eluída da coluna, foi submetida a um processo de diálise contra água destilada sob agitação constante. O dialisado foi liofilizado e o material resultante foi acondicionado em eppendorfes e submetido aos ensaios de hemagutinação e à análise em PAGE-SDS.

3.2.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol

Para avaliar o grau de pureza e a estimativa da massa molecular da amostra, referente à lectina, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (presença de SDS) e redutoras (presença de β -mercaptoetanol), utilizando padrões de massa molecular conhecida.

A eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas sob condições não desnaturantes é utilizada para analisar a pureza de estruturas moleculares nativas (SANTOS, 2007).

Esses experimentos foram realizados seguindo a técnica descrita por Laemmli (1970).

O gel de separação das proteínas foi composto por duas concentrações: um gel de concentração a 3,5% e um gel de separação, constituído de 12,5% de poliacrilamida.

Os reagentes para a confecção dos geis e os respectivos volumes utilizados estão escritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Reagentes para a confecção do gel de concentração e de separação da eletroforese.

Gel	%	Reagentes	Volume (mL)
SDS-PAGE (concentração)	3,5	Água destilada	2,82
		Acrilamida-Bis (30:0,8%)	0,625
		Tris-HCL (0,5 M pH 6,8)	1,25
		SDS 10%	0,049
		Persulfato de amônio a 1,5%	0,25
		TEMED	0,004
SDS-PAGE (separação)	12,5	Água destilada	1,99
		Acrilamida-Bis (30:0,8%)	2,08
		Tris-HCL (3 M pH 8,8)	0,625
		SDS 10%	0,050
		Persulfato de amônio a 1,5%	0,250
		TEMED	0,0025

As amostras liofilizadas oriundas das frações protéicas e dos picos cromatográficos foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS a 2%, glicerol a 10% e β -mercaptoetanol 5%, a uma concentração protéica final de 4 mg/mL. Em seguida, foram aquecidas em estufa a 100°C durante 10 minutos, centrifugadas por 5 minutos, e em seguida adicionado 10 μ L de azul de bromofenol 0,0002%.

Alíquotas de 10 μ L da amostra foram aplicadas em poços presentes no gel de concentração. A corrida eletroforética foi realizada a uma variação de voltagem até 200 V de potência sob amperagem constante (25 mA), a 15 W por um período aproximado de 3 horas. O tampão de corrida foi constituído de solução tampão Tris-HCl 0,25 M, pH 8,3, contendo

glicina 1,92 M e SDS a 1%. Ao final da corrida, o gel foi retirado da placa, fixado em TCA 10% por 10 minutos e as bandas protéicas obtidas foram reveladas mediante coramento com uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25g) dissolvido em ácido acético glacial, metanol e água na proporção de (10: 45: 45; v/v/v) por 3 horas. A remoção do excesso de corante do gel foi removido com a solução descorante de ácido acético glacial, metanol e água (10: 45: 45; v/v/v).

Para estimar o peso molecular da proteína isolada, foram utilizados padrões de proteínas conhecidas, como: miosina (212 (kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina de soja (21,4/19,7 kDa), lisozima (14,4 kDa).

3.2.14 Detecção da proteína por nitrato de prata

Após a eletroforese, as bandas protéicas foram visualizadas por revelação com nitrato de prata (BLUM et al., 1987).

O gel foi desidratado gradativamente, por três lavagens consecutivas com álcool a 50%, tendo cada lavagem duração de 20 minutos. Logo após, uma solução de tiosulfato de sódio (20 mg/100 ml de água destilada) foi adicionada e mantida em agitação por 1 minuto, realizando-se posteriormente três lavagens rápidas com água destilada. Após esse procedimento, foi adicionado em seguida, uma solução de nitrato de prata (200 mg + 74 μ L de formaldeído em 100 mL de água destilada), agitando-se suavemente por 20 minutos para a coloração do gel.

O gel foi lavado novamente três vezes em água destilada e adicionada a solução reveladora (6 g de carbonato de sódio + 50 μ L de formaldeído + 2 mL de tiosulfato de sódio para um total de 100 mL de água destilada).

Após a revelação das bandas, a reação foi interrompida com adição de ácido acético glacial 99,6%. O gel foi mantido em água destilada até ser fotografado.

3.2.15 Ensaio da atividade antibacteriana da fração protéica

3.2.15.1 Microrganismos utilizados

Para o ensaio da atividade antibacteriana foram usadas cepas de bactérias da Coleção Americana de Tipos de Cultura (ATCC) e da Coleção de Cultura Tropical (CCT). Os microrganismos utilizados para análise antibacteriana estão listados na Tabela 2 com os respectivos números de registros.

Tabela 2 - Bactérias utilizadas para o teste de atividade antibacteriana da fração protéica e seus respectivos números de registros.

Bactérias	Número do registro
<i>Bacillus subtilis</i>	CCT 0516
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 2536
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25619
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213

3.2.15.2 Preparo do meio de cultura Luria-Bertani e do inóculo bacteriano

Os testes contra as bactérias foram realizados em meio de cultura líquido Luria Bertani (LB). O meio LB líquido foi preparado misturando 10 g de Triptona, 5 g de Extrato de levedura e 10 g de NaCl, em 1 litro de água destilada. Estoques do meio foram autoclavados e guardados a temperatura de 25°C até o momento do uso.

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de uma cultura crescida durante a noite, aproximadamente 18 horas, e ajustado com uso de espectrofotômetro para a escala 0,5 de Mac Farland, a qual corresponde a 1×10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

2.2.15.3 Método de microdiluição

Para a avaliação da atividade antibacteriana das frações obtidas das folhas de *D.carota*, foi utilizado o método de microdiluição. Este método foi validado em 1992 e constitui uma técnica que emprega uma diluição sucessiva do extrato obtido da fração protéica, por meio dos seguintes procedimentos:

1) Inicialmente foi colocado, assepticamente, 2 mL de meio LB esterilizado (autoclavado a 121°C por 20 minutos) em todos os tubos de uma série de 10 tubos para cada bactéria testada.

2) Em seguida, foi adicionado nos tubos, em condições assépticas e utilizando-se ponteiros estéreis, dez concentrações da fração protéica (1,9; 3,9; 7,7; 15,5; 31; 62; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL).

3) Assepticamente, foi inoculado em cada tubo 10 µL das bactérias, padronizadas de acordo com o padrão Macfarland (JONES et al., 1985), e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

Depois deste período, foi analisada visualmente e/ou espectrofotometricamente quanto ao crescimento microbiano, através da turvação do meio de cultura (KOLODZIEJ et al., 1999). A diluição que não apresentar turvação indica a concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo teste, indicando que o composto foi bactericida (PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1997).

3.2.16 Ensaio da atividade antifúngica da fração protéica

3.2.16.1 Microrganismos testes

Os microrganismos usados para o ensaio da atividade antifúngica pertencem a Micoteca do Laboratório de Micologia da UFPB. Todos os fungos foram mantidos em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) a uma temperatura de 25°C. O meio SDA foi preparado misturando 40 g de glicose, 10 g de peptona e 20 g de ágar, em 1 litro de água destilada Na

Tabela 3, encontram-se os fungos utilizados no ensaio e os respectivos números de registros na Micoteca.

Tabela 3 - Fungos utilizados para o teste de atividade antifúngica e seus respectivos números de registros na Micoteca.

Microrganismo	Número do registro
<i>Microsporum canis</i>	LM 62
<i>Microsporum gypseum</i>	LM 100
<i>Trichopyton mentagrophytes</i>	LM 08
<i>Trichopyton rubrum</i>	ATCC 1683

3.2.16.2 Preparo e padronização do inóculo

O inóculo fúngico foi preparado a partir da adição de NaCl 0,15 M à culturas de dermatófitos em Caldo Sabouraud Dextrose (SDB), sob agitação por 20 minutos. O SDB foi preparado misturando 40 g de glicose e 10 g de peptona em 1 litro de água destilada. A padronização do inóculo foi realizada em câmara de Neubauer com concentração de $1-5 \times 10^8$ esporos/mL.

3.2.16.3 Método de difusão em disco

O teste de atividade antifúngica foi realizado segundo Bauer et al. (1966) citados por Silva (2004). Foram preparadas suspensões de $1-5 \times 10^4$ de esporos (tubo 0,5 da escala de Mac Farland) preparada em solução salina a 0,9% e contados em câmara de Neubauer com o uso de microscópio. Posteriormente, foram inoculados com *swab* em placas de Petri contendo SDA. Após o desenvolvimento do fungo, cada placa recebeu 5 discos de papel de filtro ($\varnothing=4\text{mm}$) esterilizados (121°C , por 20min), sendo o disco central o controle negativo (NaCl 0,15 M) distribuídos a 2,5 cm do centro da placa de Petri de maneira equidistante e

umedecido (20 µL/disco de papel) com a fração protéica na concentração de 10, 20, 40 e 80 µg/mL.

O desenvolvimento do parasita foi acompanhado e fotografado periodicamente. As placas foram incubadas a uma temperatura de 35°C. Os resultados foram avaliados de acordo com a formação de halos de inibição do crescimento microbiano em milímetros em torno dos discos após 7 dias. Todo o procedimento de preparo do ensaio foi realizado em condições estéreis em capela de fluxo laminar. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados expressos em média aritmética.

3.2.16.4 Método de microdiluição

A determinação da CIM para os dermatófitos foi realizada pelo método de microdiluição segundo a metodologia descrita por Lorian (1986) citado por Silva (2004) e de acordo com as normas do protocolo do Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínico (NCCLS) (M27-A2). Para este teste, foram utilizadas microplacas com 96 poços e suspensões com $1-5 \times 10^4$ esporos utilizando o SDB. Em cada poço foi colocado 100 µL de SDB, 100 µL da fração protéica (0-80) em diluição seriada + 100 µL do inóculo.

Foram feito dois controles: o primeiro (+) foi representado pelo meio de cultura mais os dermatófitos (100 µL de SDB + 100 µL de NaCl 0,15 M em diluição seriada + 100 µL do inóculo) e o segundo (-) pelo meio de cultura e o solvente, sem as amostras testadas (100 µL de SDB + 100 µL de NaCl 0,15 M em diluição seriada). As microplacas foram incubadas a uma temperatura de 37°C e foram realizadas leituras após 48 horas por meio da visualização macroscópica.

3.2.17 Avaliação da atividade hemolítica

A avaliação da citotoxicidade por meio da atividade hemolítica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rangel et al. (1997).

Sangue humano do sistema ABO foi lavado conforme protocolo descrito anteriormente, entretanto, nesse experimento, utilizou-se eritrócitos nativos a 0,5%.

A fração lectínica e as folhas submetidas aos quatro tratamentos foram diluídas em NaCl 0,15 M na concentração de 10 mg/mL. As amostras foram adicionadas, em preparações diferentes nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ à amostras de 2 mL de uma suspensão de eritrócitos. As amostras assim tratadas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 h a 100 rpm sob agitação constante. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria a um comprimento de onda de 540 nm para quantificar a atividade hemolítica.

A hemólise total foi obtida com Triton X-100, como agente do controle positivo para efeito de comparação da atividade citotóxica da lectina testada. Em caso de hemólise, a porcentagem de hemólise foi calculada em relação a esse valor.

3.2.18 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média aritmética $\pm$ desvio-padrão e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” de Student (pareado ou não pareado) ou análise de variância “one-way” (ANOVA) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Todos os resultados funcionais foram analisados pelo software estatístico Assistat versão 7,5 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009).

REFERÊNCIAS

ALENCAR, V. B. M; ALENCAR, N. M. N; ASSREUY, A. M. S; MOTA, M. L; BRITO G. A. C; ARAGÃO, K. S; BITTENCOURT, F. S; PINTO, V. P. T; DEBRAY, H; RIBEIRO, R. A; CAVADA, B. S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Oxford, v.37, n.9, p.1805-1814, Sep. 2005a.

ALENCAR, N. M. N; CAVALCANTE, C. F.; VASCONCELOS, M. P; LEITE, K. B; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S; NOGUEIRA, N. A. P; VALE, M. R. Antiinflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 57, n. 7, p. 912-922, Jul. 2005b.

ALI, N. M. M; TINAY, A. H. E; ELKHALIFA, A. E. O; SALIH, O. A; YOUSIF, N. E. Effect of alkaline pretreatment and cooking on protein fractions of a high-tannin sorghum cultivar. **Food Chemistry**, Barking, v.114, n.2, p.646-648, May. 2009.

ALMEIDA, S. R. **Apostila de Micologia Clínica**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 2006. 55p.

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

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 15thed. Washington, 1990.

ARAÚJO, A. H; CARDOSO, P. C. B; PEREIRA R. A; LIMA, L. M; OLIVEIRA, A. S; MIRANDA, M. R. A; XAVIER-FILHO, J; SALES, M. P. *In vitro* digestibility of globulins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and xerophytic algaroba (*Prosopis juliflora*) seeds by mammalian digestive proteinases: a comparative study. **Food Chemistry**, Barking, v.78, n.2, p.143-147, Aug. 2002.

ASSREUY, A. M. S, SHIBUYA, M. D; MARTINS, G. J; SOUSA, M. L. P; CAVADA, B. S; MOREIRA, R. A; OLIVEIRA, J. T. A; RIBEIRO, R. A; FLORES, C. A. Antiinflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, v.6, n.3, p.201-210, Jun. 1997.

BATISTA, H. L. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais de plantas do estado do Tocantins**. 2008. 152f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Clínica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

BITENCOURT, F. S; FIGUEIREDO, J. G; MOTA, M. R. L; BEZERRA, C. C. R; SILVESTRE, P. P; VALE, M. R; NASCIMENTO, K. S; SAMPAIO, A. H; NAGANO, C. S; SAKER-SAMPAIO, S; FARIAS, W. R. L; CAVADA, B. S; ASSREUY, A. M. S; ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlin, v.377, n.2, p.139-148, Apr. 2008.

BLUM, H; BEIER, H; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v.8, n.2, p.93-99, 1987.

BOLETI, A. P. A. **Isolamento, caracterização físico-química e estudo da atividade inseticida e fungicida da lectina de sementes de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk.** 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BORSOI, M. A. **Nutrição e dietética**: noções básicas. São Paulo: SENAC, 79, 2001.

BRADFORD, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, n.1, p.248-254, 1976.

BROEKAERT, W. F; VAN PARIJS, J; LEYNS, F; JOOS, H; PEUMANS, W. J. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. **Science**, Washington, v.245, n.4922, p.1100-1102, Sep. 1989.

BRUM, A. A. S. **Fatores antinutricionais**, 2008. Disponível em: <www.farmabio.k6.com.br>. Acesso em: 08 jun. 2009.

BUSCH, E; LELLEY, J. I. Agglutination of yeast cells by fungal lectins as a part of a quality control for ectomycorrhizal fungi. **Journal of Applied Botany/Angewandte Botanik**, v.74, n.1-2, p.83-86, 2000.

CAMPOS, F. M; PINHEIRO-SANTANA, H. M; SOUZA, P. M; STRINGHETA, P. C; CHAVES, J. B. P. Pró-vitaminas A em hortaliças comercializadas no mercado formal e informal de Viçosa (MG), em três estações do ano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, p.33-40, jan./mar. 2006.

CARRILO-MUÑOZ, A. J; BRIÓ, S; QUINDÓS, G. A new generation of antifungal drugs. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v.18, n.1, p.2-5, Mar. 2001.

CAVADA, B. S; BARBOSA, T; ARRUDA, S; GRANGEIRO, T. B; BARRAL-NETTO M. Revisiting *proteus*: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein & Peptide Science**, Hilversum, v.2, n.2, p.123-135, Jun. 2001.

CHUNG, K. T; WONG, T. Y; WEI, C. I; HUANG, Y. W; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.38, n.6, p. 421-464, Aug. 1998.

COELHO, M. B. **Estudo da atividade inseticida e pró-inflamatória da lectina isolada de sementes de *Annona coriacea* Mart.** 90f. 2006. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

COMINETTI, C; COZZOLINO, S. M. F. Recomendações de nutrientes. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3.ed. Barueri-SP: Manole, 2009. cap. 2, p.12-45.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Riverside, v.55, n.3, p.261-273, Dec. 1995.

CORRÊA, A. D; SANTOS, S. R; ABREU, C. M. P; JOKL, L; SANTOS, C. D. 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.

CRUZ, G. A. D. R; OLIVEIRA, M. G. A; PIRIS, C. V; PILON, A. M; CRUZ, R. S; BRUMANO, M. H. N; MOREIRA, M. A. Avaliação da digestibilidade protéica, inibidor de proteases e fibras alimentares de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.7, n.2, p.103-109, jul./dez. 2004.

DAMICO, D. C. S. **Purificação, propriedades físico-químicas e estudo das atividades inseticida, fungicida e citotóxica de uma lectina presente em sementes de *Koeleria paniculata*.** 2002. 105f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

DENADAI, S. M. S. **Estudo nutricional *in vivo* e *in vitro*, com ênfase em proteínas antinutricionais e tóxicas de amêndoas de sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.).** 2006. 148f.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

DUBOIS, M; GILLES, K. A; HAMILTON, J. K; REBERS, P. A; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

FAO/WHO. **Protein quality evaluation**: report of a joint FAO/WHO expert conslaion held in Bethsda, MD, USA, 1991.

FIGUEIREDO, I. S. T. **Avaliação do efeito da lectina de *Cratylia floribunda* Benth em feridas cutâneas experimentais**. 2008. 111f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

FIGUEIREDO, J. G; BITENCOURT, F. S; BESERRA, I. G; TEIXEIRA, C. S; LUZ, P. B; BEZERRA, E. H. S; MOTA, M. R. L; ASSREUY, A. M. S; CUNHA, F. Q; CAVADA, B. S; ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlin, v.380, n.5, p.407-414, Nov. 2009.

FRANCIS, G; KEREM, Z; MAKKAR, H. P; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, London, v.88, n.6, p.587-605, Dec. 2002.

FREIRE, M. G. M. **Isolamento, caracterização físico-química e estudo das atividades inseticida, microbicida e inflamatória da lectina isolada de sementes de *Talisia esculenta* (St Hil) Radlk**. 2003. 212f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

GABIUS, H. J; ANDRE, S; KALTNER, H; SIEBERT, H. C. The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects**, Amsterdam, v.1572, n.2-3, p.165-177, Sep. 2002.

GADELHA, C. A. A; MORENO, F. B. M. B; SANTI-GADELHA, T; CAJAZEIRAS, J. B; ROCHA, B. A. M; ASSREUY, A. M. S; MOTA, M. R. L; PINTO, N. V; MEIRELES, A. V. P; BORGES, J. C; FREITAS, B. T; CANDURI, F; SOUZA, E. P; DELATORRE, P; CRIDDLE, D. N; AZEVEDO JÚNIOR, W. F; CAVADA, B. S. Native Crystal Structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal of Structural Biology**, Orlando, v.152, n.3, p.185-194, Dec. 2005.

GAIDAMASHVILI, M; VAN STADEN, J. Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.80, n.2-3, p. 131-135, May. 2002.

GALLAGHER, M. L. Vitaminas. In: MAHAN, L. K; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 11.ed. São Paulo: Roca, 2005. cap.4, p.72-114.

GALIOTTI, H. Los taninos enológicos: revisión. **Revista Enologia**, Mendoza, v. 3, n.6, p. 28-34, 2007. Parte 1.

GILANI, G. S; COCKELL, K. A; SEPEHR, E. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.88, n.3, p.967-987, May./Jun. 2005.

GRAHAMSTOWN, M; VAN STADEN, J. Lectin-like proteins from South African plant species used in traditional medicine. **South African Journal of Botany**, v.68, n.1, p.36-40, 2002.

GUPTA, A. K; LYNDE, C. W; LAUZON, G. J; MEHLMAUER, M. A; BRADDOCK, S. W; MILLER, C. A; DEL ROSSO, J. Q; SHEAR, N. H. Cutaneous adverse effects associated with terbinafine therapy: 10 case reports and a review of the literature. **British Journal of Dermatology**, v.138, n.3, p.529-532, Mar. 1998.

GURGEL, L. A. **Estudo das atividades antifúngica, antiinflamatória intestinal e antinociceptiva visceral do látex do *Cróton urucurana* Baill.** 2005. 192f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

GUZMÁN-MALDONADO, S. H; ACOSTA-GALLEGOS, J; PAREDES-LÓPEZ, O. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v.80, n.13, p.1874-1881, Oct. 2000.

HASSAN, S. M; HAQ, A. U; BYRD, J. A; BERHOW, M. A; CARTWRIGHT, A. L; BAILEY, C. A. Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. **Food Chemistry**, Barking, v.119, n.2, p.600-605, Mar. 2010.

HIANE, P. A. **Estudo nutricional, com ênfase em proteínas antinutricionais e tóxicas, de amêndoas da bocaiúva, espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd., do Estado de Mato Grosso do Sul.** 2006. 88f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília,

Universidade Federal de Goiás, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

HOSENEY, R. C; VARRIANO-MARSTON, E; DENDY, D. A. V. Sorghum and millets. **Advances in Cereal Science and Technology**, Saint Paul, v.4, p.71-144, Sep./Oct. 1981.

JONES, R. N; BARRY, A. L; GAVAN, T. L; WASHINGTON II, J. A. Susceptibility tests: microdilution and macrodilution broth procedures. In: LENNETTE, E. H; BALOWS, A; HAUSLER, W. J. JR; SHADOMY, H. J. **Manual of clinical microbiology**. 4.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology. Washington, D.C, 1985. p.927-977.

KENNEDY, J. F; PALVA, P. M. G; CORELLA, M. T. S; CAVALCANTE, M. S. M; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, Great Yarmouth, v. 26, n.3, p. 219-230, 1995.

KHATTAB, R; GOLDBERG, E; LIN, L; THIYAM, U. Quantitative analysis and free-radical-scavenging activity of chlorophyll, phytic acid, and condensed tannins in canola. **Food Chemistry**, Barking, v.122, n.4, p.1266-1272, Oct. 2010.

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

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects**, Amsterdam, v.1572, n.2-3, p.187-197, Sep. 2002.

KOŁODZIEJ, H; KAYSER, O; LATTE, K. P; FERREIRA, D. Evaluation of the antimicrobial potency of tannin and related compounds using the microdilution broth method. **Planta Médica**, v.65, p. 444-446, 1999.

KORTING, H. C; SCHALLER, M. New developments in medical mycology. **Hautarzt**, Berlin, v.52, n.2, p.91-97, Feb. 2001.

KRUPA, U. Main nutritional and antinutritional compounds of bean seeds-a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.58, n.2, p.149-155, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t₄. **Nature**, London, v.227, n.5259, p.680-685, Aug. 1970.

LAJOLO, F. M; GENOVESE, M. I. Nutritional significance of lectins and enzymes inhibitors from legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v.50, n.22, p.6592-6598, Oct. 2002.

LEITE, J. F. M; SILVA, J. A; SANTI-GADELHA, T; GADELHA, C. A. A; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. Nutritional value and antinutritional factors of foliaceous vegetable *Talinum fruticosum*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.68, n.3, p.341-345, set./dez. 2009.

LEVINSON, W; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 632p.

LIS, H; SHARON, N. Soybean (*Glycine max*) agglutinin. **Methods in Enzimology**, v.28, p.360-368, 1972.

LIS, H; SHARON, N. Lectins: carbohydrates specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, Washington, v.98, n.2, p.637-674, Apr. 1998.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica Et Biophysica Acta – General Subjects**, Amsterdam, v.1572, n.2-3, p.198-208, Sep. 2002.

LU, Y; BENNICK, A. Interaction of tannin with human salivary praline-rich proteins. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v.43, n.9, p.717-728, Sep. 1998.

LUENGO, R. F. A; CALBO, A. G; LANA, M. M; MORETTI, C. L; HENZ, G. P. **Classificação de Hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1999. 61p.

MACIEL, E. V. M. **Determinação do efeito mitogênico das lectinas de *Cratylia mollis* sobre linfócitos humanos utilizando um método colorimétrico**. 2002. 54f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

MANFROI, V; RIZZON, L. A; GUERRA, C. C; FIALHO, F. B; DALL'AGNOL, I; FERRI, V. C; ROMBALDI, C. V. Influencia de taninos enológicos em diferentes dosagens e épocas distintas de aplicação nas características físico-químicas do vinho Cabernet Sauvignon. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, supl.1, p.127-135, maio. 2010.

MAROUELLI, W. A; OLIVEIRA, R. A; SILVA, W. L. C. **Irrigação da cultura da cenoura**. Brasília: Embrapa Hortaliças, Circular Técnica, 48, jan. 2007.

MARQUES, S. A; ROBLES, A. M; TORTORANO, A. M; TUCULET, M. A; NEGRONI, R; MENDES, R.P. Mycoses associated with AIDS in the third World. **Medical Mycology**, Oxford, v.38, supl.1, p.269-279, 2000.

MATSUI, T; HAMAKO, J; OZEKI, Y; TITANI, K. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochimica Et Biophysica Acta – General Subjects**, Amsterdam, v.1525, n.1-2, p.50-57, Feb. 2001.

MELGAREJO, L. M; VEGA, N; PÉREZ, G. Isolation and characterization of novel lectins from *Canavalia ensiformis* DC and *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth. seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.17, n.3, p.315-324, Jul./Sep. 2005.

MELO, C. M. L. **Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Cratylia mollis* em camundongos normais e imunodeprimidos experimentalmente**. 2007. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

MELO-JÚNIOR, M. R; CAVALCANTI, C. L. B; PONTES-FILHO, N. T; CARVALHO-JÚNIOR, L. B; BELTRÃO, E. I. C. Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter pylori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, n.2, p.238-240, Apr./Jun. 2008.

MERTENS, D. R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.80, n.7, p.1463-1481, Jul. 1997.

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, May. 1977.

MOREIRA, R. A; AINOUIZ, I. L. Isolectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.61, p.118, 1978.

MOREIRA, R. A; CASTELO-BRANCO, C. C; MONTEIRO, A. C. O; TAVARES, R. O; BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, New York, v.47, n.7, p. 1183-1188, Apr. 1998.

MOTA, M. R. L; CRIDDLE, D. N; ALENCAR, N. M. N; GOMES, R. C; MEIRELES, A. V P; SANTI-GADELHA, T; GADELHA, C. A. A; BENEVIDES, R. G; CAVADA, B. S; ASSREUY, A M. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlin, v.374, n.1, p. 1-10, Oct. 2006.

MURRAY, R. K; GRANNER, D. K; MAYES, P. A; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

NAVES, L. P; CORRÊA, A. D; SANTOS, C. D; ABREU, C. M. P. Componentes antinutricionais e digestibilidade protéica em sementes de abóbora (*Cucurbita máxima*) submetidas a diferentes processamentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, supl.1, p.180-184, maio. 2010.

NGAI, P. H. K; NG, T. B. A lectin with antifungal and mitogenic activities from red cluster pepper (*Capsicum frutescens*) seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.74, n.2, p.366-371, Feb. 2007.

NI, Y; TIZARD, I. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.55, n.1-3, p.205-223, Dec. 1996.

NUNES, B. S; RESONNET, N. S; DAL-SECCO, D; VIEIRA, S. M; CAVADA, B. S; TEIXEIRA, E. H; MOURA, T. R; TEIXEIRA, C. S; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T; CUNHA, F. Q; NAPIMOGA, M. H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlin, v.379, n.6, p.609-616, Jun. 2009.

OETTERER, M; D'ARCE M. A. B. R; SPOTO, M. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri-SP: Manole; 2006. 632p.

OLIVEIRA, J. T. A; VASCONCELOS, I. M; BEZERRA, L. C. N. M; SILVEIRA, S. B; MONTEIRO, A. C. O; MOREIRA, R. A. Composition and nutritional properties of seeds from *Pachira aquatica* Aubl, *Sterculia striata* St Hil et Naud and *Terminalia catappa* Linn. **Food Chemistry**, Barking, v.70, n.2, p.185-191, Aug. 2000.

OLIVEIRA, R. A; ROCHA, I. B; SEDIYAMA, G. C; PUIATTI, M; CECON, P. R; SILVEIRA, S. F. R. Coeficientes de cultura da cenoura nas condições edafoclimáticas do Alto Parnaíba, no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.7, n.2, p.280-284, 2003.

OSBORN, T. C; MANEN, J. F; BROWN, J. W. S; BLISS, F. A. Bean lectins IV: genetic variation in the non-denatured structure of lectins from different *Phaseolus vulgaris* L. cultivars. **Tag Theoretical and Applied Genetics**, v.67, n.6, p.547-552, 1984.

PANDO, L. A. **Caracterização físico-química e biológica de proteínas isoladas de sementes de leguminosas: Lectinas e Inibidores de proteinases**. 2001. 107f. Tese (Doutorado

em Biologia Funcional e Molecular Área de Bioquímica) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

PELCZAR JÚNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2.ed. São Paulo: Makron Books, v.1, p. 210-222, 1997.

PEREIRA, G. I. S; PEREIRA, R. G. F. A; BARCELOS, M. F. P; MORAIS, A. R. Avaliação química da folha de cenoura visando ao seu aproveitamento na alimentação humana. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.47, n.4, p.852-857, jul./ago. 2003.

PEREIRA, S. F. **Caracterização dos efeitos biológicos das lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e de *Canavalia ensiformes* (ConA) em preparações do sistema nervoso central e em células tumorais**. 2005. 111f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

PEREIRA, C. A; CORRÊA, A. D; SANTOS, C. D; ABREU, C. M. P; SOUSA, R. V; MAGALHÃES, M. M. Hemaglutinina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): purificação parcial e toxicidade. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.900-907, maio./jun. 2008.

PEUMANS, W. J; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, Rockville, v.109, n.2, p.347-352, Oct. 1995.

PEUMANS, W. J; VAN DAMME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.7, n.4, p.132-138, Abr. 1996.

PEUMANS, W. J; ZHANG, W; BARRE, A; ASTOUL, C. A; BALINTI-KURTI, P. J; ROVIRA, P; ROUGÉ, P; MAY, G. D; VAN LEUVEN, F; TRUFFA-BACHI, P; VAN DAMME, E. J. M. Fruit-specific lectins from banana and plantain. **Planta**, Berlin, v.221, n.6, p.546-554, Nov. 2000.

PINTO, N. A. V. D. CARVALHO, V. D; CORRÊA, A. D; RIOS, A. O. Avaliação de fatores antinutricionais das folhas da taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schoot). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.3, p.601-604, maio./jun. 2001.

PIRES, C. V. **Otimização de técnicas de determinação da digestibilidade *in vitro* para a substituição da digestibilidade *in vivo* no cálculo do escore químico corrigido pela digestibilidade protéica – PDCAAS**. 2005. 82f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

RAMOS-E-SILVA, M. Amorolfina. **Minha opinião**, São Paulo, v.1, n.1, p.1-2, 2000.

RANGANNA, S. **Manual of analysis of fruit and vegetables products**. New Delhi (Índia): Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, 1977. 634p.

RANGEL, M; MALPEZZI, E. L. A; SUSINI, S. M. M; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, Oxford, v.35, n.2, p. 305-309, Feb. 1997.

RANGEL, A; SARAIVA, K; SCHWENGBER, P; NARCISO, M. S; DOMONT, G. B. FERREIRA, S. T; PEDROSA, C. Biological evaluation of a protein isolated from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Food Chemistry**, Barking, v.87, n.4, p.491-499, Oct. 2004.

RATANAPO, S; NGAMJUNYAPORN, W; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. **Plant Science**, Limerick, v.160, n.4, p.739-744, Mar. 2001.

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

SALAZAR, J; VELÁSQUEZ, R; QUESADA, S; PICCINELI, A. L; RASTRELLI, L. Chemical composition and antinutritional factors of *Lycianthes synanthera* leaves (chomte). **Food Chemistry**, Barking, v.97, n.2, p.343-348, Jul. 2006.

SANTI-GADELHA, T. **Isolamento, purificação, caracterização e atividade biológica da lectina da fração das albuminas de sementes de *Acacia farnesiana* (L.) Willd.** 2005. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

SANTI-GADELHA, T; GADELHA, C. A. A; ARAGÃO, K. S; OLIVEIRA, C. C; MOTA, M. R. L; GOMES, R. C; PIRES, A. F; TOYAMA, M. H; TOYAMA, D. O; ALENCAR, N. M. N; ASSREUY, A. M. S; CAVADA, B. S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Ney York, v.350, n.4, p.1050-1055, Dec. 2006.

SANTOS, M. A. T. Efeito do cozimento sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócoli, couve-flor e couve. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.2, p.294-301, mar./abr. 2006.

SANTOS, A. F. S. **Moléculas bioativas de *Moringa oleifera*: detecção, isolamento e caracterização**. 2007. 112f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

SCOPES, R. K. **Protein purification**: principles and practices. 3.ed. New York: Springer Verlag, 1994. 380p.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington DC, v.67, n.7, p.2883-2894, Jul. 2001.

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

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações e modificações. São Paulo: Varela, 1996. 517p.

SHARON, N; LIS, H. Lectins. **Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-4, abr. 2001.

SHARON, N; LIS, H. History of lectins: from de hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, Oxford, v.14, n.11, p.53R-62R, Nov. 2004.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, n.1, p. 3-9, jan./abr. 2000.

SILVA, D. J; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa-MG: Editora UFV, 2002. 235p.

SILVA, M. R. O. **Detecção da atividade antifúngica de extratos de plantas do manguezal de Vila Velha, Itamaracá-PE**. 2002. 61f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

SILVA, M. C. **Caracterização parcial da lectina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

SILVA, F. O; ARAÚJO, R. V. S; SCHIRATO, G. V; TEIXEIRA, E. H; MELO JÚNIOR, M. R; CAVADA, B. S; LIMA-FILHO, J. L; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A; PORTO, A. L. F. Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina

isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1808-1814, set. 2009.

SILVA, F. A. S. E; AZEVEDO, C. A. V. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance**. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SITOHY, M; DOHEIM, M; DADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food Chemistry**, Barking, v.104, n.3, p.971-979, 2007.

SUN, H. X. Adjuvant effect of *Achyranthes bidentata* saponins on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice. **Vaccine**, Kidlington, v.24, n.17, p.3432-3439, Apr. 2006.

SUN, H. X; XIE, Y; YE, Y. P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, Kidlington, v. 27, n.12, p.1787-1796, Mar. 2009.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.33, n.3, p.281-301, maio./jun. 2000.

TIMBY, B. K; SMITH, N. E. **Enfermagem Médico-Cirúrgica**. 8.ed. Barueri-SP: Manole, 2005. 1256p.

TINJUANGJUN, P. Snowdrop lectin gene in transgenic plants: its potential for Asian agriculture. **AgBiotechNet**, Wallingford, v.4, p.1-5, Jul. 2002.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6.ed. São Paulo: Artmed, 2000. 827p.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8.ed. São Paulo: Artmed, 2005. 894p.

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, Nov./Dec. 1998.

VAN DAMME, E. J. M; LANNOO, N; PEUMANS, W. J. Chapter 3 Plant Lectins. **Advances in Botanical Research**, v.48, p.107-209, 2008.

VAN PARIJS, J; BROEKAERT, W. F; GOLDSTEIN, I. J; PEUMANS, W. J Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, Berlin, v.183, n.2, p.258-264, Jan. 1991.

VASCONCELOS, I. M; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, Oxford, v.44, n.4, p.385-403, Sep. 2004.

VAZ, A. F. M; COSTA, R. M. P. B; MELO, A. M. M. A; OLIVA, M. L. V; SANTANA, L. A; SILVA-LUCCA, R. A; COELHO, L. C. B. B; CORREIA, M. T. S. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry**, Barking, v.119, n.4, p.1507-1513, Apr. 2010.

WALLACE, P. A; MARFO, E. K; PLAHAR, W. A. Nutritional quality and antinutritional composition of four non-conventional leafy vegetables. **Food Chemistry**, Barking, v.61, n.33, p.287-291, Mar. 1998.

WEIS, W. I; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.65, p.441-473, Jul. 1996.

WEITZMAN, R. C; SUMMERBELL, J. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.8, n.2, p.240-259, Apr. 1995.

WHO. World Health Organization. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva, 1998. 128p.

WITITSUWANNAKUL, R; WITTSUWANNKU, D; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, New York, v.47, n.2, p.183-187, Jan. 1998.

YAN, Q; ZHU, L; KUMAR, N; JIANG, Z; HUANG, L. Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity. **Food Chemistry**, Barking, v.122, n.3, p.589-595, Oct. 2010.

ZANETTI, G. D. **Lectina dos rizomas de *Arundo donax* L.: purificação, caracterização, propriedades, imuno-histoquímica e separação das isoformas**. 2007. 262f. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

APÊNDICES

ARTIGO**VIABILIDADE DO CONSUMO DE FOLHAS ORGÂNICAS DE CENOURA COM ENFOQUE NOS FATORES NUTRICIONAIS E ANTINUTRICIONAIS****VIABILITY OF THE USE OF ORGANIC CARROT LEAVES WITH FOCUS ON NUTRITION AND FACTORS ANTINUTRITIONAL**

Artigo elaborado a partir da dissertação de mestrado da primeira autora intitulada: Caracterização nutricional e atividade biológica de folhas orgânicas de cenoura (*Daucus carota* L.). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, Paraíba, Brasil, 2010.

Periódico: Journal of Food Composition and Analysis

Qualis: A2 (Ano-Base 2008)

Área: Medicina II

ISSN: 0889-1575

Fator de impacto: 2,457 (JCR-2008)

Viabilidade do consumo de folhas orgânicas de cenoura com enfoque nos fatores nutricionais e antinutricionais

Viability of the use of organic carrot leaves with focus on nutrition and factors antinutritional

Maria Clerya Alvino Leite ^a, Vinicius de Moraes Gomes ^a, Joana Filomena Magalhães Leite ^b, Aderbal Marcos de Azevêdo Silva ^c, Carlos Alberto de Almeida Gadelha ^a, Maria José de Carvalho Costa ^d, Tatiane Santi-Gadelha^{a,*}

^a Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BioGeR), Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil. E-mail: cleryaalvino@hotmail.com; vinickjp@hotmail.com; calbgadelha@gmail.com.

^b Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: leite.joanna@gmail.com.

^c Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil. E-mail: aderbal@pq.cnpq.br

^d Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil. E-mail: mjc.costa@terra.com.br.

*Endereço para correspondência: Rua Agente Fiscal Walfredo Bezerra, 40, CEP 58052-280, Jardim Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil. E-mail: santi.tatiane@gmail.com. Tel: 83 3216-7645

RESUMO

Os vegetais fornecem nutrientes essenciais para o organismo humano. No entanto, a biodisponibilidade destes nutrientes pode ser comprometida pela presença de fatores antinutricionais. Objetivou-se neste trabalho investigar a composição nutricional e os fatores antinutricionais (lectinas, taninos e saponinas) nas folhas de cenoura. Para tanto, foi determinada a composição centesimal (proteínas, carboidratos, lipídeos, fibras dietéticas, umidade e cinzas), o valor calórico e fatores antinutricionais, presentes nas folhas de cenoura fresca, branqueada, cozida e liofilizada. Os resultados demonstraram que as diferentes condições utilizadas alteraram o teor de cinzas, proteínas e lipídios, mas não o teor de carboidratos. Os extratos evidenciaram a presença de lectina, de tanino e ausência de saponina. Para testar a inativação da lectina, o extrato das folhas foi submetido a diferentes variações de temperatura e pH, sendo esta inativada após a cocção e em pH 2,08. Os tratamentos aplicados modificaram significativamente os teores de taninos. Estes experimentos sugerem a utilização de folhas de *Daucus carota* na dieta pelo seu alto conteúdo de minerais, proteínas, lipídeos e fibras dietéticas. Os fatores antinutricionais podem ser inativados pelo calor e pH (lectina) e reduzido pelo calor (tanino), eliminando dessa forma, os efeitos adversos causados por estes fatores, não diminuindo a qualidade nutricional das folhas de cenoura.

Palavras-chave: *Daucus carota*. Composição nutricional. Vegetais folhosos. Fatores antinutricionais. Lectinas. Taninos. Saponinas.

ABSTRACT

Vegetables provide essential nutrients for the human organism. However, the bioavailability of these nutrients may be compromised by the presence of antinutritional factors. The aim of this paper was to investigate the nutritional and antinutritional factors (lectins, saponins and tannins) in carrot leaves. Therefore, they were determined the proximate composition (protein, carbohydrates, lipids, dietary fiber, moisture and ash), caloric value and antinutritional factors present in leaves of fresh carrot, bleached, boiled and lyophilized. Results showed that the different conditions altered the ash content, protein and fat but not carbohydrate. Extracts showed the presence of lectin, tannin and absence of saponin. To test the inactivation of the lectin, the extract was subjected to different variations of temperature and pH, which is inactivated after cooking and at pH 2.08. Treatments significantly affected the levels of tannins. These experiments suggest the use of leaves of *Daucus carota* in the diet by its high content of minerals, proteins, lipids and dietary fiber. Antinutritional factors can be inactivated by heat and pH (lectin) and reduced by heat (tannin), thereby eliminating the adverse effects caused by these factors, not decreasing the nutritional quality of carrot leaves.

Key-words: *Daucus carota*. Nutritional composition. Leafy vegetables. Antinutritional factors. Lectins. Tannins. Saponins.

1. Introdução

A busca pela maximização da produção de gêneros alimentícios tem levado a um uso cada vez maior e mais disseminado de agrotóxicos. A utilização destes produtos em tubérculos inviabiliza o aproveitamento total das partes da planta, em virtude do acúmulo tóxico em áreas mais expostas como folhas, pecíolos e caule. Uma alternativa a esta situação é a produção orgânica destes vegetais tão presentes e necessários à alimentação humana. Neste tipo de produção além de se obter um tubérculo e folhas isentas de substâncias prejudiciais à saúde, promove uma melhor qualidade de vida da população com acesso a uma alimentação com adequado valor nutritivo e a sustentabilidade do ambiente. Além disso, cria-se a possibilidade de aproveitamento de partes da planta não consumidas e, portanto, descartadas.

Dentre esses subprodutos estão incluídas as folhas de cenoura (*Daucus carota* L.) as quais possuem, principalmente, teores significativos de vitamina C total e β -caroteno. Sendo este último, maior que o teor encontrado na porção comestível convencional, podendo assim, ser considerada, como fonte de fibras dietéticas e minerais, destacando-se o cálcio e o ferro (Pereira et al., 2003).

D. carota, é uma espécie da família Apiaceae, composta por plantas normalmente aromáticas e de caule oco, incluindo espécies como a salsa, o aipo, o coentro e outras espécies do mesmo gênero. Em virtude da importância nutricional atribuída à família Apiaceae, e do

desperdício das folhas de cenoura, que geralmente não são consumidas na dieta habitual, o consumo dessas folhas poderia está sendo utilizado de forma integral por grupos populacionais, podendo contribuir para aumentar a disponibilidade dos nutrientes da dieta. Entretanto, apenas as raízes da cenoura são aproveitadas, correspondendo a parte que é comestível e industrializada. A parte folhosa da planta considerada resíduo agrícola, é subutilizada e poderia ser consumida como fonte alternativa de nutrientes com um papel importante no balanço dietético.

No entanto, há a necessidade de investigar a presença de fatores antinutricionais e/ou tóxicos que possam afetar o valor nutricional dos alimentos, antes da recomendação de folhas vegetais como fonte alternativa de nutrientes (Santos, 2006).

O termo fator antinutricional tem sido usado para descrever compostos químicos que podem provocar efeitos fisiológicos adversos e interferir na biodisponibilidade, digestibilidade e absorção de nutrientes ou serem tóxicos, dependendo da quantidade em que são consumidos (Naves et al., 2010). Esses fatores antinutricionais são inativados ou inibidos pelo calor, em maior ou menor extensão, em função da intensidade e duração do tratamento térmico (Oetterer et al., 2006).

Vários tipos de fatores antinutricionais têm sido identificados nas folhas de vegetais, tais como lectinas, taninos e saponinas.

Lectinas são proteínas de origem não imune com a capacidade de aglutinar células, principalmente eritrócitos, contendo pelo menos um domínio não catalítico de ligação específica e reversível a mono e oligossacarídeos (Peumans & Van Damme, 1995). Nos produtos de origem vegetal, é importante se verificar a presença destas proteínas que possam na quantidade ingerida ser causadora de danos à saúde. Por outro lado, e não menos importante é a verificação de algumas atividades benéficas à saúde que causa as proteínas denominadas lectinas, como atividade cicatrizante (Silva et al., 2009), antifúngica (Vaz et al., 2010), antibacteriana (Ratanapo et al., 2001), coagulante (Santos et al., 2009), analgésica (Figueiredo et al., 2009), antiinflamatória (Santi-Gadelha et al., 2006), antitumoral (Yan et al., 2010) e mitogênica (Maciel et al., 2004).

Taninos são polifenóis de alto peso molecular que estão presentes em muitos alimentos de origem vegetal. Eles têm sido relatados por serem responsáveis pela diminuição do crescimento, eficiência alimentar, energia metabolizável e digestibilidade protéica em animais experimentais (Chung et al., 1998). Estes compostos são conhecidos por se ligarem a proteínas formando complexos que, por sua vez, diminui a solubilidade de proteínas, sendo resistentes a enzimas proteolíticas. Além disso, os taninos podem se ligar também a alguns

minerais essenciais da dieta, tornando-os indisponíveis ou parcialmente disponíveis para absorção (Gúzmán-Maldonado et al., 2000). Santos (2006) atribui aos taninos outros efeitos prejudiciais à dieta, como cor indesejável aos alimentos, devido as reações de escurecimento enzimático e diminuição da sua palatabilidade, devido à adstringência.

As saponinas são glicosídeos comuns em plantas superiores e apresentam diversas ações biológicas nos animais. Dentre os efeitos indesejáveis que podem causar, destacam-se modificações na permeabilidade de membranas celulares, atividade hemolítica (Sun, 2006), alterações que afetam significativamente, o crescimento e a reprodução em animais, a digestão de proteínas e redução da absorção de vitaminas e minerais (Francis et al., 2002). Porém, vários efeitos biológicos foram atribuídos as saponinas como atividade antibacteriana (Hassan et al., 2010) e propriedade de adjuvante imunológico (Sun, 2006; Sun et al., 2009).

É fato que fontes alternativas e mais baratas de alimentos devem ser investigadas e terem seu uso estimulado. Dentre estas fontes, resíduos vegetais que possuem pouca utilização na alimentação humana podem assumir papel importantíssimo, visto à crescente necessidade de produção de alimentos. O presente trabalho investigou a composição nutricional e teor de fatores antinutricionais das folhas de cenoura orgânica, parte do vegetal de uso não convencional, com o propósito de analisar a viabilidade de seu consumo pela população e melhorar a qualidade da alimentação.

2. Material e Métodos

2.1. Material

As folhas orgânicas de cenoura (*D. carota* L. cv. Brasília Irecê) utilizadas na pesquisa foram adquiridas na propriedade agro-ecológica Assentamento Padre Gino no município de Sapé, Paraíba, Brasil.

Os eritrócitos humanos foram obtidos de doadores saudáveis do Hospital Universitário Lauro Wanderley e os eritrócitos de coelho foram cedidos pela Universidade Federal da Paraíba.

2.2. Análise da composição centesimal

2.2.1. Preparo das amostras

Os tratamentos utilizados para as análises físico-químicas foram: 1. fresca (forma natural); 2. branqueada em água destilada fervente por 15-20 segundos; 3. cozida por 10 minutos; 4. folha liofilizada. As folhas foram espalhadas sobre papel filtro e secas a temperatura de 25°C por cerca de 2 horas. O material foi levado para estufa a 55°C por 48 horas (tratamentos 1, 2 e 3). No quarto tratamento, as folhas foram congeladas e submetidas à liofilização durante 48 horas a -40°C. As amostras assim determinadas, foram trituradas em moinho elétrico, homogeneizado e armazenado em frascos de vidro hermeticamente fechados à temperatura ambiente até o momento das análises.

2.2.2. Análise físico-química

Os valores de umidade, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), cinzas, proteína bruta, gordura bruta e energia bruta foram obtidos segundo metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002) com base na AOAC (1990).

A umidade foi estimada utilizando o método de secagem em estufa a 105°C por 16 h. Os teores de FDN e FDA foram determinados conforme método de Van Soest em um digestor de fibras (Modelo MA 444 - MARCONI). O teor de cinzas foi obtido pela incineração de 1,5 g da amostra em um forno mufla (Modelo F 1800 1P, EDGCON) a 600°C por 4 horas. A proteína bruta (%N x 6,25) foi obtida pelo método de Kjeldahl pela conversão do conteúdo de nitrogênio usando 0,1 g de cada amostra.

A gordura bruta foi determinada pela extração exaustiva de 2,5 g das amostras por 2 horas, em um aparelho extrator de óleo e graxas (Modelo MA 044/8/50 - MARCONI) com éter de petróleo. Os carboidratos solúveis foram determinados pelo método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico, usando glicose como padrão (Dubois et al., 1956). Carboidratos totais (CHT) foram estimados segundo Mertens (1997), onde: $CHT = \%FDN + \% \text{ Carboidrato solúvel}$. O teor de energia bruta foi determinado usando uma bomba calorimétrica e expresso em kcal/100 g da amostra. Todas essas análises foram realizadas com quatro repetições.

2.3. Determinação dos fatores antinutricionais

2.3.1 Preparo das amostras

Os fatores antinutricionais foram determinados nas folhas de cenoura fresca, branqueada, cozida e liofilizada. As folhas foram lavadas com água corrente e água destilada. Em seguida, foram espalhadas sobre papel filtro e secas a temperatura de 25°C por cerca de 2 horas. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em solução salina (NaCl 0,15M, 1:10; m:v) e submetidas a agitação magnética durante três horas à temperatura de 25°C. A suspensão foi centrifugada a 5000 rpm durante 20 minutos a 4°C e, o sobrenadante foi denominado de extrato bruto - utilizado para a determinação de lectinas, taninos e saponinas.

2.3.2 Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante (AH) foi realizada segundo a metodologia descrita por Correia e Coelho (1995). A AH dos diferentes extratos protéicos foi determinada por meio de diluições duplo-seriadas. Em cada tubo foram adicionados 100 µL de NaCl 0,15 M e no primeiro tubo foram acrescentados 100 µL do extrato da amostra e uma série de diluições duplas foram realizadas. A cada um dos tubos foram adicionados 100 µL de eritrócitos de coelho e sistema ABO a 2%. Os tubos foram então incubados em estufa a 37°C por 30 minutos e a presença da AH foi determinada macroscopicamente.

Os resultados foram expressos em número de unidades hemaglutinantes (UH) que é calculado como sendo o inverso do título da maior diluição, na base 2 que ainda apresentou aglutinação visível de eritrócitos e, em atividade específica da lectina obtida pelo cálculo de UH/mgP (Kilpatrick & Yeoman, 1978). Os tubos que continham somente NaCl 0,15 M e a suspensão de eritrócitos serviram como controle.

2.3.2.1. Determinação do teor de proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis presentes nas amostras foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976). A concentração de proteína foi avaliada utilizando

albumina sérica bovina (BSA) como padrão. As amostras foram submetidas a extração, na proporção (1:10) em NaCl 0,15 M conforme procedimento descrito anteriormente.

O método consistiu de 100 µL da amostra mais 2,5 mL de reagente de Bradford. Após a agitação e repouso por 10 minutos em temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro.

2.3.2.2. Teste da inibição da atividade hemaglutinante por açúcares

A inibição da AH frente a diferentes carboidratos foi determinada por diluição dupla serial, conforme metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977). Uma solução de carboidratos a 0,5 M foi diluída serialmente no mesmo volume de solução salina e acrescentado o mesmo volume do extrato em todos os tubos, com 30 minutos de incubação em estufa a 37°C. Em seguida, foi adicionado 200 µL de uma suspensão de eritrócitos nativos de coelho a 2%, seguido de outros 30 minutos em estufa a 37°C. A leitura da AH foi realizada macroscopicamente.

2.3.2.3. Efeito da temperatura e do pH

Para analisar o efeito da temperatura sobre a AH da lectina de *D. carota*, utilizou-se o extrato das folhas o qual foi aquecido por 10 minutos em Banho-Maria com temperaturas que variaram de 40 a 100°C.

O efeito do pH sobre a AH da lectina foi analisado a partir do extrato das folhas (pH 6,08) separados em duas alíquotas onde em uma era acrescentado HCl 1M e na outra NaOH 1M. Após a variação de uma unidade de pH foi retirada uma alíquota de 100 µL e realizada a AH, onde uma curva de pH foi conduzida entre os valores de pH 2,08 a 13,08.

2.3.3. Detecção de saponinas por hemólise

Foi pesado 6 g de ágar e dissolvidas em 200 mL de solução fisiológica a 60°C. A solução foi tamponada com Fosfato Bibásico 25mM pH 7,4. Da solução de ágar foi retirado 5 mL a qual foi colocada em uma placa de Petri e adicionado 0,5 mL de eritrócitos de coelhos a 10%, que, após a homogeneização foi colocado em temperatura ambiente para solidificar.

Após a solidificação foi adicionado o extrato bruto proveniente das folhas de cenoura. O resultado positivo foi verificado após 30 minutos por meio da evidência do halo hemolítico.

2.3.4. Determinação do teor de taninos

Os taninos totais foram determinados espectrofotometricamente pelo método colorimétrico segundo técnica recomendada por Ranganna (1977).

Os teores de taninos foram determinados nas folhas de cenoura fresca, branqueada, cozida por 10 minutos e na folha liofilizada.

O processo de extração empregado foi a fervura das amostras por 30 minutos em água, onde uma amostra de 5 g das folhas e da farinha foi diluída para um volume final de 500 mL com água. Desta mistura se retirou alíquotas variando de 1 a 10 mL, dependendo da amostra. A esta alíquota, contendo 25 mL de água destilada adicionaram-se 2,5 mL do reagente de Follin-Denis, 5 mL da solução de carbonato de sódio (35%) e completado o volume para 50 mL com água destilada. A solução resultante foi agitada e depois deixada em repouso por 30 minutos e a absorbância foi medida a 760 nm. O branco foi utilizado na ausência da solução padrão. O mesmo procedimento foi adotado para as soluções-padrão de ácido tânico diluído em água destilada, nas seguintes concentrações: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL, onde foi construída a curva de calibração analítica, utilizada em seguida para o cálculo dos teores de taninos totais nas amostras estudadas. Foi realizado em triplicata em espectrofotômetro.

2.3.5. Análise Estatística

Neste experimento foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições.

As variáveis foram submetidas a uma análise de variância. Na comparação de médias, para os tratamentos detectados como significativos pelo teste F, foi empregado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a realização destas análises, foi utilizado o software estatístico Assistat Versão 7.5 beta (Silva & Azevedo, 2009).

3. Resultados e Discussão

3.1. Composição centesimal

Os resultados da composição centesimal e o teor de energia bruta das folhas de cenoura são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da composição centesimal (%) e valor calórico das folhas de *Daucus carota* expressos em base seca.

Componentes	Folha fresca (M $\pm$ DP)	Folha branqueada (M $\pm$ DP)	Folha cozida (M $\pm$ DP)	Folha liofilizada (M $\pm$ DP)
Umidade	2,47 $\pm$ 0,20 ^c	1,23 $\pm$ 0,13 ^d	3,32 $\pm$ 0,25 ^b	8,90 $\pm$ 0,25 ^a
Matéria seca	97,53 $\pm$ 0,20 ^b	98,77 $\pm$ 0,13 ^a	96,68 $\pm$ 0,25 ^c	91,10 $\pm$ 0,25 ^d
FDN	47,80 $\pm$ 5,50 ^a	51,48 $\pm$ 5,99 ^a	52,71 $\pm$ 2,80 ^a	49,28 $\pm$ 7,14 ^a
Hemicelulose	12,33 $\pm$ 4,30 ^a	14,86 $\pm$ 5,15 ^a	11,39 $\pm$ 0,50 ^a	19,13 $\pm$ 3,62 ^a
FDA	35,48 $\pm$ 2,83 ^{ab}	36,62 $\pm$ 1,70 ^a	41,32 $\pm$ 2,29 ^a	30,15 $\pm$ 4,63 ^b
Carboidrato solúvel	6,95 $\pm$ 0,32 ^b	6,98 $\pm$ 0,16 ^b	6,24 $\pm$ 0,34 ^b	9,25 $\pm$ 0,13 ^a
Carboidrato total*	54,76 $\pm$ 5,7 ^a	58,46 $\pm$ 6,03 ^a	58,95 $\pm$ 3,00 ^a	58,53 $\pm$ 7,16 ^a
Cinzas	12,41 $\pm$ 0,32 ^a	9,41 $\pm$ 0,40 ^b	4,54 $\pm$ 0,21 ^c	12,19 $\pm$ 0,06 ^a
Proteína bruta	24,49 $\pm$ 0,20 ^c	26,72 $\pm$ 0,40 ^b	32,01 $\pm$ 0,09 ^a	16,67 $\pm$ 0,10 ^d
Gordura bruta	2,84 $\pm$ 0,32 ^a	2,59 $\pm$ 0,41 ^{ab}	1,79 $\pm$ 0,62 ^b	1,84 $\pm$ 0,27 ^b
Energia bruta (Kcal/100g)	481,58 $\pm$ 10,37 ^b	507,88 $\pm$ 5,79 ^b	566,75 $\pm$ 19,45 ^a	446,15 $\pm$ 13,15 ^c

*Obtido pela fórmula: %FDN + % carboidrato solúvel (Mertens, 1997).

M: Média aritmética; DP: Desvio Padrão.

Médias seguidas da mesma letra na horizontal não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey $p \leq 0,05$)

O teor de umidade encontrada nas folhas de cenoura fresca desidratada foi de 2,47% aumentando seu teor significativamente com a cocção (folha cozida desidratada). Pereira et al. (2003) encontraram um teor de umidade de 7,2% na folha de cenoura com base na matéria seca. As diferenças entre os teores de umidade do presente trabalho (Tabela 1) e os da literatura podem ser devido às diferenças e variações nas condições agroclimáticas.

O valor de umidade da folha fresca em base úmida foi de 83,98%¹ e está próximo ao relatado por Singh et al. (2001), para o coentro (86,9%) e Rhona et al. (2009) para a couve (86,72%).

¹ Valor não expresso na Tabela.

Considerando os teores de FDN e FDA, observa-se, pela Tabela 1, que a folha de cenoura apresentou teores elevados de fibras dietéticas. A FDA corresponde ao somatório de lignina e celulose, ao passo que a FDN corresponde ao somatório de celulose, hemicelulose, ligninas e podendo conter proteínas lignificadas (Silva & Queiroz, 2002). A recomendação de ingestão de fibra alimentar total para adultos é de 25-30 g (Otten et al., 2006). A ingestão de fibras na dieta tem sido relacionada com a prevenção de doenças e a promoção da saúde. As fibras exercem efeitos sobre algumas células do sistema imunológico e sobre as mais variadas patologias, como o câncer colorretal, hipercolesterolemia, diabetes e hipertensão arterial, além de estimularem o crescimento e a atividade de bactérias benéficas do trato gastrointestinal, auxiliando na regularização do trânsito intestinal (Donatto et al., 2006), ressaltando a importância em se agregar alimentos ricos em fibras a uma dieta saudável.

Quanto às fibras, com a cocção houve uma elevação no teor de FDN e FDA e conseqüente redução do teor de hemicelulose. Na folha branqueada houve um aumento de hemicelulose e, com a cocção ocorreu uma redução. Provavelmente essa variação nos teores de material fibroso ocorreu pela redução nos teores de cinzas e gordura bruta e conseqüente, teor de hemicelulose. Com o branqueamento não chegou a ocorrer solubilidade da hemicelulose, razão pela qual seu teor elevou-se considerando a solubilização das cinzas e da gordura bruta. Observa-se que o tratamento com a liofilização propiciou maior concentração de hemicelulose, apontando possivelmente para uma melhor digestibilidade da fibra.

Santos et al. (2001) obtiveram valores de FDA para algumas hortaliças em material úmido e seco, como na couve-flor (2,86% e 17,30%), brócolis (2,34% e 16,18%), e na couve (1,71% e 18,18%). Portanto, comparando os resultados do presente trabalho, conclui-se que as folhas de cenoura superam outras hortaliças consumidas habitualmente quanto aos teores de FDA. Alguns autores apresentaram o conteúdo aproximado de FDN em vegetais, como: farinha de folhas de mandioca (33,83%) (Corrêa et al., 2004) e folhas de *Artemisia annua* (39,5%) (Brisibe et al., 2009). Pereira et al. (2003) relatam teores de 23,0% e 20% de FDN e FDA para a folha de cenoura com valores expressos em base seca, destacando-se como fonte de fibras. Verifica-se também que a porcentagem de FDN das folhas analisadas, superou, na sua totalidade, as fontes citadas pelos autores. As diferenças entre os teores de FDN e FDA do presente trabalho e os da literatura podem ser atribuídas às diferenças varietais, às condições climáticas de cultivo, à época de colheita, bem como a idade da planta. Salienta-se também que, por se tratar de cultivo orgânico, o crescimento é tardio e a idade contribui para aumentar os teores de fibras.

A análise das folhas de *D. carota* quanto ao teor médio de carboidratos foram de 54,76% e 58,95% para folha fresca e cozida, respectivamente. Observou-se que os tratamentos utilizados não causaram alterações significativas no teor de carboidratos totais, entretanto, o teor de carboidratos solúveis aumentou significativamente com a liofilização. Já foi reportado na literatura teor médio de carboidratos para folhas de cenoura em base seca de 52,65%, que correspondeu a 10,5% na matéria integral, classificando essas folhas como um vegetal do tipo B por possuírem cerca de 10% de carboidratos totais (Pereira et al., 2003).

Os valores mais baixos (20,7%, 23%, 24,9%) também foram relatados no trabalho com vegetais folhosos (Aletor et al., 2002) e na folha de mandioca (25%) em base seca (Modesti et al., 2007). Lopes et al. (2009) por sua vez, encontraram um teor de 65% para a farinha de quinoa. Wallace et al. (1998) obtiveram para vegetais folhosos, teores de carboidratos variando de 1,86% para *Launaea taxaracifolia* para 10,53% para *Euphorbia hirta*, ambas em base úmida.

O valor de cinzas nas amostras estudadas foi de 12,41 %, 9,41 % e 4,54 % para a folha fresca, branqueada e cozida, respectivamente, sugerindo que estas folhas são boas fontes de elementos minerais. O valor de cinzas deste estudo está muito próximo ao valor encontrado por Pereira et al (2003) em folha de cenoura, que foi de 10,5%. Entretanto, outros estudos revelaram teores de cinzas inferiores aos encontrados no presente estudo em vegetais folhosos (Brisibe et al., 2009; Lutz et al., 2010). Mais recentemente, foi comprovado o valor nutritivo dos vegetais folhosos verdes (*Trigonella foenum-graecum*, *Centella asiática*, *Pisonia alba* e *Sauropus androgynus*) e sua importância na prevenção de doenças induzidas por radicais livres, sendo estes considerados fontes ricas de antioxidantes naturais, como flavanóides, polifenóis totais e ácido ascórbico (Subhasree et al., 2009), fato que foi reafirmado por Odhav et al. (2007) que obtiveram altos níveis de atividade antioxidante (96%) em espécies de *Justicia flava* e *Portulaca oleracea*. Os valores de cinzas de *D. carota* sugerem um consumo da folha *in natura* ou branqueada para evitar a perda de minerais, uma vez que podem agir como antioxidantes evitando danos celulares.

A Tabela 1 apresenta uma diferença significativa no teor de proteína bruta em função dos tratamentos impostos na folha de cenoura, observando-se uma elevação nesse teor com a cocção, chegando, no caso da folha cozida a ter um aumento de cerca de 30% em relação à folha fresca, com base na matéria seca. Estes resultados corroboram com Lutz et al. (2010), onde a análise química da alcachofra jovem revelou que a cocção aumentou significativamente o teor de proteína bruta. Esse aumento no teor de nitrogênio (proteína bruta) na folha cozida provavelmente ocorreu devido à redução no teor de hemicelulose,

gordura e cinzas que possivelmente tiveram maior solubilidade com o calor. E quanto ao nitrogênio, é possível que ele esteja de alguma forma, ligado a celulose e lignina presentes no FDA.

Os valores de proteína de folhas de cenoura *in natura* em base seca superam aqueles relatados por Pereira et al. (2003) (15,12%) para folhas de cenoura e Singh et al. (2001) para o coentro (22,2%), mas foram menores (32,3%, 34,5%, 34,6%) que as folhas de algumas espécies de vegetais relatados por Aletor et al. (2002) e Singh et al. (2001) que obtiveram valores de proteínas para alguns vegetais folhosos verdes, como espinafre (26,5%), couve-flor (29,9%) e amaranto (26,2%).

O valor de lipídeos encontrado nas folhas de cenoura fresca foi de 2,84%, valor muito próximo ao relatado por Pereira et al. (2003) que foi de 2,5%. Os resultados obtidos neste estudo estão em conformidade com o publicado anteriormente em literatura para vegetais folhosos como relatado por Onyeike et al. (2003), porém, apresenta valor inferior ao encontrado em folhas de taioba (6,0%) (Pinto et al., 2001) e em folhas de mandioca (12%) (Modesti et al., 2007). Devido, ao baixo nível de gordura bruta nas folhas vegetais, alto teor de cinzas e proteínas, seu consumo em quantidades adequadas é um bom hábito alimentar e pode ser recomendado para pessoas que sofrem de obesidade que gostariam de perder peso (Onyeike et al., 2003), considerando também a sua concentração de fibras que vai contribuir para maior sensação de saciedade, auxiliando na redução da ingestão calórica.

O valor calórico encontrado nas folhas de cenoura variou de 482 Kcal/100g na fresca para 567 kcal/100g na cozida, superior ao valor apresentado por Pereira et al. (2003) para a folha de cenoura que foi de 293,56 kcal/100g. O teor de energia bruta é superior quando comparada com outros vegetais, como a taioba (Pinto et al., 2001), farinha de quinoa (Lopes et al., 2009) e folhas de *Telfaria occidentalis* (Aletor et al., 2002), onde o teor de energia é cerca de 286 kcal/100g, 352 kcal/100g, 386 kcal/100g, respectivamente. A variação nos nutrientes provocados pela cocção contribuiu para ocorrer uma elevação significativa no teor de energia bruta, estes teores são coerentes com a composição química apresentada considerando a estimativa da concentração de energia dos nutrientes, onde em média estima-se: carboidratos = 415 Kcal/100g; proteínas = 565 Kcal/100g e gorduras = 940 Kcal/100g (Silva & Queiroz, 2002). Verifica-se que a diminuição no teor energético quando liofilizado, deveu-se as variações nas proporções dos nutrientes. Isto significa dizer que quantitativamente os nutrientes permaneceram intactos, mas a percentual muda em relação aos outros tratamentos devido à volatilização de alguns nutrientes.

3.2. Fatores antinutricionais

Os vegetais podem ser fonte de nutrientes para todas as pessoas, entretanto, a biodisponibilidade de seus nutrientes pode ser comprometida pela presença de fatores antinutricionais (Leite et al., 2009). Contudo, Uusiku et al. (2010) ressaltam que alguns compostos com fatores antinutricionais podem ter efeitos benéficos para a saúde humana, dependendo da dose e da biodisponibilidade.

Os resultados referentes aos fatores antinutricionais da folha de cenoura estão descritos na Tabela 2.

Nos vegetais, as lectinas estão distribuídas em várias famílias e, portanto, ingerida diariamente, em quantidades apreciáveis pelos seres humanos e animais. Nutricionalmente, uma das características mais importantes das lectinas vegetais é sua capacidade de resistir à digestão no trato gastrointestinal dos consumidores. Isso permite que as lectinas se liguem a grupos glicosil da membrana das células que revestem o aparelho digestivo. Como resultado desta interação uma série de reações locais e sistêmicas danosas são acionadas. A nível local, pode acarretar danos a membrana luminal do epitélio, interferir na digestão e absorção de nutrientes, estimular mudanças na flora bacteriana e modular o estado imunológico do trato digestivo. Sistemicamente, pode interromper o metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas, promover a ampliação e/ou atrofia de órgãos e tecidos, e alterar o estado imunológico e hormonal. Em doses elevadas, lectinas pode ameaçar seriamente o crescimento e a saúde de animais consumidores (Vasconcelos & Oliveira, 2004).

Tabela 2 - Médias referentes a alguns fatores antinutricionais das folhas de cenoura submetidas a quatro tratamentos.

Fator antinutricional	Folha fresca	Folha branqueada	Folha cozida	Folha liofilizada
Atividade hemaglutinante (UH/mgP)				
Eritrócitos				
Humano A	ND	ND	ND	ND
Humano B	16,32	15,97	ND	28,14
Humano O	16,32	15,97	ND	28,14
Coelho	65,28	63,88	ND	1800,83
Taninos (%)	0,60 ± 0,08 ^b	0,37 ± 0,0 ^c	0,16 ± 0,03 ^d	4,15 ± 0,06 ^a
Saponinas	ND	ND	ND	ND

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey $p \leq 0,05$)

UH: Unidades hemaglutinantes; ND: Não detectado.

As lectinas das folhas de *D. carota* têm uma maior especificidade para os açúcares presentes na membrana de eritrócitos de coelho do que para eritrócitos humanos tipo B e tipo O e não reconheceu carboidratos presentes em membranas de eritrócitos humano A. O fato da lectina em estudo aglutinar preferencialmente eritrócitos de coelho, deve-se ao fato do sangue de coelho conter uma maior variedade de carboidratos de membrana. As folhas fresca e branqueada apresentaram AH, porém, não apresentou atividade após a cocção. Os dados desta pesquisa é semelhante ao relatado por Salazar et al. (2006). Em ambos os trabalhos, a AH foi observada nas folhas fresca, não apresentando AH nas folhas cozidas, resultados estes, que são compartilhados por outros autores em análises com vegetais folhosos (Leite et al., 2009).

Vale ressaltar que, a capacidade de provocar AH em células isoladas, não confirma a presença de lectina, já que taninos, alguns lipídeos e até mesmo cátions divalentes em altas concentrações são capazes de aglutinar células. Sendo assim, para garantir que a AH está sendo mediada por alguma lectina exige-se que ocorra a inibição desta AH por carboidratos. Dessa forma, no presente estudo, no teste de inibição da AH a lectina de *D. carota* demonstrou especificidade por galactose, lactose e arabinose.

Quanto a inativação desse fator antinutricional foi demonstrado que, somente após 10 minutos em banho-maria a 80°C ocorreu decréscimo na AH da *D. carota*, e apenas a temperatura de 100°C, durante 10 minutos, ocorreu a inativação total da lectina onde não apresentou AH (Figura 1). A AH da *D. carota* mostrou-se estável em uma larga faixa de pH, entre 3,08 e 13,08. Em pH 8,08 a 13,08 ocorreu uma redução na AH e sua inativação foi observada em pH 2,08, logo, semelhante ao pH estomacal o que irá propiciar a inativação da lectina por vias fisiológicas (Figura 2). Esses dados demonstram a estabilidade da lectina estudada frente a diferentes pH.

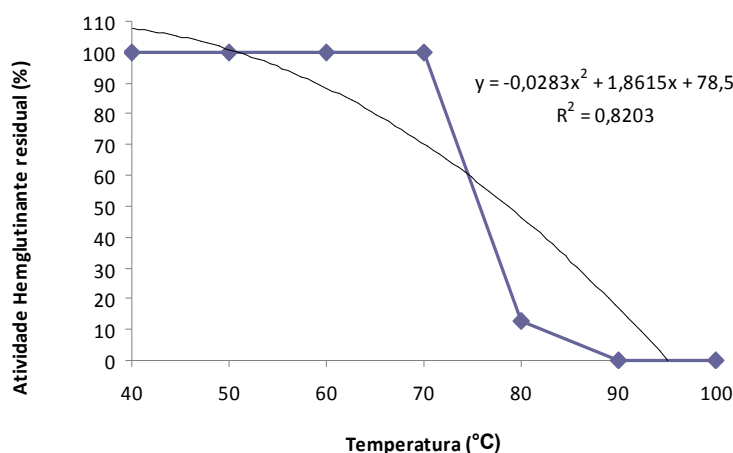


Figura 1 - Efeito da variação de temperatura na atividade hemaglutinante da lectina de *Daucus carota*. Atividade hemaglutinante determinada a cada aumento da temperatura em 10°C após 30 minutos de incubação nas referidas temperaturas.

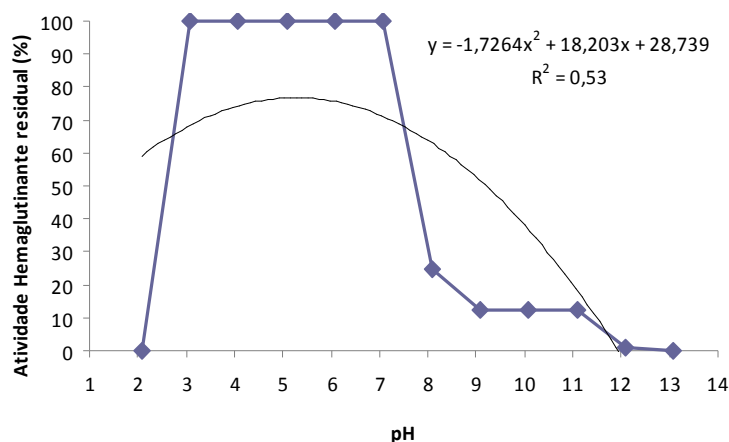


Figura 2 - Efeito da variação de pH na atividade hemaglutinante da lectina de *Daucus carota*. Atividade hemaglutinante da lectina verificada após 30 minutos de incubação com pH variando de 2,08 a 13,08.

Como mostrado na Tabela 2, as folhas estudadas apresentaram queda nos teores de polifenóis após a aplicação dos tratamentos térmicos, resultado que é compartilhado por Lewu et al. (2010) quando a cocção reduziu acentuadamente o teor de taninos em tubérculos de inhame. Comparando-se os teores da folha de cenoura fresca estudada, verifica-se que esta possui baixo teor de taninos, não afetando, conseqüentemente, a digestibilidade das proteínas, ao passo que, na folha liofilizada, possui teores elevados (4,15%). Esta elevação significativa pode ter ocorrido em virtude da retirada da água que aumentou a concentração dessa substância. Valores acima de 1% são considerados prejudiciais a ingestão e à digestibilidade dos alimentos (Hoseney et al., 1981).

Os teores de polifenóis em 100 g de folhas frescas apresentaram-se inferiores aos encontrados por Wallace et al. (1998) em vegetais folhosos, considerados fontes não convencionais de nutrientes. Os autores encontraram, respectivamente, valores de 1,2%, 0,87% e 0,66% para *E. hirta*, *Ipomoea involucrata* e *Xanthosomas maffa*; enquanto as umbelíferas estudadas apresentaram valores médios de 0,6% para folha fresca e 0,16% para a folha cozida. Verifica-se que as folhas estudadas apresentaram teores inferiores, sugerindo esses vegetais como uma melhor opção de consumo. A folha de cenoura fresca apresentou teores inferiores de taninos (Tabela 2) em relação a outras folhas da mesma família, como a *Angelica archangelica* (2,20%) (Pansera et al., 2003).

Leite et al. (2009) investigaram o conteúdo de fatores antinutricionais em folhas de bredo fresca, branqueada e cozida, observando um aumento significativo nos teores de taninos da fresca (1,07%) para a branqueada (2,79%), mas não para a cozida (1,31%). Santos (2006)

investigou o efeito da cocção sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócoli, couve-flor e couve. Estas três espécies de brássicas analisadas apresentaram teores de taninos acima de 1% antes da fervura, diminuindo seu teor consideravelmente a medida que o tempo de fervura foi aumentando, entretanto, as folhas de couve e brócoli mantiveram níveis prejudiciais à saúde mesmo após a aplicação dos tratamentos térmicos.

A incidência de certos tipos de câncer, como câncer de esôfago, foram relatados por estar relacionados ao consumo de alimentos ricos em taninos, como o chá de ervas, sugerindo que os taninos podem ser cancerígenos. Entretanto, outros relatos indicam que a atividade cancerígena de taninos pode estar relacionada a componentes associados com taninos ao invés dos taninos em si (Chung et al., 1998).

Saponinas são glicosídeos de esteróides ou triterpenóides, comum em um grande número de plantas e produtos que são importantes na nutrição humana e animal. Vários efeitos biológicos são atribuídos às saponinas tanto positivos quanto negativos. A saponina como fator antinutricional destaca-se por afetar significativamente o crescimento, a reprodução e o consumo de ração em animais, além de prejudicar a digestão de proteínas e absorção de vitaminas e minerais no intestino. Estes compostos estruturalmente diversos também foram observados, por terem propriedades anticarcinogênicas, antioxidantes, imunoestimulante, hipocolesterolêmico, por causar hipoglicemia, e agir como agentes antifúngico e antiviral (Francis et al., 2002).

Não foi detectada saponina em nenhuma das amostras estudadas, pois não se observou hemólise o que representa um bom resultado, pois se sabe que ela tem uma ação lítica sobre a membrana de eritrócitos e esta propriedade tem sido utilizada para sua detecção.

Wallace et al. (1998) quando estudaram fatores antinutricionais em quatro vegetais folhosos verdes, detectaram níveis de saponina variando de 6,67 mg% em *E. hirta* para 481 mg% em *X. maffa*.

As folhas verdes dos vegetais ricos em nutrientes são essenciais para o bom crescimento de crianças e a manutenção de nutrientes e vitaminas em adultos e idosos. Muitos, destes elementos, podem ser obtidos em hortaliças pouco utilizadas e/ou descartadas, como é o caso da folha de cenoura. Esta alternativa se torna viável por motivo destas hortaliças apresentarem baixo custo, alta disponibilidade e fácil cultivo.

4. Conclusão

A folha de cenoura, pode contribuir com quantidades úteis de nutrientes essenciais, incluindo carboidratos, proteínas, fibras e minerais, a dieta humana.

O tratamento térmico foi capaz de promover alterações dos fatores antinutricionais presentes nas folhas inativando a lectina e diminuindo os teores de tanino a níveis aceitáveis para consumo. As folhas de cenoura possuem lectina como fator antinutricional, porém sendo inativada pela cocção e em pH 2,08; procedimentos recomendados para a redução ou eliminação dessa proteína nas folhas avaliadas.

Referências

- Aletor, O., Oshodi, A. A., Ipinmoroti, K. (2002). Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates. *Food Chemistry*, 78(1), 63-68.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists (1990). *Official Methods of Analysis*. 15rd ed. Washington, USA.
- Bradford, M. M. A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1/2), 248-254.
- Brisibe, E. A., Umoren, U. E., Brisibe, F., Magalhães, P. M., Ferreira, J. F. S., Luthria, D., Wu, X., Prior, R. L. (2009). Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. *Food Chemistry*, 115(4), 1240-1246.
- Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6), 421-464.
- Corrêa, A. D., Santos, S. R., Abreu, C. M. P., Jokl, L., Santos, C. D. (2004). Remoção de polifenóis da farinha de folhas de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(2), 159-164.
- Correia, M. T. S., & Coelho, L. C. B. B. (1995). Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55(3), 261-273.
- Donatto, F. F., Pallanch A., Cavaglieri C. R. (2006). Fibras dietéticas: efeitos terapêuticos e no exercício. *Saúde em Revista*, 8(20), 65-71.

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Figueiredo, J. G., Bitencourt, F. S., Beserra, I. G., Teixeira, C. S., Luz, P. B., Bezerra, E. H. S., Mota, M. R. L., Assreuy, A. M. S., Cunha, F. Q., Cavada, B. S., Alencar, N. M. N. (2009). Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 380(5), 407-414.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P., Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88(6), 587-605.
- Guzmán-Maldonado, S. H., Acosta-Gallegos, J., Paredes-López, O. (2000). Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1874-1881.
- Hassan, S. M., Haq, A. U., Byrd, J. A., Berhow, M. A., Cartwright, A. L., Bailey, C. A. (2010). Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. *Food Chemistry*, 119(2), 600-605.
- Hoseney, R. C., Varriano-Marston, E., Dendy, D. A. V. (1981). Sorghum and millets. *Advances in Cereal Science and Technology*, 4, 71-144.
- Kilpatrick, D. C., & Yeoman, M. M. (1978). Purification of the lectin from *Datura stramonium*. *Biochemical Journal*, 175(3), 1151-1153.
- Leite, J. F. M., Silva, J. A., Gadelha, T. S., Gadelha, C. A., Siqueira Júnior, J. P. (2009). Nutritional value and antinutritional factors of foliaceous vegetable *Talinum fruticosum*. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 68(3), 341-345.
- Lewu, M. N., Adebola, P. O., Afolayan, A. J. (2010). Effect of cooking on the mineral contents and anti-nutritional factors in seven accessions of *Colocasia esculenta* (L.) Schott growing in South Africa. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(5), 389-393.
- Lopes, C. O., Dessimoni, G. V., Pinto, N. A. V. D. (2009). Aproveitamento, composição nutricional e antinutricional da farinha de quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Alimentos e Nutrição*, 20(4), 669-675.
- Lutz, M., Henríquez, C., Escobar, M. (2010). Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *Journal of Food Composition and Analysis*, Article in Press, Accepted Manuscript.
- Maciel, E. V. M., Araújo-Filho, V. S., Nakazawa, M., Gomes, Y. M., Coelho, L. C. B. B., Correia, M. T. S. (2004). Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*, 32(1), 57-60.
- Mertens, D. R. (1997). Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80(7), 1463-1481.

- Modesti, C. F., Corrêa, A. D., Oliveira, E. D., Abreu, C. M. P., Santos, C. D. (2007). Caracterização de concentrado protéico de folhas de mandioca obtido por precipitação com calor e ácido. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(3), 464-469.
- Moreira, R. A., & Perrone, J. C. (1977). Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, 59(5), 783-787.
- Naves, L. P., Corrêa, A. D., Santos, C. D., Abreu, C. M. P. (2010). Componentes antinutricionais e digestibilidade protéica em sementes de abóbora (*Cucurbita máxima*) submetidas a diferentes processamentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(1), 180-184.
- Odhav, B., Beekrum, S., Akula, U., Baijnath, H. (2007). Preliminary assessment of nutritional value of traditional leafy vegetables in KwaZulu-Natal, South Africa. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 430-435.
- Oetterer, M., D'arce, M. A. B. R., Spoto, M. (2006). *Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Barueri, SP, Brasil: Manole.
- Onyeike, E. N., Ihugba, A. C., George, C. (2003). Influence of heat processing on the nutrient composition of vegetable leaves consumed in Nigeria. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58(3), 1-11.
- Otten, J. J., Hellwig, J. P., Meyers, L. D. (2006). *Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirement*. Institute of Medicine of the National Academy. Washington, DC: National Academy Press.
- Pansera, M. R., Santos, A. C. A., Paese, K., Wasum, R., Rossato, M., Rota, L. D., Pauletti, G. F., Serafini, L. A. (2003). Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13(1), 17-22.
- Pereira, G. I. S., Pereira, R. G. F. A., Barcelos, M. F. P., Morais, A. R. (2003). Avaliação química da folha de cenoura visando ao seu aproveitamento na alimentação humana. *Ciência e Agrotecnologia*, 27(4), 852-857.
- Peumans, W. J., & Van Damme, E. J. M. (1995). The role of lectins in plant defence. *Histochemical Journal*, 27(4), 253-271.
- Pinto, N. A. V. D., Fernandes, S. M., Thé, P. M. P., Carvalho, V. D. (2001). Variabilidade da composição centesimal, vitamina C, ferro e cálcio de partes da folha de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). *Revista Brasileira de Agrociência*, 7(3), 205-208.
- Ranganna, S. (1977). *Manual of analysis of fruit and vegetables products*. New Delhi, Índia. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited.
- Ratanapo, S., Ngamjunyaporn, W., Chulavatnatol, M. (2001). Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. *Plant Science*, 160(4), 739-744.

- Miller-Cebert, R. L., Sistani, N. A., Cebert, E. (2009). Comparative mineral composition among canola cultivars and other cruciferous leafy greens. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(2), 112-116.
- Salazar, J., Velásquez, R., Quesada, S., Piccineli, A. L., Rastrelli, L. (2006). Chemical composition and antinutritional factors of *Lycianthes synanthera* leaves (chomte). *Food Chemistry*, 97(2), 343-348.
- Santi-Gadelha, T., Gadelha, C. A. A., Aragão, K. S., Oliveira, C. C., Mota, M. R. L., Gomes, R. C., Pires, A. F., Toyama, M. H., Toyama, D. O., Alencar, N. M. N., Assreuy, A. M. S., Cavada, B. S. (2006). Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350(4), 1050-1055.
- Santos, M. A. T., Silva, M. A. M., Abreu, C. M. P., Carvalho, V. D. (2001). Efeito de diferentes tempos de cozimento nos teores de fibras alimentares em folhas de brócolis, couve-flor e couve (*Brassica oleracea* L.). *Alimentos e Nutrição*, 12(1), 83-94.
- Santos, M. A. T. (2006). Efeito do cozimento sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócoli, couve-flor e couve. *Ciência e Agrotecnologia*, 30(2), 294-301.
- Santos, A. F. S., Luz, L. A., Argolo, A. C. C., Teixeira, J. A., Paiva, P. M. G., Coelho, L. C. B. B. (2009). Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. *Process Biochemistry*, 44(4), 504-508.
- Silva, D. J., & Queiroz, A. C. (2002). *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3rd ed. Viçosa, MG, Brasil: Editora UFV.
- Silva, F. O., Araújo, R. V. S., Schirato, G. V., Teixeira, E. H., Melo Júnior, M. R., Cavada, B. S., Lima-Filho, J. L., Carneiro-Leão, A. M. A., Porto, A. L. F. (2009). Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. *Ciência Rural*, 39(6), 1808-1814.
- Silva, F. A. S., & Azevedo, C. A. V. (2009). Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: *World Congress on Computers in Agriculture*, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- Singh, G., Kawatra, A., Sehgal S. (2001). Nutritional composition of selected green leafy vegetables, herbs and carrots. *Plant Foods for Human Nutrition*, 56(4), 359-364.
- Subhasree, B., Baskar, R., Keerthana, R. L., Susan, R. L., Rajasekaran, P. (2009). Evaluation of antioxidant potential in selected green leafy vegetables. *Food Chemistry*, 115(4), 1213-1220.
- Sun, H. X. (2006). Adjuvant effect of *Achyranthes bidentata* saponins on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice. *Vaccine*, 24(17), 3432-3439.
- Sun, H. X., Xie, Y., Ye, Y. P. (2009). Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*, 27(12), 1787-1796.

- Uusiku, N. P., Oelofse, A., Duodu, K. G., Bester, M. J., Faber, M. (2010). Nutritional value of leafy vegetables of sub-Saharan Africa and their potential contribution to human health: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 499-509.
- Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A. (2004). Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, 44(4), 385-403.
- Vaz, A. F. M., Costa, R. M. P. B., Melo, A. M. M. A., Oliva, M. L. V., Santana, L. A., Silva-Lucca, R. A., Coelho, L. C. B. B., Correia, M. T. S. (2010). Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. *Food Chemistry*, 119(4), 1507-1513.
- Wallace, P. A., Marfo, E. K., Plahar, W. A. (1998). Nutritional quality and antinutritional composition of four non-conventional leafy vegetables. *Food Chemistry*, 61(33), 287-291.
- Yan, Q., Zhu, L., Kumar, N., Jiang, Z., Huang, L. (2010). Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, 122(3), 589-595.

OUTROS RESULTADOS

1- Teor de proteínas solúveis e atividade hemaglutinante com a farinha delipidada² de folhas de *Daucus carota* contra eritrócitos de coelho a 3%

Os resultados da dosagem de proteínas solúveis, AH e atividade específica da farinha delipidada de folhas de *D. carota*, quando testadas frente eritrócitos de coelho estão apresentados na Tabela 1.

A farinha delipidada de folhas de *D. carota* extraída com diferentes soluções apresenta atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho não tratados com enzimas proteolíticas, tendo sua maior atividade específica (UH/mgP) quando obtido de NaCl 0,15M. O maior teor de proteínas solúveis por grama de farinha (mgP/gF) foi obtido com Glicina 0,1M pH 9,0 com NaCl 0,15 M, porém a atividade específica (unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína, UH/mgP) foi inferior a solução obtida com NaCl 0,15M, demonstrando que apesar de apresentar alto teor de proteína solúvel não contem maior quantidade de lectina. Pode-se verificar ainda que as soluções de NaCl 0,15M e Tris 0,1 M pH 7,6 com NaCl 0,15 M foram capazes de extrair maior quantidade de lectina presente na farinha delipidada de folhas de *D. carota*, observando-se pelos resultados da atividade hemaglutinante por grama de farinha (UH/gFa), onde temos 640 e 320 unidades de hemaglutinação nas respectivas soluções.

Tabela 1 – Teor de proteínas solúveis e atividade hemaglutinante com a farinha delipidada de folhas de *Daucus carota* contra eritrócitos de coelho a 3%.

Solução de extração	mgP/mL	mgP/gFa	(UH/ mL) [*]	UH/gFa	Atividade específica (UH/mgP)
NaCl 0,15M	0,415	4,149	64	640	154,26
NaCl 0,5M	0,312	3,118	8	80	25,66
**Glicina pH 2,6	0,832	8,320	4	40	4,81
**Tris pH 7,6	0,844	8,439	32	320	37,92
**Glicina pH 9,0	1,194	11,939	16	160	13,40

^{*}Inverso do título da maior diluição na base 2 que causou aglutinação, em número de unidades hemaglutinantes (UH).

^{**}0,1 M com NaCl 0,15M

² A farinha foi delipidada com hexano para a remoção dos lipídeos.

2 - Teor de proteínas solúveis e atividade hemaglutinante das folhas de *Daucus carota* fresca, branqueada, cozida, liofilizada e a fração protéica 0-80 obtidas da solução de NaCl 0,15M, utilizando eritrócitos de coelho a 3%

A farinha de folhas de *D. carota* submetidas a diferentes tratamentos (fresca, branqueada, cozida, liofilizada) e a precipitação com sulfato de amônio na concentração de 80% (fração 0-80) foram extraídas em NaCl 0,15 M. A Tabela 2 demonstra que as folhas liofilizadas apresentaram maior teor de proteínas solúveis por grama de farinha (mgP/gF), atividade hemaglutinante por mililitro (UH/mL), bem como atividade hemaglutinante por grama de farinha (UH/gFa), porém a maior atividade específica (UH/mgP) representada pela maior concentração de lectina foi verificada na fração 0-80.

Pode-se observar que o processo de cocção diminui o teor de proteínas solúveis bem como inativa a lectina tendo em vista que não apresenta AH contra eritrócitos de coelho não tratados com enzimas proteolíticas.

Tabela 2 - Teor de proteínas solúveis e atividade hemaglutinante das folhas de *Daucus carota* fresca, branqueada, cozida, liofilizada e a fração protéica 0-80 obtidas da solução de NaCl 0,15M, utilizando eritrócitos de coelho a 3%.

Amostra	mgP/mL	mgP/gFa	(UH/mL)	UH/gFa	Atividade específica (UH/mgP)
Folha fresca	0,245	2,451	16	160	65,28
Folha branqueada	0,250	2,505	16	160	63,88
Folha cozida	0,012	0,124	ND	-	-
Folha liofilizada	0,569	5,686	1024	10240	1800,83
Fração 0-80	0,267	0,267	512	512	1917,29

ND: não detectado AH.

3 - Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples da farinha liofilizada de folhas de *Daucus carota*

A ação inibitória dos carboidratos sobre a AH de *D. carota* foi analisada com 14 diferentes açúcares, conforme a Tabela 3. Foi utilizado para os ensaios de hemaglutinação eritrócitos de coelhos não tratados com enzimas proteolíticas a 3%. Entre os açúcares testados somente tiveram ação inibitória a lactose (15,6 mM), D-arabinose e D-galactose (31,25 mM).

Tabela 3 - Efeito de carboidratos simples sobre a atividade hemaglutinante da lectina de *Daucus carota* frente a eritrócitos nativos de coelho a 3%.

Carboidratos (Monossacarídeos)	(UH/mL)	CIM (mM)
D-Fructose	ND	ND
D-Galactose	4	31,25
D-Glicose	ND	ND
D- Arabinose	4	31,25
D - Trehalose	ND	ND
D-fucose	ND	ND
N-acetil-D-glicosamina	ND	ND
Metil- α -D-Glicopiranosídeo	ND	ND
α -Lactose	2	15,6
D-Maltose	ND	ND
Sacarose	ND	ND
Xilose	ND	ND
L-Sorbose	ND	ND

CIM: concentração requerida para inibir a atividade hemaglutinante em 100%.

ND: não detectada ação inibitória.

4 - Efeito de diferentes agentes desnaturante, redutor e oxidante na atividade lectínica de *Daucus carota* testada contra eritrócitos de coelhos não tratados com enzimas proteolíticas a 3%

A Tabela 4 mostra que a lectina de *D. carota* foi desnaturada com uréia 8 M overnight (agente desnaturante) com perda total da atividade lectínica, entretanto, houve uma diminuição desta atividade quando o tempo de contato do agente desnaturante com a amostra foi de 30 minutos.

A amostra lectínica não sofreu alteração frente ao β -mercaptoetanol (agente redutor) demonstrando não apresentar cistinas e metaperiodato de sódio demonstrando uma proteção de membrana quanto a ação deste composto que age sobre os lipídeos de membrana (agente oxidante).

Tabela 4 - Efeito de diferentes agentes desnaturante, redutor e oxidante na atividade lectínica de *Daucus carota*.

Amostra protéica	Atividade hemaglutinante (UH/mL)
Controle	64
Uréia 8M* (30 minutos)	16
Uréia 8 M* (overnight)	0
β -mercaptoetanol 10mM	64
Metaperiodato de sódio	64

* Tempo de contato entre o agente desnaturante e a amostra lectínica.

5 - Efeito de enzimas proteolíticas (500 μ g/mL) sobre a atividade da lectina de *Daucus carota*

A estabilidade da lectina da *D. carota* frente à ação de enzimas proteolíticas está registrada na Tabela 5. Os resultados mostraram que, nas condições experimentais testadas, a amostra lectínica não perdeu a AH por efeito das enzimas tripsina, papaína ou bromelaína.

Tabela 5 - Efeito de enzimas proteolíticas (500 μ g/mL) sobre a atividade lectínica de *Daucus carota*.

Amostra protéica	Atividade hemaglutinante (UH/mL)
Controle	64
Tripsina	64
Papaína	64
Bromelaína	64

6 - Efeito do agente quelante e cátions divalentes na atividade lectínica de *Daucus carota*

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostraram que a amostra lectínica foi totalmente inativada na presença do agente quelante (EDTA) mesmo com a adição de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} . Na ausência de EDTA e presença de íons a AH foi mantida.

Tabela 6 - Efeito do agente quelante e cátions divalentes na atividade lectínica de *Daucus carota*.

Amostra protéica	Atividade hemaglutinante (UH/mL)
Controle	64
EDTA 250 mM	0
Ca ²⁺ 40 mM	64
Mn ²⁺ 40 mM	64
EDTA + Ca ²⁺ 240 + 40 (mM)	0
EDTA + Mn ²⁺ 240 + 40 (mM)	0

7 - Cromatografia de afinidade em coluna de estroma de poliacrilamida (membrana de eritrócitos) da fração 0-80 das folhas de *Daucus carota*

A fração 0-80 de folhas de *D. carota*, quando cromatografada em coluna de estroma-poliacrilamida apresentou um pico não retido (PI) e um retido (PII) (Figura 1) o qual apresenta AH demonstrando dessa forma, a presença da lectina. A coluna de estroma-poliacrilamida mostrou-se eficaz para a separação parcial da lectina dos demais contaminantes.

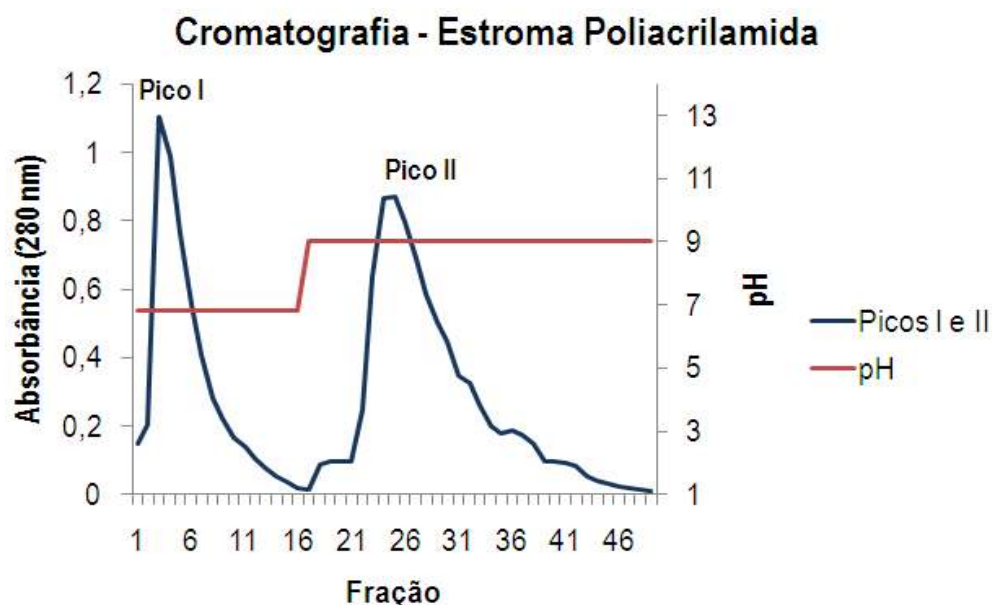


Figura 1 - Cromatografia de afinidade em coluna de estroma-poliacrilamida (8,6 mL) da fração 0-80 de folhas de *Daucus carota*.

Para a realização desta cromatografia, uma alíquota da fração 0-80 (20 mg/5 mL de NaCl 0,15M) foi aplicada na coluna equilibrada com NaCl 0,15 M; após 2 horas e 30 minutos foi eluída com coleta de 1 mL por fração. O PI foi eluído com a solução de equilíbrio e o PII eluído com tampão glicina pH 9,0, 0,1 M com NaCl 0,15 M com AH contra eritrócitos de coelho não tratados enzimaticamente.

8 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 12% em presença de SDS e β -Mercaptoetanol

O pico II retido em coluna de estroma-poliacrilamida foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -Mercaptoetanol quando coradas com reagente de prata mostraram um perfil protéico com duas bandas sendo uma de baixo peso molecular aparente de 14,0 kDa e a outra de aproximadamente 37 KDa. Este perfil protéico demonstra que proteína provavelmente possui mais de uma cadeia polipeptídica.

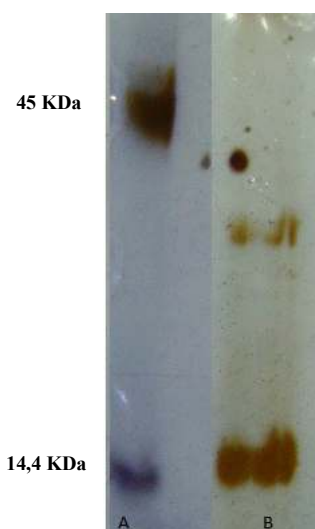


Figura 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em presença de SDS e β -Mercaptoetanol. Poço A: Marcadores de massas moleculares aparentes: Lisosima (14,4 KDa); Inibidor de trispina de soja (21,4/19,7 KDa); Anidrase carbônica (31 Kda); Ovoalbumina (45 KDa); Albumina serica bovina (66,2 KDa); Fosforilase B (97,4 KDa); B-galactosidase (116 Kda) e miosina (212 (Kda). Poço B: Pico II da *Daucus carota* obtida da coluna de estroma-poliacrilamida.

9 - Atividade antibacteriana da fração protéica 0-80 das folhas de *Daucus carota* frente às bactérias

A fração protéica 0-80 das folhas de *D. carota* foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* e *Escherichia coli* somente em concentrações que variaram de 1,9 μ g a 15,5 μ g. No

entanto, as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* não foram inibidas para todas as concentrações utilizadas da fração 0-80 das folhas de *D. carota*.

Tabela 7 - Atividade antibacteriana da fração protéica 0-80 das folhas de *Daucus carota* frente às bactérias.

Concentração	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
1000 µg	ND	ND	ND	ND
500 µg	ND	ND	ND	ND
250 µg	ND	ND	ND	ND
125 µg	ND	ND	ND	ND
62 µg	ND	ND	ND	ND
31 µg	ND	ND	ND	ND
15,5 µg	CI	CI	ND	ND
7,7 µg	CI	CI	ND	ND
3,9 µg	CI	CI	ND	ND
1,9 µg	CI	CI	ND	ND

ND: não detectado atividade inibitória

CI: concentração inibitória

10 - Atividade antifúngica da fração protéica 0-80 das folhas de *Daucus carota* frente aos dermatófitos

A Tabela 8 demonstra que nas concentrações (200;100; 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1 e 1,55 µg) utilizadas da fração protéica 0-80 das folhas de *D. carota* não foi capaz de inibir o crescimento dos fungos *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* pelo método de microtitulação.

Tabela 8 - Resultados do teste de microdiluição (4 mg/mL) da fração protéica 0-80 das folhas de *Daucus carota* frente aos dermatófitos.

Concentração	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
200 µg	ND	ND	ND	ND
100 µg	ND	ND	ND	ND
50 µg	ND	ND	ND	ND
25 µg	ND	ND	ND	ND
12,5 µg	ND	ND	ND	ND

Tabela 8 - Resultados do teste de microdiluição (4 mg/mL) da fração protéica 0-80 das folhas de *Daucus carota* frente aos dermatófitos.

6,2 µg	ND	ND	ND	ND
3,1 µg	ND	ND	ND	ND
1,55 µg	ND	ND	ND	ND

ND: não detectada ação inibitória.

A Tabela 9 demonstra que as concentrações (80; 40; 20 e 10 µg) utilizadas da fração protéica 0-80 das folhas de *D. carota* não foram capazes de inibir o crescimento dos fungos *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* pelo método de difusão em disco, o que comprova que a lectina de *D. carota* não é capaz de reconhecer e combater estes tipos de fungos.

Tabela 9 - Resultados do teste de difusão em disco da fração protéica 0-80 (4mg/mL) frente aos dermatófitos.

Concentração	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
80 µg	ND	ND	ND	ND
40 µg	ND	ND	ND	ND
20 µg	ND	ND	ND	ND
10 µg	ND	ND	ND	ND

ND: não detectada ação inibitória.

12 - Atividade hemolítica da fração protéica 0-80 e das folhas de *Daucus carota* fresca, branqueada e cozida

Na Tabela 10 constam os resultados da atividade hemolítica da fração protéica 0-80 e das folhas de *D. carota* fresca, branqueada e cozida. Podemos verificar que somente nas folhas branqueadas ocorreu uma disponibilização de fatores capazes de lisar 50,78% a membrana de eritrócitos humanos O e na concentração de 1000 µg. Porém, estes valores ainda são considerados como sendo moderados uma vez que considera-se os valores de 0-40% atividade citotóxica baixa; 40-80% atividade citotóxica moderada; ≥ 80% atividade citotóxica alta, podendo portanto utilizar as folhas na nutrição.

Tabela 10 - Atividade hemolítica da fração protéica 0-80 e das folhas de *Daucus carota* fresca, branqueada e cozida (%).

Conc.	Fração 0-80			Folha fresca			Folha branqueada			Folha cozida		
	A	B	O	A	B	O	A	B	O	A	B	O
1 µg	0	0	0	0	0	0	0	0	1,90	0	0	0
10 µg	0	0	0	0	0	0	3,29	0	3,91	0	0	0
100 µg	0	0	2,20	0	0	0	5,92	8,01	5,81	0	0	0
1000 µg	0	0	4,40	0	0	0	6,69	50,78	8,65	0	0	0