



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



GIULIAN CÉSAR DA SILVA SÁ

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL, ANTINUTRICIONAL, BIOQUÍMICA E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE SEMENTES DE *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

João Pessoa – PB

2017



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



GIULIAN CÉSAR DA SILVA SÁ

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL, ANTINUTRICIONAL, BIOQUÍMICA E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE SEMENTES DE *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientador: Professor Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha

João Pessoa – PB

2017



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



GIULIAN CÉSAR DA SILVA SÁ

Dissertação de Mestrado avaliada e **APROVADA** em **19 de maio de 2017**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha
Universidade Federal da Paraíba
Orientador

Prof. Dr. Davi Felipe Farias
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo

Prof. Dra. Daniela Priscila Marchi-Salvador
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna

Dedicatória

À mainha, painho, meu irmão, vovó e aos meus amados.

Ao universo.

Àqueles que domam suas almas.

Àqueles que buscam conhecimento.

Àqueles que acreditam em seus potenciais.

Àqueles que vivem com o propósito de melhorar o que julgam ser.

Àqueles que, acima de tudo, dão o melhor de si (antes de pensar em si), buscando a personificação diária daquilo que foram ontem.

Por que não, àqueles que duvidam do quão capazes são?

Aos líderes.

Aos vultos perdidos na/pela história, que deixaram cicatrizes na humanidade através do servir.

Sem esquecer, claro, àqueles que reconhecem o outro como uno, dentre as multiplicidades de formas que este pode ser (e é).

Ao mim, ao tu, ao ele (agênero), ao vivo.

Dedico.

INVICTUS

William Ernest Henley (1875-1888)

Dentro da noite que me rodeia
Negra como um poço de lado a lado
Agradeço aos deuses que existem
Por minha alma indomável.

Sob as garras cruéis das circunstâncias
Eu não tremo e nem me desespero
Sob os duros golpes do acaso
Minha cabeça sangra, mas continua erguida.

Mais além deste lugar de lágrimas e ira,
Jazem os horrores da sombra.
Mas a ameaça dos anos,
Me encontra e me encontrará, sem medo.

Por mais estreita a minha senda, eu não declino
Nem por mais pesada a mão que o mundo espalma,
Eu sou o senhor de meu destino
Eu sou o capitão de minha alma.

Agradecimentos

A **Deus**, pelo dom da vida e pela sapiência propiciada; por ser forma e fonte da vida.

Aos meus pais, **Rubenilda Dantas** e **Geraldo Sá**, por serem meus maiores motivadores em tudo que me proponho a fazer, sendo-me base, fortaleza e inspiração diárias. Agradeço por cada “não” dito e por cada “eu lhe apoio”; cresci muito. Ao meu irmão, **Giulio Sá**, que, apesar das discussões (e resistência em assumir), há amor; sei que há. Meu amor à vocês é imensurável!

Aos meus familiares, em especial meus avós paternos (**Francisca Sá** e **Raimundo Felizmino**) e avós maternos (**Francisca Dantas** e **Francisco Evangelista**), pelo amor e apoio; primos, primas, tios e tias. Amo muito vocês.

Aos meus sinceros amigos, que muito orgulho em dizer que os tenho (**Ivolete Dantas**, **Ivolenne Dantas**, **Thais de Fátima Sá**, **Symone Oliveira**, **Anna Cynthia Oliveira**, **Ronney Sá**, **Geanny Alves**, **Monisse Sá** e **Francisca Rocha**). Obrigado por continuarem vívidos, mesmo em minha ausência.

Novamente à Deus, por me permitir conhecer pessoas incríveis ao longo desses dois (sofridos) anos de pós-graduação. A **Áthina Cruz** e **Laísa Vilar** por serem minhas companheiras nos meses iniciais aqui em João Pessoa, foi uma época difícil, porém prazerosa ao lado de vocês; aos meus companheiros de sofrimento **Francielly Negreiros** e **Aleson Sousa**, vejam só o quanto crescemos, nunca pensei que fôssemos chegar tão longe e aprender com nossas escolhas, vocês são incríveis; a **Diana Pontes** e **Sarah Ferreira**, pelos “chás” e risadas constantes mesmo com sofrimentos diários (OLHA O DOUTORADO AÍ, GALERA); a **Larissa Rodrigues** e **Angélica Cardoso** pela companhia nas tardes e noites pessoenses; a **Vanessa Cavalcanti**, **Raiana Boni**, **Mayara Karla**, **Mayara Cecile**, **Natanael Dantas**, e demais, por viverem comigo momentos únicos; JAMAIS ESQUECEREI DE VOCÊS!

Ao LaProGeR ou BioProtE (LaProtE + BioGer-Lab) e a seus estagiários mais legais (fofinhos), **Matheus Augustus** e **Carlos Maia** por me instruírem na fase inicial de mestrado, dedicando de muitas de suas tardes para ensinar as técnicas desta pesquisa; além de **Nathália**

Galvão, Thaís Susana, Kamila Bezerra, Annie Evelyn, Júlia Cajú, Isabel (Bel), Joice Nascimento, Francisco de Assis, Thaís Santos, Valgrícia Sousa (por sua “delicadeza” em me ajudar a quebrar as sementes), **Namíbia Kelly, Samara Montenegro, Bianca Barros, Mila Sousa, Natacha Oliveira e Samantha Lima.**

As doutorandas mais legais deste Departamento, **Paula Perazzo (Baronesa do Castelo Branco)** e **Edilza Nascimento (“Irmão”)**, MUITO OBRIGADO PELA ORIENTAÇÃO!!! Vocês me socorreram em vários momentos difíceis da pesquisa; sempre acessíveis à me ajudar.

Ao **Rotaract Club (João Pessoa Bancários e São João do Rio do Peixe) D. 4500**, um programa ímpar, que me orgulho em fazer parte. É nele onde me personifico enquanto humano, expando meus potenciais e fortaleço minha liderança. Em especial, aos meus AMIGOS, que, prazerosamente, João Pessoa me deu e levarei para a eternidade, **Clayton Liberal, Vanessa Meira, Kayo Queiroga, Olívia Costa e Patrick Paiva**, pelo amor, pela companhia, pelas conversas ou por simplesmente existirem; amém V.A.L.E.

Aos meus eternos amigos do ensino médio e graduação, que sempre me fortalecem com seus discursos de amor e reciprocidade. Aos amigos que fiz durante a condição de professor do MaisMED/PreparaMED, por sempre acreditarem em meu potencial (feliz sou ao ver o quão longe vocês estão chegando). Aos meus grandes mestres e amigos da graduação (**Dra. Arisdélia Feitosa, Esp. Rosana Alencar e Dr. Éder Freire**) e pós-graduação (**Dra. Daniela Marchi-Salvador e Dr. Davi Farias**), sem seus ensinamentos e conversas não seria o profissional que hoje sou/estou.

Ao meu grande amigo, **Fernando Cardoso**, por me acolher em sua casa e permitir tornar-se sua família aqui em João Pessoa. Nunca esquecerei toda a ajuda que a mim foi dada, meu amigo. À mala (**Guilherme Nelo**) e ao pacote (**Kayo Kennedy**) do apartamento 101, por nunca me deixarem desanimar ou entristecer, pelos momentos únicos de diversão.

Ao meu orientador, **Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha**, por acreditar em meu potencial quando concedeu-me a carta de orientação e pelos questionamentos diários, que me faziam refletir, ao longo desses anos. A quem estendo agradecimentos à **Dra. Tatiane Santi Gadelha**, pelas valiosas sugestões em química de proteínas, orientações e por estar à frente à

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, permitindo sua continuidade.

À **Dona Regina Emy**, por ser um exemplo de mulher e funcionária pública, sua responsabilidade e compromisso conosco (mestrandos) foi louvável. A qual estendo os agradecimentos à **Ludmila Maul**, pelas contribuições enquanto secretária, no início do mestrado.

Às professoras **Dra. Edeltrudes Lima** (pela realização das análises microbiológicas), **Dra. Krystyna Gorlach-Lira** (pelo apoio estrutural, cedendo seu laboratório para execução de parte dos experimentos), **Dra. Maria Lúcia da Conceição** (pela realização das análises de fibras), **Dra. Marta Madruga** (pela realização das análises de ácidos graxos), **Dra. Maria Teresa Bertoldo** (pela realização das análises de aminoácidos), à **Dra. Sinara Fragoso** (pelas análises da composição química parcial) e ao **LaCom** (pela concessão de seus laboratórios para execução de parte dos experimentos), pelo apoio à pesquisa e por serem sempre solícitos quando mais precisei.

À Universidade Federal da Paraíba, pelo apoio institucional, ao Instituto UFPB de Desenvolvimento da Paraíba (IDEP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo constante apoio ao Laboratório de Proteômica Estrutural (LaProtE) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPgBCM), que me permitiu crescer (este último), tanto pessoal (principalmente em face dos valores humanos que solidifiquei) quanto profissional.

A tudo e a todos, muito obrigado!

Resumo

Sesbania virgata é um arbusto pertencente a família *Leguminosae*, cujo fruto apresenta sementes com elevados teores proteicos. Considerando o potencial de uso dessa espécie como ferramenta biotecnológica, objetivou-se caracterizar nutricional, antinutricional e bioquimicamente as sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., bem como avaliar extratos e frações proteicas quanto a presença de algumas atividades biológicas de interesse médico e farmacológico. Para tal, sementes de *Sesbania virgata* foram coletadas na cidade de João Pessoa, Paraíba, e tiveram suas características morfo-físico-químicas determinadas. Posteriormente, as sementes foram delipidadas, processadas e solubilizadas em soluções extratoras, obtendo-se 30 extratos e 10 frações proteicas, permitindo a caracterização dos fatores antinutricionais, do perfil proteico e aminoacídico, e atividades biológicas. As características nutricionais da farinha enfatizaram seu elevado teor protéico. A otimização da produção dos extratos e frações permitiu a obtenção do extrato bruto total (EBT), a purificação da fração proteica com atividade lectínica (FPAL) e a determinação de fatores antinutricionais diversos. As análises proteicas revelaram 60,79% de proteína total para a farinha fina (FF), 49,34% para EBT e 55,84% para FPAL. Com massas moleculares entre 31-225 kDa, FF, EBT e FPAL apresentaram atividade antioxidante. Contudo, não apresentaram atividade antibacteriana contra as cepas investigadas, mas promoveram a inibição de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium citrinum*. Ressalta-se, além do elevado teor proteico e atividades biológicas apresentados, a importância em incorporar novas análises aos produtos para que, futuramente, apresentem viabilidade de implementação na alimentação ou na indústria farmacêutica, mediante criação de fármacos tópicos para controle da contaminação fúngica ou redução dos danos causados à saúde humana pelos radicais livres e outros oxidantes.

Palavras-chave: *Sesbania virgata*. Valor Nutricional. Atividade Lectínica. Componentes Fitoquímicos. Atividade Antioxidante. Atividade Antifúngica.

Abstract

Sesbania virgata is a shrub belonging to a family *Leguminosae* whose fruit presents seeds with high protein content. Considering the potential of use of this species as a biotechnological tool, the objective this paper was to characterize the seeds of *S. virgata* (Cav.) Pers., as well as evaluate extracts and fractions for a presence of some biological activities of medical and pharmacological interest. For this, *S. virgata* seeds were collected in the city of João Pessoa, Paraíba, and had their morpho-physical-chemical characteristics determined. Afterwards, the seeds were delipidated, processed and solubilized in extractive solutions, obtaining 30 extracts and 10 protein fractions, allowing a characterization of the antinutritional factors; protein and amino acid profile; and biological activities. The nutritional characteristics of the seed flour emphasize its high protein content. The optimization of the production of extracts and fractions allowed obtaining the total crude extract (EBT), purification of the protein fraction with lectin activity (FPAL) and the determination of several antinutritional factors. The protein analyzes revealed 60.79% of total protein for the fine flour (FF), 49.34% for EBT and 55.84% for FPAL. With molecular weights between 31-225 kDa, FF, EBT and FPAL presented antioxidant activity. However, they did not present antibacterial activity against the strains investigated, but promoted the inhibition of *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum*. In addition to the high protein content and biological activities, it is important to incorporate new analyzes into the products so that, in the future, they will be viable in the food or pharmaceutical industry, by creating of topical drugs to control fungal contamination or reduction of the damage caused to human health by free radicals and other oxidants.

Key words: *Sesbania virgata*. Nutritive Value. Lectin Activity. Phytochemical Compound. Antioxidant Activity. Antifungal Activity.

Lista de Abreviaturas

AACC – *American Association of Cereal Chemists*
ABTS^{•+} – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AHA – *American Heart Association*
AN – Agar Nutrient
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*
APG (I, II, III e IV) – *Angiosperm Phylogeny Group*
ASD – Agar Sabouraud Dextrose
EBT – Extrato Bruto Total
BHI – Caldo “*Brain Heart Infusion*”
Ca⁺² – Íons Cálcio
CAA – Capacidade de Absorção Aquosa da Semente
CEUA – Comitê de Ética de Uso de Animais
CG – Cromatografia Gasosa
CH – Capacidade de Hidratação da Semente
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CRD – *Carbohydrate Recognition Domain*
DIC – Detector de Ionização de Chama
DL-BApNA – DL-benzoyl-arginina-para-nitroanilida
DPPH[•] – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DRC – Domínio Reconhecedor de Carboidratos
EB – Extrato Bruto
EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FDT – Fibra Dietética Total
FeCl₃ – Cloreto Férrico
FF – Farinha Fina
FPAL – Fração Proteica com Atividade Lectínica
HCl – Ácido Clorídrico
HFF – Homogeneizado da Farinha Fina
IAA – Índice de Absorção da Farinha em Água

IAAf – Índice de Absorção Aquosa pela Farinha
IAAg – Índice de Absorção Aquosa da Semente
IHg – Índice de Hidratação da Semente
IP – Inibidor de Protease
ISA – Índice de Solubilidade da Farinha em Água
ISAf – Índice de Solubilidade da Farinha em Água
Kcal – Quilocaloria
kDa - QuiloDalton
mA – Miliampère
mg – Miligrama
Mg²⁺ – Íons Magnésio
mgP/mgF – Miligrama de Proteína/miligrama de Farinha
mgP/mL – Miligrama de Proteína/mililitro
MgSO₄ – Sulfato de Magnésio
mL – Mililitro
Mn⁺²⁺ – Íons Manganês
N – Normal (unidade de medida)
NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio
NC-IUBMB – *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*
NaCl – Cloreto de Sódio
NaOH – Hidróxido de Sódio
nm – Nanômetros (comprimento de onda)
°C – Graus Celsius
PA – Padrão Analítico
pH – Potencial Hidrogeniônico
SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*
SDS-PAGE – *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulfate*
SE – Solução de Extração
SG – Sesbania gum
TCA – *Trichloroacetic acid*
U.I.T. – Unidade de Inibidor de Tripsina
UH – Unidades Hemaglutinantes
WHO – *World Health Organization*

WHO/FAO/UNU – *World Health Organization/Food and Agriculture Organization/United Nations University*

μL – Microlitro

Lista de figuras e gráficos

Figura 1 – Relações filogenéticas das ordens e algumas famílias de angiospermas demonstradas na árvore de consenso resumo da <i>Angiosperm Phylogeny Group IV</i>	20
Figura 2 – Relações filogenéticas de <i>Mimosoideae</i> e <i>Papilionoideae</i> com o grupo parafilético <i>Caesalpinioideae</i> , baseadas em análises moleculares.....	22
Figura 3 – Classificação das lectinas com base em sua organização estrutural.....	29
Figura 4 – Infrutescência de <i>Sesbania virgata</i>	39
Figura 5 – Local de coleta das sementes de <i>Sesbania virgata</i>	43
Figura 6 – Obtenção dos extratos e frações proteicas de sementes de <i>Sesbania virgata</i>	57
Figura 7 – Perfil eletroforético das proteínas presentes na farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica, obtidos de sementes de <i>Sesbania virgata</i> por meio de SDS-PAGE (12,5%).....	94
 Gráfico 1 – Atividade antioxidante do homogeneizado da farinha fina de sementes de <i>Sesbania virgata</i> , determinada pelos métodos de captura dos radicais livres ABTS ^{•+} e DPPH [•]	99
Gráfico 2 – Atividade antioxidante do extrato bruto total de sementes de <i>Sesbania virgata</i> , determinada pelos métodos de captura dos radicais livres ABTS ^{•+} e DPPH [•]	100
Gráfico 3 – Atividade antioxidante da fração proteica com atividade lectínica de sementes de <i>Sesbania virgata</i> determinada pelos métodos de captura dos radicais livres ABTS ^{•+} e DPPH [•]	100

Lista de tabelas

Tabela 1 – Parâmetros morfo-físico-químicos das sementes e vagens de <i>Sesbania virgata</i> ...	70
Tabela 2 – Composição química parcial e valor energético das sementes de <i>Sesbania virgata</i>	74
Tabela 3 – Perfil de ácidos graxos totais presentes nas sementes de <i>Sesbania virgata</i>	78
Tabela 4 – Determinação da atividade lectínica dos extratos obtidos da farinha de sementes de <i>Sesbania virgata</i> em função do tempo de agitação magnética e solução de homogeneização (NaCl 0,15 mol.L ⁻¹).....	80
Tabela 5 – Determinação da atividade lectínica dos extratos obtidos da farinha de sementes de <i>Sesbania virgata</i> em função do tempo de agitação magnética e solução de homogeneização (solução de extração).....	81
Tabela 6 – Determinação da atividade lectínica manifestada em homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total (liofilizado e não-liofilizado) e frações proteicas obtidos pelo método de Osborne e por precipitação em sulfato de amônio.....	83
Tabela 7 – Efeitos da agitação magnética na determinação da atividade residual/antitriptica e o número de unidade inibitória de tripsina nos diferentes extratos brutos, obtidos de farinha de sementes de <i>Sesbania virgata</i>	85
Tabela 8 – Determinação da atividade residual/antitriptica e o número de unidade inibitória de tripsina por grama de amostra no homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e frações obtidos pelo método de Osborne e por precipitação em sulfato de amônio.....	86
Tabela 9 – Determinação qualitativa de componentes fitoquímicos e amido em homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica, obtidos da farinha de sementes de <i>Sesbania virgata</i>	88
Tabela 10 – Teores de proteína solúveis presentes nos diferentes extratos brutos obtidos da farinha de sementes de <i>Sesbania virgata</i>	90
Tabela 11 – Teores de proteínas solúveis presentes no homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total (liofilizado e não-liofilizado) e frações proteicas obtidos pelo método de Osborne e por precipitação em sulfato de amônio.....	92
Tabela 12 – Teor de proteína total presente na farinha fina, extrato bruto total e fração protéica com atividade lectínica, obtidos de sementes de <i>Sesbania virgata</i>	93
Tabela 13 – Composição de aminoácidos totais (mg aminoácido/g proteína ⁻¹) presentes na farinha fina e na fração proteica com atividade lectínica de <i>Sesbania virgata</i>	97
Tabela 14 – Determinação da concentração inibitória mínima (µg/mL) do homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica sobre algumas leveduras e fungos filamentosos.....	103
Tabela 15 – Concentração inibitória mínima (µg/mL) do homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica sobre algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	105

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 O Cenário da flora mundial e brasileiro: possibilidades e aplicabilidades.....	19
1.2 A Família <i>Leguminosae</i>.....	21
1.3 Características nutricionais de sementes de leguminosas.....	23
1.4 Fatores antinutricionais presentes em vegetais.....	26
1.4.1 Fatores antinutricionais de origem não-protéica presentes em vegetais.....	26
1.4.2 Fatores antinutricionais de origem protéica presentes em vegetais.....	28
1.5 O gênero <i>Sesbania</i>.....	36
1.6 <i>Sesbania virgata</i>.....	37
1.7 Atividades biológicas manifestadas por sementes de leguminosas.....	40
2 OBJETIVOS.....	42
2.1 Objetivo Geral.....	42
2.2 Objetivos Específicos.....	42
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 Material biológico.....	43
3.2 Demais materiais e reagentes.....	44
3.3 Análises morfo-físico-químicas das sementes e vagens de <i>Sesbania virgata</i>.....	44
3.3.1 Densidade das sementes.....	45
3.3.2 Peso individual, de 100 e de 1000 sementes.....	45
3.3.3 Espessura, largura e comprimento das sementes.....	45
3.3.4 Peso individual da vagem com sementes e peso de 100 vagens com sementes.....	46
3.3.5 Número de sementes por vagem.....	46
3.3.6 Espessura, largura e comprimento da vagem.....	46
3.3.7 Capacidade de hidratação das sementes (CH).....	46
3.3.8 Capacidade de absorção aquosa das sementes (CAA).....	47
3.3.9 Índices de hidratação (IHg) e de absorção aquosa (IAAg) das sementes.....	48
3.3.10 Índices de absorção aquosa pela farinha (IAAf) e solubilidade da farinha em água (ISAf).....	48
3.3.11 Teor de clorofila (a, b e total) e de carotenoides totais.....	49
3.4 Caracterização química parcial e valor energético das sementes de <i>Sesbania virgata</i>.....	50

3.4.1 Determinação de umidade.....	50
3.4.2 Determinação de cinzas totais.....	51
3.4.3 Determinação de proteínas pelo método de micro-Kjeldahl.....	51
3.4.4 Determinação de lipídeos.....	53
3.4.5 Teor de fibras brutas.....	53
3.4.6 Matéria seca e matéria orgânica.....	54
3.4.7 Valor energético.....	54
3.5 Perfil de ácidos graxos totais das sementes de <i>Sesbania virgata</i>.....	55
3.6 Processamento das sementes e obtenção dos extratos e frações.....	55
3.6.1 Fracionamento protéico pelo método de Osborne (1924).....	57
3.6.2 Precipitação proteica em sulfato de amônio.....	58
3.7 Caracterização antinutricional do homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica obtidos da farinha de sementes de <i>Sesbania virgata</i>.....	58
3.7.1 Fatores antinutricionais de origem protéica.....	58
3.7.1.1 Lectinas.....	58
3.7.1.2 Inibidores de tripsina.....	59
3.7.2 Fatores antinutricionais de origem não-protéica e amido.....	60
3.7.2.1 Taninos pirogálicos e catéquicos.....	61
3.7.2.2 Saponinas.....	61
3.7.2.3 Antocianinas, antocianidinas, catequinas, flavononóis, flavononas e flavonoides.....	61
3.7.2.4 Flavonóis, flavonas e xantonas.....	61
3.7.2.5 Leucoantocianidinas.....	62
3.7.2.6 Esteroides e triterpenos.....	62
3.7.2.7 Amido.....	62
3.8 Análise protéica e aminoacídica.....	62
3.8.1 Determinação do teor de proteínas solúveis.....	62
3.8.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em condições redutoras (SDS-PAGE).....	63
3.8.3 Determinação do perfil de aminoácidos totais.....	63
3.9 Atividades biológicas.....	64
3.9.1 Atividade sequestrante de radicais livres.....	64
3.9.1.1 Método de captura do radical livre ABTS ^{•+}	64
3.9.1.2 Método de captura do radical livre DPPH [•]	65
3.9.2 Ensaio microbiológicos.....	66

3.9.2.1 Atividade antifúngica.....	66
3.9.2.2 Atividade antibacteriana.....	67
3.10 Análises estatísticas.....	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1 Análises morfo-físico-químicas das sementes e vagens de <i>Sesbania virgata</i>.....	69
4.2 Composição química parcial e valor energético das sementes de <i>Sesbania virgata</i>.....	73
4.3 Perfil de ácidos graxos totais das sementes de <i>Sesbania virgata</i>.....	77
4.4 Caracterização antinutricional dos extratos brutos, do homogeneizado da farinha fina e demais frações proteicas obtidas da farinha de sementes de <i>Sesbania virgata</i>.....	79
4.4.1 Fatores antinutricionais de origem protéica.....	79
4.4.1.1 Atividade lectínica.....	79
4.4.1.2 Atividade antitriptica.....	84
4.4.2 Fatores antinutricionais de origem não-protéica e amido.....	87
4.5 Análise protéica e aminoacídica de <i>Sesbania virgata</i>.....	89
4.5.1 Determinação do teor de proteínas solúveis presentes nos extratos, homogeneizado da farinha fina, fração proteica com atividade lectínica e demais frações proteicas obtidos da farinha de sementes de <i>Sesbania virgata</i>	89
4.5.2 Teor de proteínas totais presentes na farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica, obtidos de sementes de <i>Sesbania virgata</i>	92
4.5.3 Estimativa da massa molecular aparente por SDS-PAGE das proteínas presentes na farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica, obtidos de sementes de <i>Sesbania virgata</i>	93
4.5.4 Análise do perfil de aminoácidos totais da farinha fina e fração proteica com atividade lectínica, obtidas de sementes de <i>Sesbania virgata</i>	95
4.6 Atividades biológicas.....	98
4.6.1 Atividade sequestrante de radicais.....	98
4.6.2 Atividade antifúngica.....	102
4.6.3 Atividade antibacteriana.....	104
5 CONCLUSÕES.....	108
Referências.....	109
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Cenário da flora mundial e brasileira: possibilidades e aplicabilidades

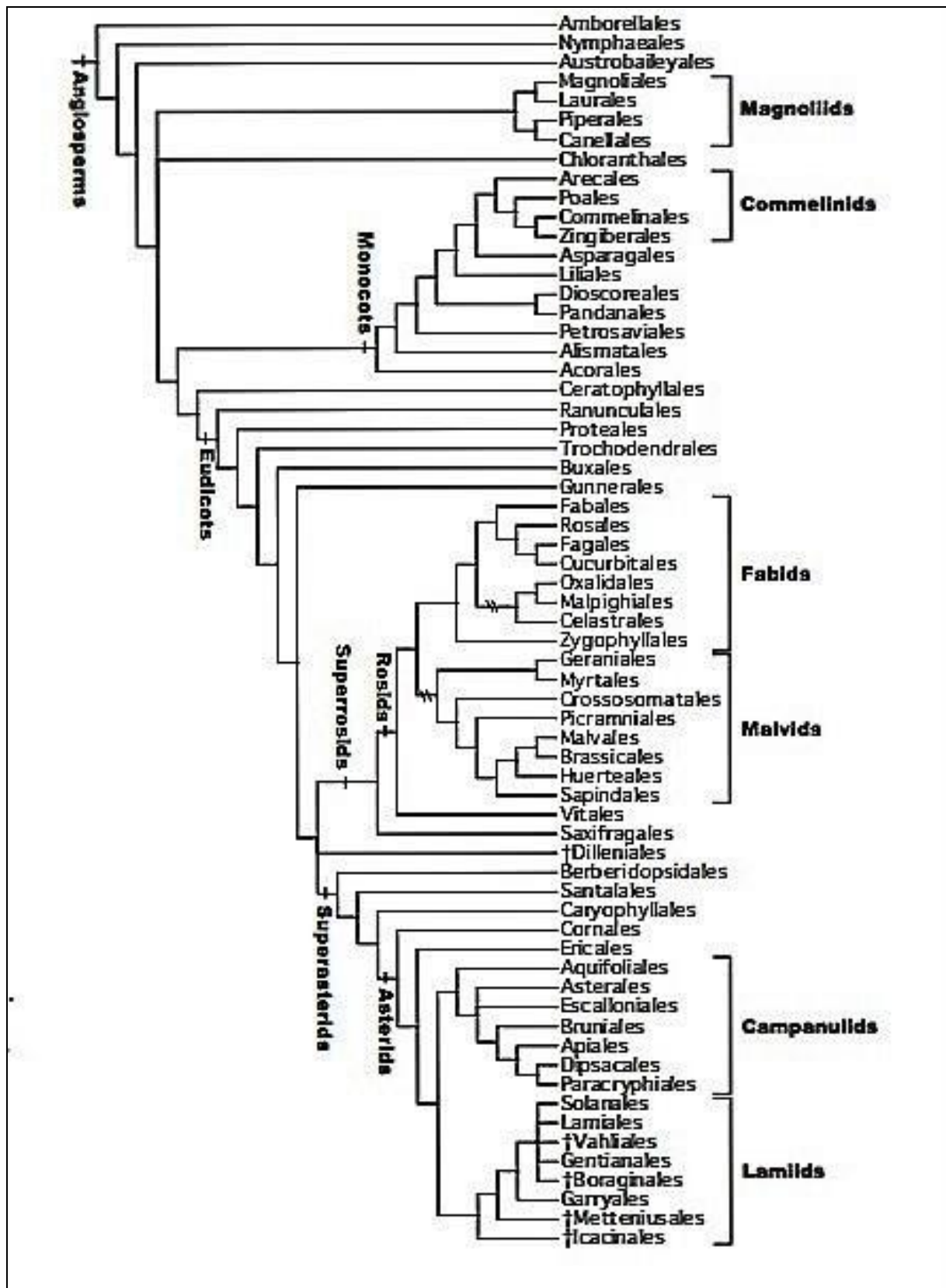
O interesse em estimar a riqueza da flora mundial é datado desde 1753, quando Linnaeus acreditava que a biodiversidade vegetal global perfazia cerca de 10 mil espécies descritas. Número esse que, a cada ano, vem aumentando em face da descoberta e catalogação de novas espécies no *Angiosperm Phylogeny Group* (APG), um sistema de classificação de plantas com flores, inicialmente publicado em 1998 (APG I). Com intervalo de alguns anos, são publicadas versões atualizadas dessa organização taxonômica, a saber: APG II (2003) e APG III (2009). Byng et al. (2016) trazem-nos que, na versão mais atualizada dessa classificação, APG IV (2016), as angiospermas representam um montante de 64 ordens e 416 famílias, contemplando todos os ecossistemas naturais do globo (**Figura 1**).

No que diz respeito aos 8.514.877 km² de área delimitada – cuja maior parte se encontra entre o trópico de Capricórnio e a linha do Equador (5°16'N – 33°45'S, 34°47'W – 73°59'W) –, o Brasil configura-se como um país extremamente biodiverso, com altitude que varia desde terras ao nível do mar até índices que atingem 3.014 m, como o Pico da Neblina. É possível demarcar seis grandes Domínios Fitogeográficos Brasileiros¹: a Amazônia (que ocupa 49,29% do território), o Cerrado (23,92%), a Mata Atlântica (13,04%), a Caatinga (9,92%), o Pampa (2,07%) e o Pantanal (1,76%). Destes, apenas a Caatinga, com seus 844.453 km² de clima semiárido, é o único domínio fitogeográfico exclusivamente brasileiro (FORZZA et al., 2010-a).

O Brasil apresenta 40.989 espécies vegetais descritas, sendo que 76% é representado pelas angiospermas. No tocante ao endemismo, o Brasil apresenta 18.932 espécies endêmicas, uma das maiores taxas de endemismo do planeta (46,2%) (FORZZA et al., 2010-a). Já foram descritas 41 famílias e 8.016 espécies de monocotiledôneas (3.557 endêmicas). Por outro lado, já foram catalogadas 19.560 espécies de eudicotiledôneas (5.568 endêmicas), distribuídas em 1.871 gêneros (171 endêmicos) (GIULIETTI, 2005).

¹ Dados obtidos no Senso de 2010, gerido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Figura 1 – Relações filogenéticas das ordens e algumas famílias de angiospermas demonstradas na árvore de consenso resumo da *Angiosperm Phylogeny Group IV*



Fonte: Byng et al. (2016).

Os 30 maiores gêneros de angiospermas brasileiras somam 6.380 espécies, o que representa 19,5% da diversidade total desse grupo. Já as 10 maiores famílias (*Fabaceae*, *Orchidaceae*, *Asteraceae*, *Rubiaceae*, *Melastomataceae*, *Bromeliaceae*, *Poaceae*, *Myrtaceae*, *Euphorbiaceae* e *Malvaceae*) contribuem com 47,2% (15.404 espécies) do total de espécies de angiospermas existentes; sendo que, destas, 9.593 espécies são endêmicas. A ocorrência de plantas com sementes nos biomas brasileiros é também diversa, destacando-se a Mata Atlântica com o maior número de espécies (15.001 nativas e 7.432 endêmicas), seguido pelo Cerrado (12.097 nativas e 4.252 endêmicas), Floresta Amazônica (11.896 nativas e 1.900 endêmicas), Caatinga (4.657 nativas e 913 endêmicas), Pampa (1.685 nativas e 102 endêmicas) e Pantanal (1.277 nativas e 54 endêmicas) (ZAPPI et al., 2015).

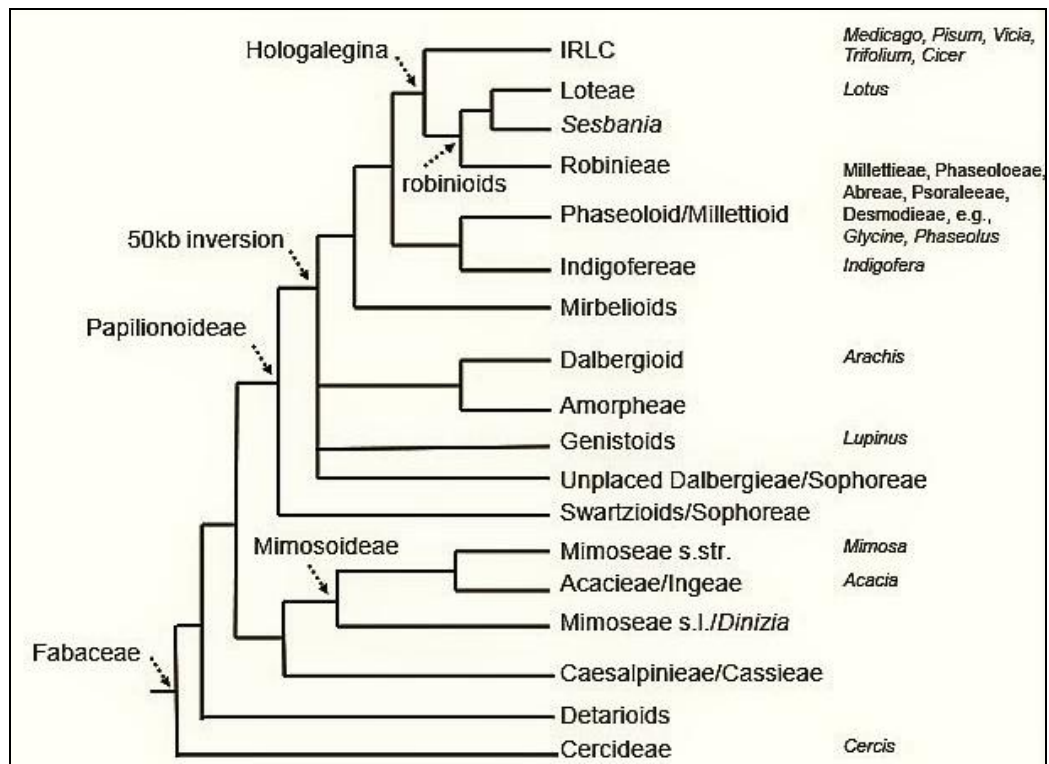
Dentre as dez famílias supracitadas, a *Fabaceae* é a que comporta a maior diversidade na Amazônia e na Caatinga; a *Poaceae* é a segunda com maior diversidade na Caatinga e no Pampa; a *Rubiaceae* é a quinta mais diversa na Caatinga; e a *Orchidaceae* figura-se como a família mais importante da Mata Atlântica, aparecendo em décimo lugar na Caatinga no tocante a diversidade (ZAPPI, et al., 2015).

1.2 A Família *Leguminosae*

A família *Leguminosae* (sob sinonímia, *Fabaceae*), quando comparadas a *Asteraceae* (23.000 espécies) e *Orchidaceae* (22.000 espécies) (DOYLE e LUCKOW, 2003; YAHARA et al., 2013), é a terceira maior família de plantas vasculares com flores (MARIKE et al., 2016), com 145 subclados, 737 gêneros e 19.638 espécies descritas². As leguminosas são organizadas, com base nas diferenças morfológicas das peças florais de seus representantes, em três subfamílias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae*. Análises filogenéticas moleculares mostram que *Mimosoideae* e *Papilionoideae* compreendem um grupo monofilético, organizado dentro do grupo parafilético *Caesalpinioideae* (**Figura 2**), aos quais englobam espécies de feijões, como *Phaseolus lunatus* e *Vigna savi* (YAHARA et al., 2013).

² **Filogenia das Leguminosas.** Disponível em: <http://www.kew.org/science-conservation/research-data/resources/legumes-of-the-world/clade/leguminosae>. Acesso em 29 Dez. 2016.

Figura 2 – Relações filogenéticas de *Mimosoideae* e *Papilionoideae* com o grupo parafilético *Caesalpinioideae*, baseadas em análises moleculares



Fonte: Yahara et al. (2013), modificado de Wojciechowski et al. (2004).

As leguminosas distribuem-se por pastagens abertas das planícies, áreas dulcícolas ou no mar, estepes, regiões montanhosas, manguezais, florestas de turfeiras ou sazonais, savanas e por desertos (PELIKAN, 1979; PRADO, 2000). Compreendendo vários habitats, com distribuição quase cosmopolita, podem ser encontradas em regiões semi-áridas e tolerantes ao fogo, florestas tropicais sazonalmente secas, savanas, bosques ou em ambientes temperados dos hemisférios (SCHRIRE, LEWIS e LAVIN, 2005; SCHRIRE et al., 2009).

Com tamanha diversidade de espécies e habitats, as leguminosas propiciam o refúgio de inúmeros artrópodes, principalmente insetos herbívoros (SOUTHGATE, 1979; HARMON, MORAN e IVES, 2009); o estabelecimento de relações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio (VEASEY et al., 1997); e o provimento e acúmulo de carbono e nitrogênio nos ecossistemas (KNOPS e TILMAN, 2000; KNOPS, BRADLEY e WEDIN, 2002; SPEHN et al., 2002). Além de tais relações ecológicas, suas sementes e frutos contêm compostos fitoquímicos (DIXON e SUMNER, 2003) e são excelentes fontes de alimento, revelando sua importância nutricional e química.

1.3 Características nutricionais de sementes de leguminosas

O intento de cultivar cereais e algumas leguminosas é obter de grãos para consumo humano e/ou animal (LÓPEZ, 1994; CUBERO, 1994). Em especial, as sementes de leguminosas são importantes fontes de nutrientes, capazes de propiciar uma dieta rica em proteínas, carboidratos (amido e polissacarídeos de reserva da parede celular), vitaminas, minerais (TORRES, 2013) e lipídeos. Dentre as possibilidades de uso das leguminosas como subsídio alimentar, o feijão é o melhor exemplo; sendo bastante consumido pelos brasileiros – sete de dez brasileiros o consomem diariamente, podendo atingir um consumo anual de 19 quilos de feijão (BRASIL, 2016).

No que tange os aspectos nutricionais de leguminosas, os carboidratos configuram-se como os principais biopolímeros disponíveis e importantes ao metabolismo celular e indústria. Em leguminosas, os carboidratos aparecem como componentes da parede celular dos cotilédones e endospermas das sementes. Os carboidratos que compõem o sistema de reserva da parede celular, são comumente mobilizados após a germinação das sementes, onde os produtos formados servem como fonte energética e matéria-prima na histogênese (REID, 1985).

A celulose e o amido (constituído por amilose e amilopectina) são os principais carboidratos. Ambos são polímeros de alta massa molecular, constituídos por subunidades de glicose, unidas por ligações glicosídicas. Diferem em suas propriedades físico-químicas; enquanto as ligações glicosídicas características proporcionam uma estrutura helicoidal à celulose (ZEEMAN, KOSSMANN e SMITH, 2010), o amido é sintetizado sob a forma de grânulos hidrofóbicos com estrutura básica capaz de originar dois polímeros de unidades de D-glicose: amilose e amilopectina. A amilose compreende os glicanos com cadeias lineares formadas de ligações α 1-4, podendo conter de 200 a 2000 unidades monoméricas; a amilopectina se organiza através do arranjo dos polímeros de glicose entre os carbonos 1 e 6, formando estruturas altamente ramificadas de 20 a 25 unidades monoméricas (SHIMBATA et al., 2012; GUZMÁN et al., 2011).

Acredita-se na existência de uma terceira classe de amido, denominada material intermediário, cuja estrutura linear é produto das variações do tipo e nível de maturação do grânulo de amido (WANG et al., 1993) e é provida da associação de 50 a 200 unidades monoméricas levemente ramificadas, gerando uma estrutura de baixa massa molecular, com comprimento maior que a da cadeia de amilopectina (BILIADERIS, 1991).

Sua rigidez e insolubilidade em água tornam a celulose num importante componente esquelético nas plantas, já a ramificação da amilopectina faz desta um instrumento necessário ao metabolismo vegetal (ZEEMAN, KOSSMANN e SMITH, 2010). O amido é caracterizado, pela abundância na natureza, como componente de reserva energética das plantas superiores, representando de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem (CEREDA, 2001). No que concerne a biodisponibilidade do amido, têm-se os cereais como as principais fontes de amido (de 40 a 90% de seu peso seco), seguidos dos tubérculos (de 65 a 85% de seu peso seco) e das leguminosas (de 30 e 70% de seu peso seco) (LEONEL e CEREDA, 2002).

O amido é usado tanto como fonte energética, quanto na indústria alimentícia e farmacêutica. A gelatinização, colagem, textura, aparência, umidade, consistência, estabilidade e retrogradação são propriedades que só são possíveis quando os teores de amilose e amilopectina são perfeitamente relacionados, onde uma simples descompensação desses teores pode influenciar na adequação do amido para diferentes utilizações (ZENG et al., 1997; CERQUEIRA, 2012; SHIMBATA et al., 2012; GUZMÁN et al., 2011).

Os lipídeos são moléculas biológicas com insolubilidade em água, com três funções gerais aparentes. Primeira, são utilizados como reserva calórica e componentes necessários para a biogênese de membranas biológicas, devido ao seu estado relativamente reduzido, principalmente como triacilglicerol. Segunda, propiciam a característica anfipática das membranas celulares, o que permite que as primeiras células segreguem seus componentes internos do ambiente externo, além da evidente propriedade de proteção às membranas. Terceira, atuam como mensageiros celulares durante a transdução de sinais e nos processos de reconhecimento molecular (VAN MEER, VOELKER e FEIGENSON, 2008). Em vegetais, e os lipídeos acumulam-se em suas sementes, atuando tanto como reserva energética necessária à germinação quanto uma das formas de reserva para o desenvolvimento do embrião (SASAKI, 2008).

Fatores como adubação, tipo de solo e crescimento do vegetal interferem na viabilização desses nutrientes ao homem. Como estratégia de reparo, as sementes dispõem de inúmeros compostos que permitem sua absorção, diferenciando-se nos aspectos químicos e nas propriedades biológicas que estas oferecem, quando comparadas com as demais partes da planta (ABREU, 2015; CARVALHO e NAKAGAWA, 1993).

Em países em desenvolvimento, o consumo de sementes de leguminosas ocupa relevante posto na alimentação humana por se configurar como uma importante fonte de proteína, de fibra dietética e de amido de fácil acesso (THARANATHAN e MAHADEVAMMA, 2003). Em leguminosas, as proteínas de reservas fornecem aporte

aminoacídico e de nitrogênio (PHILLIPS, 1997). A *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) estima que há cerca de 800 milhões de pessoas ao redor do mundo que sofrem de subnutrição crônica como reflexo de uma alimentação insuficiente; pobre, muitas vezes, de uma base protéica fortalecida. Conhecendo sua importância na dieta humana, a alimentação ideal precisa de proteínas dietéticas passíveis de contemplar as demandas das diferentes idades e estados fisiológicos destes indivíduos (MOUGHAN, 2012).

As proteínas são constituídas de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas, constituindo um grupo complexo de macromoléculas capazes de se arranjar em uma ou mais cadeias polipeptídicas (WALSH, 2014). A qualidade nutricional que as proteínas podem oferecer, quando destinadas à alimentação, é determinada pelo cômputo químico, do teor total de nitrogênio, da digestibilidade, da influência dos fatores antinutricionais, da relação entre triptofano e aminoácidos neutros, além da proporção e biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais presentes em sua constituição (ALVES, ROCHA e GOMES, 2008; MARDINI-FILHO, 2014; VEGA-GÁLVEZ et al., 2010).

Ao que concerne o metabolismo protéico em humanos, sabe-se que é um processo altamente energético e seu consumo na dieta humana deve ser mediado pela ingesta de inúmeros outros substratos energéticos na tentativa de amparar todo o processo metabólico, pois o uso isolado de aminoácidos como promotores metabólicos à digestão não supre a demanda, em comparação com ácidos graxos e glicose (WU, 2016).

É possível obter tanto proteínas animais quanto vegetais. Porém, se analisadas como fontes de proteínas dietéticas, as proteínas vegetais são mais pobres (EVANS e BANDEMER, 1967) e caracterizam-se pelo desequilíbrio na proporção de resíduos de cisteína e metionina, necessários à dieta humana (MASSEY, 2003). As proteínas de leguminosas, classificadas por Osborne (1924), são organizadas de acordo com sua função biológica e relações bioquímicas e moleculares que estabelecem, categorizadas, portanto, em: i) *proteínas de reserva*, capazes de fornecer e armazenar nitrogênio, carbono e enxofre ao vegetal; ii) *proteínas estruturais* e metabólicas, requeridas no desenvolvimento da semente; e iii) *proteínas de proteção*, atuando contra o ataque de fitopatógenos ou patógenos microbianos, além de estresses bióticos, como dessecação (BUCKERIDGE et al., 2004).

O metabolismo das proteínas vegetais inicia-se com o desenvolvimento do embrião, seguida de reações de hidrólise totais ou parciais por proteases. Em sementes de eudicotiledôneas, a hidrólise enzimática inicia-se nos corpos proteicos, onde endopeptidases e carboxipeptidases clivam proteínas específicas para produzir polipeptídios de baixa massa molecular e elevada solubilidade, além de aminoácidos. Quando transportados para o

citoplasma, esses produtos serão clivados por aminopeptidases e peptidases, gerando mais aminoácidos, que serão convertidos em glutamina e asparagina. Ao fim do processo enzimático, os corpos proteicos (então vazios) serão fundidos, gerando grandes vacúolos. Nestes, a gênese e secreção de hidrolases intensifica-se, induzindo processos autofágicos e consequente senescência e degradação dos tecidos de reserva (TONINI, 2008).

No que tange os valores nutricionais que algumas sementes de leguminosas tendem a oferecer, percebe-se que as sementes de amendoim (*Arachis hypogaea*) têm se mostrado como boa fonte de fibras alimentares, lipídeos, proteínas e carboidratos, além de apresentarem riqueza mineralógica nos minerais cálcio e fósforo (INGALE e SHRIVASTAVA, 2011; ESHUN, AMANKWAH e BARIMAH, 2013). As sementes de soja (*Glycine max*) também dispõem de uma enfática quantidade de proteínas, lipídeos e carboidratos, apresentam ainda uma interessante disponibilidade de cinzas, lectinas, inibidores de tripsina, uréase, toxinas (VASCONCELOS et al., 2006) e oxalato (MASSEY, PALMER e HORNER, 2001).

1.4 Fatores antinutricionais presentes em vegetais

1.4.1 Fatores antinutricionais de origem não-protéica presentes em vegetais

Segundo a FAO³, os fatores antinutricionais são substâncias originadas durante o armazenamento ou processamento de alimentos que, diretamente ou através de seus produtos metabólicos, interferem na assimilação de um ou mais nutrientes. Eles podem ser classificados em relação à: sua *descrição química*, como proteínas (inibidores de protease e lectinas), glicosídeos (glicosinolatos, cianogênicos, saponinas e fatores estrogênicos), fenólicos (gossipol e taninos) ou diversos (antiminérmicos, anti-vitaminas, anti-enzimas, aminoácidos tóxicos e micotoxinas); seus *efeitos biológicos*, como fatores que afetam a utilização e a digestão de proteínas (inibidores de protease, taninos e lectinas), fatores que afetam a utilização mineral (ácido fítico, gossipol e glicosinolatos), antivitaminas ou diversos (mimosina, cianogênicos e fatores estrogênicos); além de sua *termoestabilidade*, como fatores sensíveis ao calor (inibidores de protease, ácido fítico, lectinas, glicosinolatos e anti-vitaminas) ou fatores resistentes ao calor (saponinas, polissacarídeos não amiláceos, proteínas anti-gênicos, estrogênicos e alguns compostos fenólicos).

³ **Principais fatores antinutricionais presentes em alimentos para peixes derivados de plantas** (FAO). Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/affris/feed-resources-database/major-anti-nutritional-factors-in-plant-derived-fish-feed-ingredients/en/>. Acesso em 02 Jun 2017.

Dentre os componentes com caráter antinutricional de origem não-protéica, destacam-se os compostos fenólicos, substâncias que apresentam um anel aromático com variável número de substituintes hidroxílicos e grupamentos funcionais capazes de mediar ações metabólicas importantes em vegetais (SARTORI, 2012).

Os taninos representam o segundo maior grupo entre os compostos químicos de natureza fenólica e o quarto constituinte mais abundante nos vegetais (PIZZI, 1993), geralmente classificados de acordo com sua estrutura química em dois tipos: hidrolisáveis e condensados. Os hidrolisáveis, representados pelo ácido tânico, são constituídos por 8 ou 10 moléculas de ácido gálico unidas pela glicose (NIE et al., 2017). Já os condensados, são proantocianidinas formadas através da união de uma unidade C-4 a uma unidade C-8 da catequina (PIOVESAN et al., 2017).

As propriedades antinutricionais dos taninos foram reconhecidas inicialmente em sementes utilizadas na alimentação, cuja interferência na digestibilidade proteica e redução na energia metabolizável foram comprovadas a partir da formação de um complexo indigerível com as proteínas presentes nos cotilédones. Estão, também, associados com a expressão das cores das sementes, à resistência das plantas contra fitopatógenos (ISLAM et al., 2003) e inibição do metabolismo de α -amilases, α -glucosidades, lipases pancreática e gástrica, tripsina e outras proteases (MCDOUGALL e STEWART, 2005).

As saponinas, outro fator antinutricional de origem não-proteica, apresentam-se estruturalmente como triterpenóides ou glicosídeos esteróides (GEVRENOVA et al., 2015). Enquanto as saponinas terpenóides são comumente encontradas em eudicotiledoneas, as saponinas esteróides são facilmente isoladas de monocotiledoneas (GÜÇLÜ-USTÜNDAĞ e MAZZA, 2007). Esses surfactantes naturais (saponinas) são anfifílicos, cuja parte hidrofílica contém inúmeros resíduos de carboidratos acoplados à parte hidrofóbica. Ademais, esses biocompostos têm afinidade de ligação ao colesterol presente na superfície de membranas, bem como capacidade hemolítica e tóxica (STANIMIROVA et al., 2011; CAMPBELL e PEERBAYE, 2012).

Os flavonóides são polifenóis com esqueleto de difenilpropano ($C_6C_3C_6$), formados pela associação de dois anéis aromáticos (anel A e anel B), unidos por um anel de pirona (anel C), além de hidroxilas, grupamentos polarizados e metoxilo ou glicosilo ligados em porções distintas dos anéis A e B (MA et al., 2011). As variações no núcleo flavano, especificamente no C3, originam flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanol, isoflavonas, chalconas, auronas e antocianidinas (TEILLET et al., 2008).

Algumas classes de leguminosas também são capazes de sintetizar flavonoides especializados, como isoflavonoides, 3-desoxantocianinas, flobafenos e estilbenos (FERREYRA, RIUS e CASATI, 2012). Esses flavonoides conferem as colorações características aos vegetais, sendo o pH e a luz fatores limitantes à sua biossíntese (MAZZA e BROUILLARD, 1990; WROLSTAD, DURST e LEE, 2005) uma vez que as antocianinas protegem os tecidos fotosintéticos do estresse oxidativo induzido pela luz sob condições estressantes. O grau de hidroxilação dos anéis aromáticos das antocianinas permitem sua diferenciação enquanto a acilação aromática permite a co-pigmentação intermolecular entre elas e outros compostos fenólicos, como flavonas e flavonóis (GLOVER e MARTIN, 2012).

1.4.2 Fatores antinutricionais de origem protéica presentes em vegetais

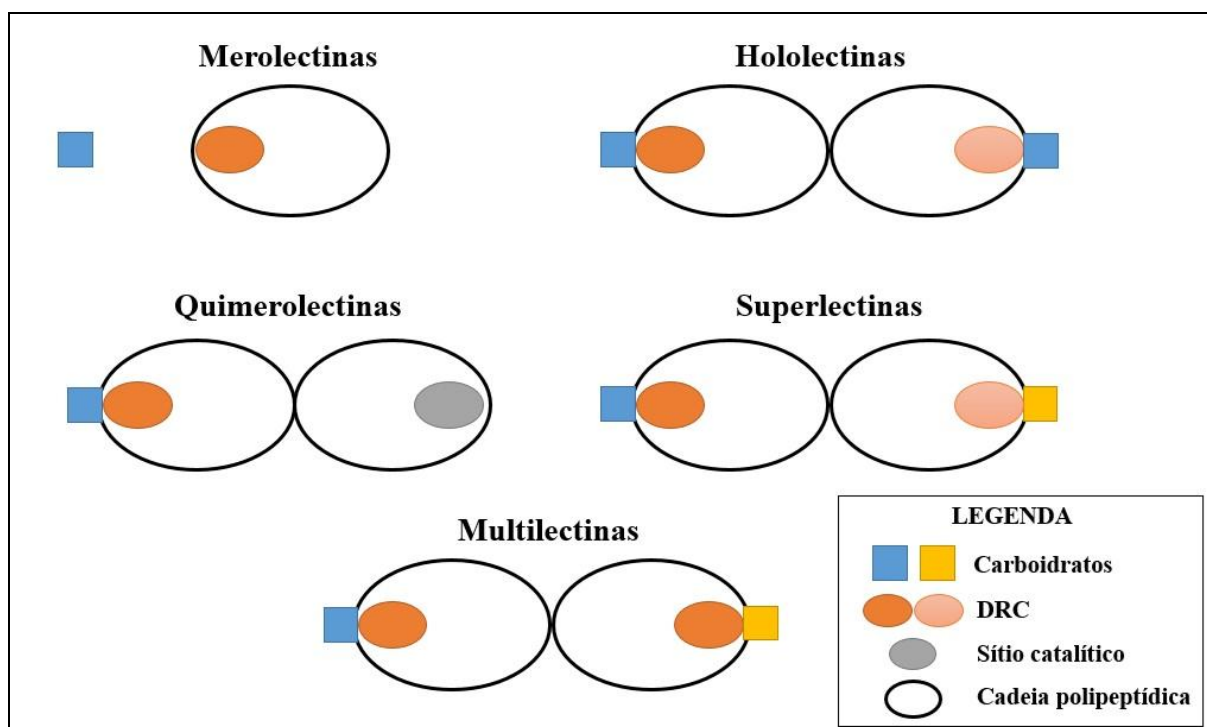
As lectinas são um dos fatores antinutricionais de origem protéica presentes em vegetais, cujo nome, proposto por William Boyd, em 1954, deriva do latim “*legere*”, que significa “selecionar” (SILVA, 2012), sendo também entendido por “para escolher; escolher para fora” (RÜDIGER, 1998).

Embora os primeiros estudos sobre lectinas datem do final do século XIX, há cerca de três décadas atrás elas ainda despertavam pouco interesse à sociedade (SHARON, 2007). A primeira elucidação que se tem registro é datada de 1888, quando um estudante de medicina, Hermann Stillmark, descreveu, na Univerdade de Dopart, Estônia, a ação de uma hemaglutinina – nomenclatura pouco usual⁴ dada às lectinas – em amostras de *Ricinus communis*. Essa caracterização foi motivada pela descoberta de um fator protéico tóxico presente nas sementes de mamona, com hábil capacidade de aglutinar eritrócitos; mais tarde chamado de ricina (RÜDIGER, 1998). Ele alegou que, durante a aglutinação, a lectina se unia com os estômatos; percepção confirmada por von Lieberman em 1907 e por Guyot, em 1909 (SUMNER e HOWELL, 1936).

Com base na estrutura global que as lectinas podem apresentar, Peumans e Van Dame (1995) propuseram uma classificação que as agrupam em três grandes grupos: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. Mais tarde, em 1998, uma nova classe de lectinas – as superlectinas – foi incluída nessa classificação (**Figura 3**).

⁴ Muito embora ainda existam grupos de lectinas que sejam reconhecidas por essa nomenclatura, como a aglutinina/lectina de soja (lectina de *Glycine max*) ou a aglutinina/lectina de amendoim (lectina de *Arachis hypogaea*) (RÜDIGER, 1998).

Figura 3 – Classificação das lectinas com base em sua organização estrutural



Os quadrados em tons amarelo e azul representam os carboidratos ou glicoconjugados que as lectinas podem se ligar; as elipses em tons de laranja e rosácea são os domínios reconhedores de carboidratos presentes nas lectinas; as elipses em tons de cinza são os domínios catalíticos presentes nas lectinas; e as elipses sem preenchimento são as cadeias polipeptídicas.

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

A classe das **Merolectinas** compreende o grupo de lectinas constituídas exclusivamente por uma única região específica a carboidratos, designada Domínio Reconhecedor de Carboidratos, DRC (CRD, *Carbohydrate Recognition Domain*), o que a torna menos complexa (são polipeptídeos individuais pequenos) que as demais classes. Devido a sua monovalência, apresenta baixa habilidade em precipitar glicoconjugados ou aglutinar células (PEUMANS e VAN DAME, 1995). A lectina presente no látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) é um exemplo dessa classe.

A classe das **Hololectinas** apresenta dois ou mais DRC, os quais são muito parecidos ou homólogos e se ligam ao mesmo tempo ao carboidrato; o que a torna mais complexa e capaz de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. A essa classe enquadram-se grande parte das lectinas vegetais conhecidas, efetivando-se como maiores detentoras àquelas isoladas de sementes da subtribo Diocleinae (PEUMANS e VAN DAME, 1995). A ConBr, lectina presente nas sementes da *Canavalia brasiliensis*, é um exemplo dessa classe.

A classe das **Quimerolectinas** apresenta, além do DRC, um domínio correlato com visível atividade catalítica e é capaz de atuar independentemente do DRC. Outra característica

é que as lectinas que compreendem essa classe tendem a se comportar tanto como merolectinas quanto hololectinas, o que diferirá será o número de DRC que cada uma apresentará (PEUMANS e VAN DAME, 1995). A lectina presente na ricina (*Ricinus communis*) é um exemplo dessa classe.

A classe das **Superlectinas** é caracterizada por ser um tipo especial de quimerolectinas, apresentando dois DRC arranjados em sequências estruturalmente diferentes e sendo reconhecedoras de carboidratos estruturalmente distintos (CAMUE, PEETERS e PEAUMANS, 1986). A lectina isolada de bulbos de tulipa (*Tulipa* spp.) é um exemplo dessa classe.

A classificação das lectinas foi ampliada por Monteiro-Moreira (2002), que propôs o termo **Multilectinas** para designar todas as lectinas que apresentassem dois ou mais DRC, com alta similaridade e capacidade de se ligar a carboidratos distintos. É o que ocorre na jacalina, uma lectina isolada de sementes de *Artocarpus integrifolia*.

Em 1957, Makela classificou as lectinas de acordo com sua especificidade por monossacarídeos. Makela (1957) considerava apenas carboidratos simples, cuja organização era dada conforme a orientação de suas hidroxilas em C3 e C4 da cadeia piranosídica. Além desta classificação, as lectinas também foram agrupadas de acordo com sua especificidade por carboidratos mais complexos e quanto à sua ocorrência (PEUMANS e VAN DAME, 1998). Também podem ser agrupadas de acordo com sua especificidade à ligantes diversos, configurando-as como proteínas Tipo-Lectinas, as quais variam em número e formas distintas (Lectinas Tipo B, Tipo C, Tipo F, Tipo G, Tipo H, Tipo I, Tipo J, Tipo L, Tipo M, Tipo N, Tipo P, Tipo R, Tipo S, Tipo T, Tipo W, Tipo X e Tipo-quitinase), podendo ainda ser encontradas Lectinas F-box, Anexinas, Calnexinas, Ficolinas, Interlectinas, Pentraxinas e Tacilectinas.

A interação estabelecida entre a lectina e o carboidrato específico é intermediada por pontes de hidrogênio entre grupos polares de aminoácidos, presentes no sítio de ligação (FERNANDES, 2012). Contudo, para a formação de um complexo proteína-carboidrato/lectina-carboidrato deve ocorrer um deslocamento de moléculas de água associadas com os grupos polares da proteína/lectina de tal modo que estes comecem a interagir com os grupos polares do carboidrato em questão; ao passo em que novas pontes de hidrogênio são formadas e forças de Van Der Waals finalmente estabilizam toda a reação (QUIOCHO, 1986).

É justamente a presença dos grupamentos hidroxila na estrutura dos carboidratos envolvidos na interação lectínica que permite a ocorrência de uma complexa rede de contatos

cooperativos lectina-carboidrato, pois o grupamento hidroxila funciona comoceptor e/ou doador de elétrons. Quimicamente, participam dessa interação ácido aspártico e asparagina, além de hidrogênios de ligações amídicas e o oxigênio das carbonilas. Podem participar, mesmo com pouca frequência, cadeias laterais de outros aminoácidos, sendo as interações hidrofóbicas as que propiciam o estabelecimento de tal reconhecimento (SANTANA, 2004).

Uma vez estabelecidas todas as interações, a bioprospecção dessas proteínas é alcançada através da presença de aglutinação em eritrócitos (humanos e/ou animais). Quando começam a interagir com os carboidratos presentes na face externa da membrana do eritrócito, através de seus sítios de ligação, as lectinas formam ligações reversíveis entre os constituintes dessa interação (SANTOS et al., 2005). A confirmação da atividade lectínica é obtida por ensaios de inibição da atividade hemaglutinante com uma solução de carboidrato-ligante ou glicoproteína específica (TRINDADE, 2006).

Podendo compreender até 10% da proteína total, as sementes quiescentes compreendem a maior fonte de lectinas vegetais. Nem a obtenção nem a maior concentração dessas proteínas se restringe a um único tecido, sendo possível isolá-las de cotilédones (LAW, 1996; NOMURA, 1998), de raízes (BISWAS e CHATTOPADHYAYA, 2014; SOUZA et al., 2011; NAEEM et al., 2001), de tubérculos (MAJUMDER, MONDAL e DAS, 2005; SINGH et al., 1993), de bulbos (PRASANNA e VENKATESH, 2014; TAJNE et al., 2014), de rizomas (ALBUQUERQUE et al., 2014; SYED e REZA, 2014), de caules (ONYEYIRICHI et al., 2013; WITTSUWANNAKUL, WITITSUWANNAKUL e SAKULBORIRUG, 1998), de cernes (JESUS et al., 2012; SÁ et al., 2008), de látex (AFONSO-CARDOSO et al., 2011; DEENEN, PRÜFER e SCHULZE GRONOVER, 2011), de folhas (GOMES et al., 2013; RAFIQ et al., 2014; SILVA et al., 2010), de frutos (WANG e NG, 2006; BENITO et al., 1998) e de flores (ITO, 1986).

De acordo com a molécula e seu estado de oligomerização, cada subunidade das lectinas de leguminosas dispõe de 2 a 12 sítios de ligação específicos à íons metálicos (Ca^{+2} e/ou Mn^{+2}) essenciais à interação lectina-carboidrato (BALZARINI, 2006). É através desses complexos metálicos que é atingida uma modificação na estrutura da lectina, aumentando sua interação e, conseqüente, afinidade pelo ligante. Os íons posicionam os aminoácidos polares do sítio de reconhecimento na posição espacial perfeita para que haja o reconhecimento e ligação ao carboidrato (FERNANDES, 2012).

As lectinas de leguminosas encontram-se dispostas como um protômero com massa molecular estimada em 30 kDa e com cadeia polipeptídica única, com cerca de 250 aminoácidos, que pode ser clivado em polipeptídios menores e formar estruturas semelhantes

ou não (FERNANDES, 2012). Cada subunidade da lectina pode se arranjar espacialmente de diversas formas, associando-se na forma de dímeros ou até octâmeros. A conformação espacial e atividade biológica dessas sub-formas é obtida a partir da estrutura do DRC (BARRE et al., 2001).

A biossíntese das lectinas vegetais acontecerá pela ação de ribossomos (CUNHA, 2014) sendo posteriormente transportadas, por meio de vesículas, via complexo de Golgi, até o vacúolo, onde serão incorporadas nos corpos proteicos e a uma série de outras proteínas, como proteínas de estocagem, hidrolases e fitinas (FERNANDES, 2012). Geralmente, são sintetizadas como precursores que, após a retirada de um peptídeo-sinal da região N-terminal, são convertidos em proteínas maduras. Esta fase pode envolver clivagens proteolíticas destes mesmos precursores, bloqueio da região C-terminal, remoção de carboidratos e conexão das extremidades da proteína (LORIS et al., 1998).

Dentre as possíveis aplicações biotecnológicas que as lectinas vegetais podem apresentar, encontram-se avanços significativos desde a clonagem molecular até a expressão de lectinas em sistemas heterólogos, o que propicia perspectivas para o uso intensivo dessas ferramentas biológicas (KUMAR et al, 2015). Segundo Fernandes (2012), as lectinas podem ser usadas na detecção do DRC em glicoconjugados por cromatografia de camada delgada; estudos de glicoproteoma; quantificação de glicoconjugados reativos a lectinas em ensaios de ligação lectina-enzima, e quantificação das atividades de glicosiltransferases e glicosidases; análise da correta glicosilação por células variantes resistentes a lectina; possibilidade de uso como agentes terapêuticos envolvidos na ligação aos receptores de membranas de células cancerígenas; e viabilidade de internalização e condensação da cromatina, dentre tantas outras aplicações.

Além das lectinas, outros fatores de origem protéica com ações no metabolismo celular podem ser listados, como as enzimas proteolíticas ou proteases. De acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular⁵, essas enzimas hidrolisam ligações peptídicas de proteínas-alvo e dividem-se em exopeptidases e endopeptidases. Oliveira (2007), apontou que as exopeptidases subdividem-se em aminopeptidases, dipeptidil peptidases, tripeptidil peptidases, carboxipeptidases, peptidil-dipeptidases, tripeptidase e dipeptidases. Enquanto as endopeptidases (ou proteinases) subdividem-se em as serínicas, cisteínicas, aspárticas e metalo-proteinases. Essas proteases

⁵ Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). 1992. **Enzyme nomenclature**. Orlando: Academic Press, New York.

representam 2% do teor proteico global em todos os organismos e seus mecanismos metabólicos.

Graças a sua hábil capacidade de inibir a atividade catalítica de inúmeras enzimas proteolíticas, os inibidores de protease (IP) são importantes recursos biotecnológicos a serem adotados e são amplamente distribuídos entre plantas, animais e microorganismos patogênicos (GOMES, 2014; NEURATH, 1989; RYAN, 1990; BRZIN; KIDRIC, 1995). Caracterizam-se como uma das classes de enzimas mais abundantes em plantas que podem ou não se apresentar na forma glicosilada (CAVALCANTI et al., 2002; AZARKAN et al., 2006).

Em vegetais, os IP podem ser isolados tanto de monocotiledôneas quanto de eudicotiledôneas. A família *Poaceae* é a que detém o maior número de IP isolados de monocotiledôneas, enquanto que a família *Solanaceae* e a *Fabaceae* são aquelas que dispõem do maior número de IP isolados de eudicotiledôneas. Contudo, os níveis desses inibidores dependem de fatores como o estágio de maturação, localização nos tecidos vegetativos, período e tempo de colheita, condições de armazenamento e estocagem, além da variedade do material biológico (OLIVEIRA, 2007).

A categorização desses IP se dá mediante a classe de enzimas que eles inibem. Tem-se descritos quatro categorias de IP: serínicas, cisteínicas, aspárticas e metalo-proteinases (RYAN, 1990; RICHARDSON, 1991). Destes, os IP serínicas são os que detêm o maior número de trabalhos, seguidos dos IP cisteínicas; enquanto os inibidores de metaloproteinases e IP aspárticas são os que compreendem o grupo com menos trabalhos descritos em vegetais (BODE e HUBER, 1992; BODE e HUBER, 2000; MARGIS, REIS e VILLET, 1998; OLIVEIRA, 2007).

Os IP serínicas são subdivididos em sete classes: Batata I, Batata II, Superfamília de Cereais, Taumatina, Ragi I-2, Bowman-Birk e Kunitz. Eles contêm asparagina, serina e arginina como resíduos do sítio ativo e inibem a ação das enzimas tripsina e/ou quimiotripsina. Os IP cisteínicas contemplam a classe das cistatinas de plantas (fitotastinas), que têm cisteína, aspartato e arginina como resíduos do sítio ativo; estes IP inibem a ação das enzimas elastase, papaína, catepsinas (B, H e L), ficina e bromelaína. Os IP aspárticas dispõem da classe dos inibidores de proteínas aspárticas, cujo sítio ativo é formado por resíduos de arginina e atuam inibindo as enzimas pepsina e catepsina D. Já os inibidores de metaloproteinases, contêm íons metálicos em seu sítio ativo e também apresentam uma única classe, a dos inibidores de carboxipeptidases A e B, inibindo a ação das enzimas renina, carboxipeptidase e termolisina (OLIVEIRA, 2007).

O mecanismo de ação dos **IP serínicas**, em especial, ocorre através de fortes e específicas interações entre a proteína-alvo e o sítio ativo do inibidor (VASCONCELOS, 2008), sendo categorizados de acordo com o grau de similaridade de suas sequências primárias, massa molecular, número de resíduos de aminoácidos e pontes de dissulfeto (RICHARDSON, 1991; KOIWA et al., 1997).

Além das sete classes acima mencionadas para os inibidores de IP serínicas, Chevreuil (2009) atribuiu uma classe extra, chamada de IP serínicas do tipo abóbora, cuja massa molecular é de aproximadamente 4 kDa e contém de 27 a 34 resíduos de aminoácidos estabilizados por 3 pontes de dissulfeto. Esse tipo de inibidor tem sido isolado de sementes família *Curcubitaceae* e tem arginina, isoleucina e lisina como resíduos de seu sítio ativo.

Os IP serínicas do tipo batata I apresentam massa molecular entre 8 e 10 kDa, com aproximadamente 70-71 resíduos de aminoácidos compondo a monocadeia polipeptídica, estabilizada por uma única ponte de dissulfeto. Seu sítio ativo é repleto de resíduos de metionina, leucina e ácido aspártico (RICHARDSON, 1991; HEITZ et al., 1993). Já os IP serínicas do tipo batata II, têm massa molecular oscilando em 12 kDa, com aproximadamente 96-98 resíduos de aminoácidos estabilizados por 6 pontes de dissulfeto. Seus sítios ativos contêm resíduos de arginina e asparagina (MOSOLOV e VALUEVA, 2005).

Os IP serínicas da superfamília dos cereais compreendem um grupo proteico bem categorizado em trigo, arroz, milho, sorgo, cevada e centeio (CHEVREUIL, 2009). Cujas ações são dadas em função da inibição da tripsina e da α -amilase, sendo classificados como bifuncionais (FRANCO et al., 2002; HABIB e FAZILI, 2007). Estes inibidores têm massa molecular de aproximadamente 13 kDa e são formados por uma única cadeia polipeptídica estabilizada por 5 pontes de dissulfeto (CHRISTELLER e LIANG, 2005; HABIB e FAZILI, 2007).

Os IP serínicas do tipo taumatina compreendem proteínas com massa molecular aproximada de 22 kDa e, assim como os inibidores da superfamília dos cereais, seu mecanismo de ação é dado em função da inibição da tripsina e da α -amilase. Além do peso molecular característico, uma peculiaridade dessa classe é sua similaridade com sequências-consenso de proteínas relacionadas com patogênese, as PR-proteínas (FRANCO et al., 2002).

Os IP serínicas do tipo Ragi I-2 envolvem as proteínas com peso molecular oscilando entre 12 e 13 kDa; inicialmente isolados de sementes de *Eleusine coracana*. Desta espécie, foram isolados dois inibidores de α -amilase; o primeiro com características que o incluem na classe de inibidores de serinoproteinases da superfamília dos cereais e o segundo, no grupo de inibidores de serinoproteinases do tipo Ragi I-2. Quando comparadas as sequências de

aminoácidos desses dois inibidores, percebe-se a completa divergência de estrutura e composição aminoacídica (CHEVREUIL, 2009).

Muito embora seja possível encontrar uma diversidade de classes de IP em diversas partes vegetativas de plantas, a grande variedade desses inibidores encontra-se nas classes Bowman-Birk e Kunitz (OLIVEIRA, 2007) e são isolados, principalmente, de sementes de leguminosas (NORIOKA et al., 1988). Ambos foram descritos a partir de seu isolamento de cotilédones de soja (SESSA e WOLF, 2001).

Os IP serínicos do tipo Bowman-Birk foram inicialmente descritos por Birk, na década de 1940, como sendo o principal IP presente em quase todas as sementes de mono e eudicotiledoneas (PRASAD, DUTTA-GUPTA e PADMASREE, 2010; DAI et al., 2011).

Nas monocotiledôneas, é possível encontrar duas classes desses inibidores: i) inibidores com massa molecular de 8 kDa, 10 resíduos de cisteína, 5 pontes de dissulfeto e 1 sítio ativo único, chamado de “*single-headed*”; e ii) inibidores com massa molecular de 16 kDa, 20 resíduos de cisteína, 10 pontes de dissulfeto e 2 sítios ativos, chamados de “*double-headed*”. Já em eudicotiledôneas, eles possuem peso molecular de 8 kDa, aproximadamente 14 resíduos de cisteína, 7 pontes de dissulfeto e 2 sítios ativos (QI, SONG e CHI, 2005). Quando presentes, os dois sítios ativos dos IP do tipo Bowman-Birk situam-se em lados opostos da molécula (PRASAD, DUTTA-GUPTA e PADMASREE, 2010), onde a região N-terminal (composta por resíduos Lys₁₆-Pro₂₀) inibe a atividade da tripsina e a região C-terminal (composta por resíduos Leu₄₃-Ala₄₇) inibe a atividade da quimotripsina (MUZARD et al., 2012).

Os IP serínicos do tipo Kunitz, por sua vez, são classes de proteínas com massa molecular variando de 18 a 26 kDa (OLIVEIRA, 2007; MACHADO et al., 2013), com uma ou duas cadeias polipeptídicas (PATIL et al., 2012), duas pontes de dissulfeto, um único sítio ativo (chamado de “*single-headed*”) e, diferente dos IP do tipo Bowman-Birk, apresentam baixo teor de resíduos de cisteína (MACHADO et al., 2013; PATIL et al., 2012; RICHARDSON, 1991; BATISTA et al., 1996). Quando na sua forma monomérica, estes inibidores apresentam baixa massa molecular (entre 6 e 8 kDa) e seis resíduos de cisteína amparados por três pontes de dissulfeto conservadas na disposição 1-6, 2-4 e 3-5 (SMITH et al., 2016). O sítio ativo desses inibidores gera uma estrutura com conformação canônica, com resíduos de arginina e lisina na posição P1 (PATIL et al., 2012), cuja inserção de um desses resíduos na posição 15 determina a especificidade da inibição da serinoprotease, que incluem, além da tripsina, a quimotripsina, elastase neutrofílica, factor XIIa, calicreína plasmática,

plasmina e factor Xa (FXa) (SMITH et al., 2016; BATISTA et al., 1996; OLIVA et al., 2003; OLIVA et al., 2001; OLIVA et al., 2011).

1.5 O gênero *Sesbania*

O gênero *Sesbania* pertence à família *Leguminosae/Fabaceae* e subfamília *Papilionoideae*. É constituído por cerca de 500 espécies distribuídas entre os trópicos e subtrópicos; destas, 60 são tropicais (SILVA, 2013). Divide-se, ainda, em pelo menos quatro subgêneros, dois dos quais (*Sesbania* e *Agati*) contêm espécies de alto potencial agrícola – o subgênero *Sesbania* é o que detém a maioria das espécies registradas e pode ser encontrado em todo o globo (EVANS e ROTAR, 1987). No Brasil, o gênero *Sesbania* distribui-se em seis espécies e uma variedade: *Sesbania emerus* (Aubl.) Urb., *S. exasperata* Kunth, *S. oligosperma* Taub., *S. punicea* (Cav.) Burkart, *S. sesban* (L.) Merr., *S. sesban* var. *bicolor* (Wight & Arn.) F.W.Andrews e *S. virgata* (Cav.) Pers. (FORZZA et al., 2010-b).

Embora existam poucos estudos taxonômicos sobre esse gênero, é provável que algumas espécies de *Sesbania* sejam de curta duração e que a grande maioria sejam anuais. Sabe-se que sua germinação é epicótila, onde a primeira folha é inteira e, subsequentemente, as “folhas verdadeiras” são pinadas e demonstram seguimento solar diurno. Ao formarem inflorescências, estas são do tipo racemo e as flores têm cores que variam em tons de amarelo, amarelo pálido ao amarelo-alaranjado, medem de 0,5 a 2,8 cm de comprimento, podem, às vezes, possuir estrias em roxo, marrom escuro ou manchas nas costas das pétalas e são comumente polinizadas por membros da ordem *Hymenoptera*. Suas vagens, geralmente indeiscentes e cilíndricas, podem se arranjar em formas retangulares em secção (*S. grandiflora*, *S. Speciosa* e *S. virgata*) ou aladas (*S. tetraptera* tem vagens com quatro asas). As sementes da maioria das espécies requerem escarificação e têm tegumento impermeável, o que permite a sobrevivência ao longo do tempo, a transição ao longo de cursos d'água e ajuda a garantir que a germinação ocorra em tempo hábil e em condições favoráveis (EVANS e ROTAR, 1987).

Os usos potenciais do gênero *Sesbania* incluem a ampliação do uso de espécies perenes para melhorar a nutrição animal; a produção de celulose e fibra por meio do uso de espécies anuais; a produção biológica de nitrogênio em sistemas de cultivo, proporcionando insumos de baixo custo aos agricultores para seus sistemas de produção; na recuperação de solos salinos e sódicos, ou suas combinações; como cobertura vegetal, a partir da elaboração de uma estrutura densa feita com espécies de *Sesbania* na perspectiva de reduzir a evaporação

da água do solo e impedir o movimento ascendente de sais e sua concentração na superfície do solo; ou ainda na produção de gomas, que têm valor potencial para fins industriais (EVANS e ROTAR, 1987).

As espécies do gênero *Sesbania* são ainda descritas como capazes de acumular metais pesados e serem resistentes a estresses bióticos e abióticos (SILVA, 2013). Na química de compósitos polissacarídeos carbonáceos magnéticos, a *Sesbania* gum (SG), um polissacarídeo natural (galactomanano) com massa molecular entre 2,3-3,4 kDa, pode ser usado como fonte de carbono e atuar como um absorvente de vários componentes tóxicos, pela sua elevada habilidade de adsorção através do processo hidrotermal usando a SG como propulsor (LAN et al., 2014).

1.6 *Sesbania virgata*

Popularmente conhecida por acacia negra (BRANZINI, GONZÁLEZ e ZUBILLAGA, 2012), saranzinho, mãe-josé e feijãozinho, a *Sesbania virgata* (referido sob as sinonímias *Aeschynomene virgata* Cav. e *Sesbania marginata* Benth.) é um arbusto bastante rústico (LISBOA et al., 2006), que floresce e frutifica durante quase todo o ano, com cerca 6 m de altura, 25 cm de diâmetro a altura do peito e 5m de diâmetro de copa, que apresenta alta plasticidade, sendo facilmente encontrada em margens de estradas, terrenos baldios, cavas de extração de argila e em locais próximos ao mar (ARAÚJO et al., 2004).

É nativa da parte sul do Continente americano (FLORENTINO e MOREIRA, 2009), ocorrendo⁶ nas Regiões Nordeste (Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) do Brasil, povoando quase todos os seus domínios fitogeográficos. Especificamente na Caatinga, é possível identificar espécimes em nichos com escala de tempo relativamente recente, não ultrapassando três décadas. Mesmo sabendo da sua existência neste domínio, não há registros que comprovem sua inclusão nele; sabe-se, apenas, que é uma invasora em potencial, colonizando preferencialmente matas ciliares, tanto de rios quanto de reservatórios artificiais de água; e que é uma hábil recuperadora de áreas degradadas, em face de sua fácil

⁶ *Sesbania virgata* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB19125>>. Acesso em 14 Mar. 2017.

adaptação a solos de baixa fertilidade, a locais com temperaturas de 15-35 °C e a índices pluviométricos oscilando entre 1.200 e 2.500 mm (SOUZA, 2011).

Sua classificação sistemática foi elucidada pelo *United States Department of Agriculture – Plants Database, 2017*, e assim se apresenta:

Reino: *Plantae*

Subreino: *Traqueobionta*

Superdivisão: *Spermatophyta*

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Subclasse: *Rosidae*

Ordem: *Fabales*

Família: *Fabaceae/Leguminosae*

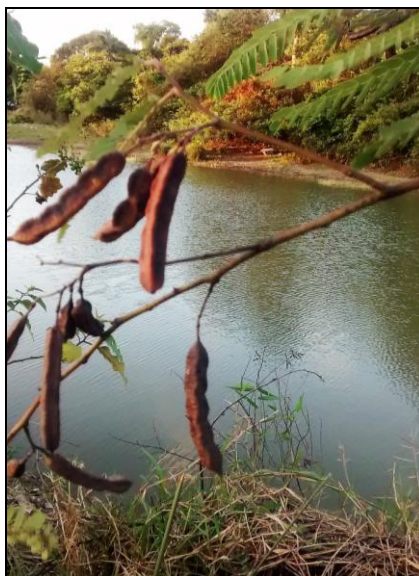
Gênero: *Sesbania Scop.* – river hemp

Espécie: *Sesbania virgata* (Cav.) Pers⁷.

O fruto da *S. virgata* (**Figura 4**) é um legume indeiscente e nucóide, apresentando tons esverdeados na fase juvenil e marrom opaco quando atinge a maturação, com textura seca e superfície rugosa, sendo possível notar um afilamento tanto de sua base quanto seu ápice (sendo este pontiagudo). Quanto a seu bordo, nota-se uma atenuada ondulação, com eminência de sutura projetada do pedúnculo (consistente e lenhoso) a seu ápice. Tanto o pericarpo quanto o mesocarpo e o endocarpo são distintos, sendo o primeiro fino, o segundo branco acinzentado e o último com textura lisa e em tons de marfim. O embrião formado é cotiledonar. Os cotilédones são oblongos de ápices arredondados, opostos, de nervação pouco diferenciada, face dorsal verde clara e face ventral verde escura, formando um ângulo de aproximadamente 45° com o epicótilo. No que se refere à posição e forma do cotilédone, têm-se que são do tipo apical e invaginado papilionáceo, respectivamente. O endosperma que envolve o embrião, é espesso e, quando hidratado, tem aspecto gelatinoso e semitransparente (ARAÚJO et al., 2004).

⁷ Nome aceito, Nome correto. *Sesbania virgata*. In **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB19125>. Acesso em: 23 Feb. 2017.

Figura 4 – Infrutescência de *Sesbania virgata*



Infrutescência de *S. virgata*, registrada no seu local de coleta. Em ênfase um ramo contendo algumas vagens arranjadas em infrutescência; ao fundo, um lago temporário, cujas margens contemplam inúmeros exemplares de *S. virgata*.

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

A germinação das sementes de *S. virgata* é do tipo epígea, onde o tegumento fica aderido aos cotilédones na fase inicial do crescimento da plântula. O rompimento do tegumento pela radícula já é visto no segundo dia após a semeadura e, sete dias após, a raiz (com forma cilíndrica e tenra; esbranquiçada, igualmente a coifa; apresenta raízes secundárias finas, curtas, cilíndricas e brancas) atinge comprimento de 5,2 cm, o hipocótilo mede 4,9 cm e o comprimento da plântula é de 12,7 cm (ARAÚJO et al., 2004). Além da dispersão natural, o homem colabora com sua colonização quando a utiliza como recuperadora de áreas degradadas, com produtividade de 60 t.ha⁻¹ e tempo médio de formação de 120 a 150 dias (SOUZA, 2011).

O sumo liofilizado de folhas frescas de *S. virgata*, quando administrado em camundongos por via oral apresentou, segundo Braggio et al. (2002), acentuadas propriedades biológicas capazes de atenuar o efeito depressor do Sistema Nervoso Central, refletido pela potencialização do sono barbitúrico. Ainda possui propriedades analgésicas, efeito mais evidente na dor de origem inflamatória; e propriedades antiedematogênicas/anti-inflamatórias comprovadas pela significativa inibição de edemas agudos induzidos por carragenina e óleo de cróton. Praxedes (2011) apontou que um flavonoide, a catequina, foi encontrado nessa espécie cujas atividades antimicrobianas foram comprovadas. A *S. virgata* é capaz de estabelecer simbiose com o *Azorhizobium doebereineriae* (SILVA, 2013) de maneira altamente específica

e eficiente, não ocorrendo inibição de outras bactérias fixadoras de nitrogênio nudolíferas em leguminosas (BFNNL) na sua rizosfera.

Quanto aos aspectos antinutricionais das sementes de *S. virgata*, já foram reportadas na literatura a presença de taninos, saponinas e inibidores de tripsina, configurando-se como principal problema quando usadas na alimentação animal, contudo apresentam elevado teor protéico (HOSSAIN e BECKER, 2001). Em folhas, o teor proteico varia de 15 a 28%, similares à *S. sesban* (VEASEY et al., 1999).

Contudo, mesmo sendo uma excelente fonte protéica, não é comum encontrar espécies de *Sesbania* sendo utilizadas como gêneros alimentícios, exceto na Índia, onde, em algumas instâncias em Bangladesh, folhas e flores são consumidas como vegetais e em seitas tribais (Katkharis e Ghonds), onde as sementes maduras de *S. bispinosa* são cozidas e comidas (HOSSAIN e BECKER, 2001). Na Argentina, as sementes de *S. virgata* são torradas e utilizadas como substituintes do café (POTT e POTT, 1994). Já no Brasil, quando foram utilizadas na alimentação humana, as sementes de *S. virgata* propiciaram a intoxicação (diarreia) de uma criança de uma creche na cidade de São Paulo, SP (BRAGGIO et al., 2002).

1.7 Atividades biológicas manifestadas por sementes de leguminosas

O sucesso reprodutivo e ecológico dos vegetais dá-se mediante o desenvolvimento e aplicação de estratégias adaptativas, como o acúmulo de corpos proteicos em seus tecidos. Esses corpos proteicos são essenciais à manutenção e desenvolvimento do embrião, servindo-lhe como fonte de nitrogênio e enxofre (TONINI, PURGATTO e BUCKERIDGE, 2010), e podem conter um ou vários tipos de proteínas (BEWLEY e BLACK, 1994) com atividades biológicas comprovadas.

Em sementes de leguminosas, tem-se registrado que estas proteínas podem apresentar atividades antioxidante (E-LACERDA et al., 2017; MAMILLA e MISHRA, 2017; ZHAO et al., 2014), antibacteriana (KELEMU, CARDONA e SEGURA, 2004; SITOHY e OSMAN, 2010) e antifúngica (CHARUNGCHITRAKA et al., 2011; SANTOS et al., 2008).

O mecanismo da atividade antioxidante envolve a captura de elétrons livres pelo sítio ativo do radical capturante (YANG et al., 2017). Com base nessa reação, os compostos antioxidantes são requeridos para a melhoria da qualidade de vida da população. Não obstante, as atividades antimicrobianas (antifúngica e antibacteriana) têm sua relevância frente aos danos causados à indústria alimentícia e à saúde humana.

Sabe-se que além de infeccionar vegetais durante os estágios de desenvolvimento e pós-colheita, muitos fungos ocasionam, indiretamente, distúrbios em humanos a partir da secreção de micotoxinas ou alérgenos (DELLAVALLE et al., 2011). As bactérias também imprimem efeitos danosos a muitos alimentos ou ao próprio homem, cujo mecanismo do controle de sua atividade, por via de ação das lectinas, ocorre pelo reconhecimento e ligação aos carboidratos (ácido murâmico) ou fragmentos da parede celular (muramilpeptídeos) das bactérias. Diversos métodos avaliativos ou rastreadores da atividade antimicrobiana *in vitro* são empregados, sendo os métodos de difusão em disco, em caldo ou em ágar os mais conhecidos e facilmente executados (BALOUIRI, SADIKI e IBNSOUDA, 2016).

Independente da comodidade do método a ser empregado, o controle da ação desses microorganismos é dado, muitas vezes, por agrotóxicos. Contudo, devido os danos ambientais por eles ocasionados, a crescente demanda pela produção de produtos regulamentados vem ampliando a busca por proteínas biologicamente ativas capazes de reduzir os efeitos destes antagonistas, através do controle de seu crescimento.

Diante do exposto, fez-se necessário, investigar a caracterização nutricional, antinutricional e bioquímica, em especial, a presença de proteínas biologicamente ativas em sementes de *Sesbania virgata* na tentativa de ampliar a compreensão e aplicabilidade dessas potenciais ferramentas biotecnológicas como promotoras da mitigação de enfermidades, melhoria da qualidade de vida da população, personificação de técnicas agronômicas capazes de trazer retorno financeiro para o pequeno e grande produtor rural, promover o progresso na/da indústria farmacêutica e erradicar fito e hemopatógenos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar nutricional, antinutricional e bioquímica preliminarmente as sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., bem como avaliá-las quanto à presença de algumas atividades biológicas de interesse médico e farmacêutico.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar os parâmetros morfológicos, físicos e químicos das sementes de *S. virgata*
- Caracterizar nutricionalmente as sementes de *S. virgata*
- Avaliar os efeitos de diversas soluções, tempos e métodos de extração sob o teor de proteínas solúveis e obtenção de extratos ricos em proteínas biologicamente ativas, obtidos das sementes de *S. virgata*
 - Determinar a presença de fatores antinutricionais presentes no homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e fração protéica com atividade lectínica, obtidos das sementes de *S. virgata*
 - Determinar o perfil proteico da farinha fina, extrato bruto total e fração protéica com atividade lectínica, obtidos das sementes de *S. virgata*
 - Determinar o perfil aminoacídico da farinha fina e fração protéica com atividade lectínica, obtidos das sementes de *S. virgata*
 - Determinar a atividade antioxidante do homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e fração protéica com atividade lectínica, obtidos das sementes de *S. virgata*, contra o sistema de captura de radicais livres
 - Avaliar as atividades antifúngica e antibacteriana do homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e fração protéica com atividade lectínica, obtidos das sementes de *S. virgata*

3 MATERIAL E MÉTODOS

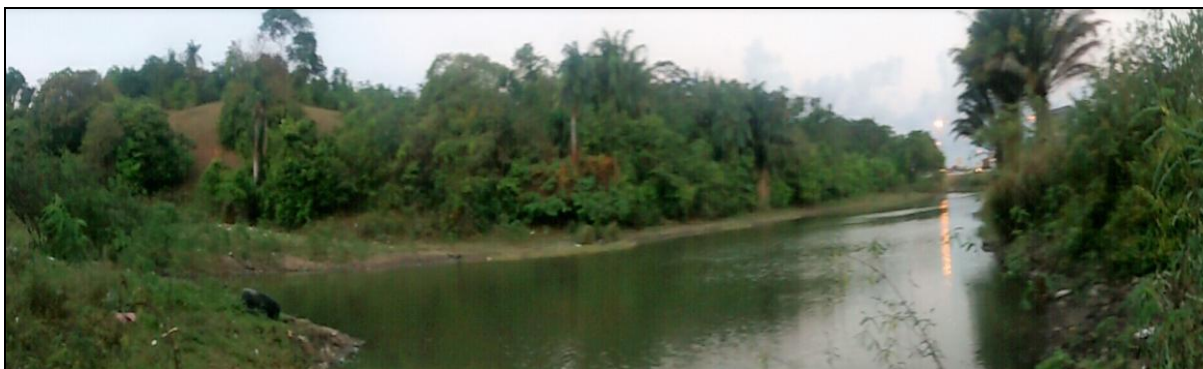
A caracterização química parcial e valor energético das sementes de *Sesbania virgata* foi feita no Laboratório de Análise Físico-química dos Alimentos, do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal da Paraíba (UFPB); o teor de fibras foi determinado no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Alimentos do Departamento de Nutrição da UFPB; o perfil de ácidos graxos totais das sementes de *S. virgata* foi determinado no Laboratório de Ácidos Graxos, do Centro de Tecnologia da UFPB; a determinação do perfil de aminoácidos totais foi realizada no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL); e os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Micologia, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB.

Os demais procedimentos metodológicos foram realizados nos Laboratórios de Proteômica Estrutural (LaProtE) e de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BioGeR-Lab), pertencentes ao Departamento de Biologia Molecular (DBM) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), da UFPB, Campus I, situado em João Pessoa, Paraíba.

3.1 Material biológico

Sementes de *S. virgata* foram coletadas na cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil, situado a 7°09'51.8"S 34°54'01.1"W (**Figura 5**). Posteriormente, no mês de outubro de 2016, partes vegetativas da espécie trabalhada foram coletadas, identificadas e depositadas no Herbário Professor Lauro Pires Xavier (JPB) do Departamento de Sistemática e Ecologia da UFPB, sob voucher **JPB n° 63198**.

Figura 5 – Local de coleta das sementes de *Sesbania virgata*



Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

3.2 Materiais e reagentes

Para realização dos experimentos, utilizou-se de Paquímetro Analógico 150 Mm (Profissional (Pro), Western); Centrifuga Eppendorf, modelo 5430 R; Espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu, modelo UV-1800, e Espectrofotômetro Leitz-Photometer 340-800.

Os reagentes da Sigma-Aldrich® (USA) foram: tripsina bovina, DL-BAPNA (DL-benzoyl-arginina-para-nitroanilida), albumina sérica bovina, reagente cromogênico de Bradford (*Coomassie Brilliant Blue* G-250 e R-250), ABTS⁺⁺ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), meio RPMI 1640 e os antimicrobianos sintéticos nistatina, fluconazol e cloranfenicol.

O Agar Nutriente, o Agar Sabouraud Dextrose e Caldo “*Brain Heart Infusion*” foram adquiridos da DIFCO LABORATORIES, France, USA. O corante resazurina foi adquirido na INLAB. Os marcadores de alta massa molecular (12-225 kDa) foram da GE Healthcare (Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker – Full range, USA) e todos os reagentes empregados foram de grau analítico.

3.3 Análises morfo-físico-químicas das sementes e vagens de *Sesbania virgata*

Reconhecendo-se o crescente despertar da produtividade de sementes, em especial ao de feijões, faz-se necessário analisar algumas características relacionadas à sua qualidade tecnológica no intuito de assegurar a recomendação e aceitação de novas cultivares por produtores/consumidores cada vez mais exigentes.

Assim, conforme necessidade em avaliar a qualidade tecnológica das sementes completamente maduras de *S. virgata*, optou-se em investigar suas propriedades morfo-físico-químicas, como densidade, capacidade de hidratação, índice de hidratação, capacidade de absorção e índices de absorção, conforme metodologias propostas por Chavan et al. (1999). A capacidade de absorção aquosa de suas sementes (CAA) foi determinada de acordo com Garvia-Vela e Stanley (1989) e por Plhak, Caldwell e Stanley (1989), com adaptações. Já a capacidade de hidratação de suas sementes (CH) foi determinado conforme Martin-Cabrejas (1997) e por Durigan et al. (1979), com adaptações. Os índices de absorção da farinha em água (IAA) e solubilidade da farinha em água (ISA) foram mediante emprego das metodologias descritas por Okezie e Bello (1988), com adaptações.

Os padrões morfológicos (comprimento/largura) e a forma e achatamento das sementes (espessura/largura) foram determinados conforme método relatado em Silva et al. (2012). As proporções de casca + endosperma e cotilédones nas sementes foram determinadas tomando como referência o peso de mil sementes, conforme Brasil (2009). A determinação do teor de clorofila (a, b e total) e carotenoides totais foram obtida pelo emprego da metodologia proposta por Sharma et al. (2013). A coloração das sementes foi determinada subjetivamente e outras análises referentes a morfologia das sementes e suas vagens (peso e comprimento de ambas, número de sementes por vagem e índice de sementes) também foram realizadas.

3.3.1 Densidade das sementes

A densidade de sementes foi determinada pesando-se, inicialmente, 100 sementes e despejando-as num cilindro graduado contendo 100 mL de água deionizada, à temperatura ambiente. Em seguida, o volume de água deslocado após depósito das sementes foi utilizado para aferir essa propriedade. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados, expressos em g/mL.

3.3.2 Peso individual, de 100 e de 1000 sementes

Oito lotes contendo uma e 100 sementes foram formados e pesados individualmente. Em seguida, tanto o peso individual de uma semente quanto o peso de 100 sementes foram determinados pela média aritmética do peso em cada lote, cujos resultados foram expressos em g/sementes e g/100 sementes, respectivamente. Para determinação do peso de 1000 sementes (expresso em g/1000 sementes), multiplicou-se por 10 o peso médio obtido das repetições de 100 sementes.

3.3.3 Espessura, largura e comprimento das sementes

Aleatoriamente, três sementes íntegras foram escolhidas e sua espessura, largura e comprimento foram aferidas com auxílio de um paquímetro analógico; tais índices foram determinados pela média aritmética dos valores encontrados. Os valores da relação comprimento/largura foram utilizados para categorizar morfológicamente as sementes como esférica (com medidas entre 1,16 cm e 1,42 cm), elíptico (com medidas entre 1,43 cm e 1,65 cm), oblonga/reniforme curta (com medidas entre 1,66 cm e 1,85 cm), oblonga/reniforme

média (com medidas entre 1,86 cm e 2,00 cm) ou oblonga/reniforme longa (com medidas superiores a 2,00 cm). Já os valores da relação espessura/largura foram utilizados para categorizar a forma e achatamento que as sementes assumem, podendo ser classificadas como achatada (com medidas inferiores a 0,69 cm), semicheia (com medidas entre 0,70 cm e 0,79 cm) ou cheia (com medidas superiores a 0,80 cm). O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.4 Peso individual da vagem com sementes e peso de 100 vagens com sementes

Três lotes contendo uma e 100 vagens com sementes foram formados e pesados individualmente. Ao fim, tanto o peso individual de uma vagem quanto o peso de 100 vagens foram determinados pela média aritmética do peso em cada lote, cujos resultados foram expressos em g/vagens e g/100 vagens, respectivamente.

3.3.5 Número de sementes por vagem

Dez vagens foram escolhidas aleatoriamente. Em seguida, as sementes presentes em cada uma delas foram quantificadas. Ao fim, o número de sementes presentes nas vagens foi determinado pela média aritmética do número de sementes em cada lote.

3.3.6 Espessura, largura e comprimento da vagem

Aleatoriamente, 10 vagens contendo sementes foram escolhidas e suas espessura, largura e comprimento foram aferidas com auxílio de um paquímetro analógico. Por fim, os índices foram determinados pela média aritmética dos valores encontrados.

3.3.7 Capacidade de hidratação das sementes (CH)

I – 100 gramas de sementes foram pesados, em triplicata, e o número de sementes em cada montante, contado. Cada grupo de 100 gramas de sementes pesado teve suas sementes transferidas para um cilindro graduado contendo 100 mL de água deionizada, coberto com papel alumínio e deixado em repouso durante 24 horas à temperatura ambiente. Passado o tempo de repouso, as sementes (agora embebidas) foram separadas e pesadas (CHAVAN et al., 1999). A CH das sementes foi determinada pela **Equação 1**:

$$CH\ I\ (g/semente) = \frac{pse - pss}{ns} \quad \text{Equação 1}$$

II – No segundo ensaio de determinação da CH, em triplicata, 50 g de sementes foram colocados em um cilindro graduado contendo 100 mL de água deionizada durante 12 horas, à temperatura ambiente. Ao final do tempo previsto para a hidratação, a água foi totalmente drenada e as sementes pesadas (DURIGAN, 1979). A CH das sementes foi determinada pela **Equação 2**:

$$CH\ II\ (\% \text{ de hidratação}) = pse - pss \quad \text{Equação 2}$$

Onde **pse** (peso das sementes embebidas), **pss** (peso das sementes secas) e **ns** (número de sementes no lote).

3.3.8 Capacidade de absorção aquosa das sementes (CAA)

I – A CAA foi determinada pela pesagem, em triplicata, de 100 sementes com posterior transferência para um cilindro graduado contendo 100 mL de água deionizada e deixadas em repouso por 24 horas, à temperatura ambiente. O volume de água deslocado pelas sementes embebidas foi observado e anotado (CHAVAN et al., 1999). A CAA das sementes foi determinada pela **Equação 3**:

$$CAA\ I\ (mL/semente) = \frac{vse - vss}{ns} \quad \text{Equação 3}$$

II – Paralelamente, em triplicata, 30 g de sementes uniformes e inteiras foram pesadas, com posterior transferência para um cilindro graduado contendo 100 mL de água deionizada por 16 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, as sementes foram retiradas e pesadas (GARVIA-VELA e STANLEY, 1989; PLHAK, CALDWELL e STANLEY, 1989). A CAA das sementes foi determinada pela **Equação 4**:

$$CAA\ II\ (\% \text{ de absorção}) = \left(\frac{pse - pss}{pss} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde **vse** (volume ocupado pelas sementes embebidas), **vss** (volume ocupado pelas sementes secas), **pse** (peso das sementes embebidas), **pss** (peso das sementes secas) e **ns** (número de sementes no lote).

3.3.9 Índices de hidratação (IHg) e de absorção aquosa (IAAg) das sementes

Em triplicata, os IHg e AAg das sementes foram determinados, respectivamente, pela **Equação 5** e pela **Equação 6**:

$$IHg = \frac{CH\ I}{ps} \quad \text{Equação 5}$$

$$IAAg = \frac{CAA\ I}{vs} \quad \text{Equação 6}$$

Onde **CH I** (valor obtido da Equação 1), **ps** (peso de uma semente), **CAA I** (valor obtido da Equação 3), **vs** (volume de uma semente).

3.3.10 Índices de absorção aquosa pela farinha (IAAf) e solubilidade da farinha em água (ISAf)

Inicialmente, 0,5 g da farinha de sementes de *S. virgata* foi homogeneizado em 25 mL de água destilada. Em seguida, foi agitado em agitador de tubo tipo Vortex durante um minuto com posterior centrifugação a 3612 x g por 20 minutos.

Para determinação do ISAf, 5,0 mL da solução inicial foram transferidos, em triplicata, para placas de Petri previamente taradas, seguido de secagem em estufa de esterilização até obtenção de peso constante. O ISAf foi determinado pela **Equação 7**:

$$ISAf\ (g\ H_2O/g\ farinha) = \frac{(\text{resíduo de evaporação (g)}) \times 6}{\text{peso da amostra (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Já para determinação do IAAf, o restante dos sobrenadantes de cada solução inicial foram transferidos cuidadosamente para outros recipientes e os precipitados, analiticamente pesados. A diferença obtida entre o peso da amostra antes e após a absorção de água t representa a quantidade de água absorvida. O IAAf foi determinado pela **Equação 8**:

$$IAAf\ (g\ H_2O/g\ farinha) = \frac{\text{água absorvida pela amostra (g)}}{\text{peso da amostra (g)}} \quad \text{Equação 8}$$

3.3.11 Teor de clorofila (a, b e total) e de carotenoides totais

Para determinar o teor de clorofila (a, b e total) e carotenoides totais, utilizou-se uma mistura acetona/água na proporção de 80:20 (v/v) como solução extratora. Inicialmente, 1,0 g de farinha das sementes de *S. virgata* foi pesada e homogeneizada em agitador de tubos tipo Vortex, no escuro (para evitar qualquer foto-branqueamento), em 40 mL de solução extratora enriquecida com 1,0 g de NaHCO₃, visando evitar a formação de feofitina. O homogeneizado foi centrifugado a 4.000 x g, durante cinco minutos, e o sobrenadante obtido, reservado. Para certificar de que a extração estava completamente livre de pigmentos, a “lavagem” em solução extratora foi repetida três vezes e os sobrenadantes, armazenados separadamente.

Os sobrenadantes obtidos foram mantidos no escuro, sendo a absorbância medida entre os intervalos de 480 nm e 663 nm, em espectrofotômetro. Os teores de clorofila a, b e total foram determinados, respectivamente, pelas **Equações 9, 10 e 11**, derivadas por Arnon (1949).

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg. } 100^{-1} \text{ g)} = \frac{11.3 A(663) - 0,96 A(654)}{\alpha \times 1000 \times p} \quad \text{Equação 9}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg. } 100^{-1} \text{ g)} = \frac{18.3 A(645) - 3,9 A(663)}{\alpha \times 1000 \times p} \quad \text{Equação 10}$$

$$\text{Clorofila total (mg. } 100^{-1} \text{ g)} = \frac{A(652) \times V}{34,5 \times p} \quad \text{Equação 11}$$

De maneira semelhante, o teor de carotenoides totais foi determinado mediante **Equação 12**, derivada por Kirk e Allen (1965), abaixo:

$$\text{Carotenoides totais (mg. } 100^{-1} \text{ g)} = E_{Car}(480) = [E_{480} + (0,114 \times E_{663})] - (0,638 \times E_{645})$$

Onde **A** (absorbância em seu comprimento de onda), **V** (volume de cada lavagem), **p** (peso em gramas da farinha utilizado), **α** (comprimento de luz percorrido na célula; comumente emprega-se 1,0 cm), **E_{car}** (aumento da absorbância a 480 nm) e **E** (extinção da absorbância a 480, 663 e 645 nm).

3.4 Caracterização química parcial e valor energético das sementes de *Sesbania virgata*

Para caracterização química parcial e determinação do valor energético das sementes de *S. virgata*, utilizou-se, em triplicata, a farinha fina não-delipidada, cujos teores de umidade, cinzas totais e proteínas totais foram obtidos pelas metodologias propostas por AOAC (2000), enquanto o teor de lipídeos, pelo método de Folch (FOLCH, LESS e STANLEY, 1957). O teor de fibras foi determinado conforme Li e Cardozo (1994) e o teor de carboidratos digeríveis foi determinado por Tramonte et al. (2011) mediante uso da **Equação 13**, abaixo:

$$\text{Teor de carboidratos (\%)} = 100 - (\text{proteínas} + \text{lipídeos} + \text{fibras} + \text{umidade} + \text{cinzas})$$

3.4.1 Determinação de umidade

Na determinação da umidade, inicialmente cápsulas vazias foram dispostas em estufa a 105 °C durante 30 minutos e, em seguida, deixadas em repouso em dessecador por 20 minutos para esfriá-las antes da pesagem. A pesagem das cápsulas vazias foi feita em balança analítica. Uma vez determinados os pesos das cápsulas vazias, pesou-se 2,0 g da farinha de sementes de *S. virgata* e adicionando-as a cada uma das cápsulas, sendo estas deixadas em estufa a 105 °C para secar, por aproximadamente 24 horas. Passado esse tempo, as cápsulas foram retiradas da estufa e deixadas em dessecador por cerca de 5-20 minutos para esfriá-las até o momento da pesagem em balança analítica. Após a primeira pesagem, as amostras voltaram para a estufa por mais 30 minutos. Por fim, foi repetida a etapa de repouso em dessecador e as amostras foram novamente pesadas até obtenção de um peso constante. O teor de umidade foi obtido pelo emprego da **Equação 14**:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{P_c - P_e}{P_c} \times 100 \quad \text{Equação 14}$$

Onde **P_c** [(peso da cápsula + peso da farinha úmida) – peso da cápsula] e **P_e** [(peso da cápsula + peso da farinha seca) – peso da cápsula].

3.4.2 Determinação de cinzas totais

Aqueceu-se um cadinho vazio em mufla, a 550 °C por meia hora. Após esfriar em dessecador, o cadinho vazio teve seu peso determinado em balança analítica. Em seguida, foi adicionado à este, 2,0 g da farinha de sementes de *S. virgata*, que foi previamente incinerada em manta de aquecimento até não produzir mais fumaça. O cadinho contendo o resíduo da farinha foi acomodado em mufla, mantida a 550°C até que a amostra incinerasse e suas cinzas tornarem-se brancas e sem pontos pretos. Por fim, a mufla foi desligada, a amostra retirada e acondicionada em dessecador até esfriar por completo. Após ter esfriado, o cadinho contendo as cinzas foi pesado. O teor de cinzas totais foi obtido conforme emprego da **Equação 15**:

$$\text{Cinzas totais (\%)} = \frac{Pc \times 100}{Pa} \quad \text{Equação 15}$$

Onde **Pc** [(peso da cápsula + peso das cinzas) – peso da cápsula] e **Pa** [peso da farinha seca].

3.4.3 Determinação de proteínas pelo método de micro-Kjeldahl

Para a determinação do teor de proteínas foram seguidas três etapas: i) *Digestão*, por ácido sulfúrico e mistura catalítica (dióxido de selênio, sulfato de cobre e sulfato de sódio, 1:10:100, p/p/p); ii) *Destilação*, por hidróxido de sódio 40%; ácido bórico 4,0% adicionado de 20 mL de solução alcoólica de vermelho de metila 0,2% e de 30 mL de solução de verde de bromocresol 0,2%; além de solução de fenolftaleína a 1,0%; e iii) *Titulação*, utilizando ácido clorídrico 0,1N (padronizada).

I – Etapa de Digestão:

Transferiu-se 1,0 g da farinha de sementes de *S. virgata* para um tubo de Kjeldahl, e adicionou-se 0,5 g da mistura catalítica, seguida de 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. O tubo foi acoplado ao sistema de digestão, ajustando o aquecedor inicialmente numa posição de aquecimento baixo, para evitar digestão violenta e consequente perda de material. Aumentou-se a temperatura em intervalos de 50 °C a cada 30 minutos até atingir a temperatura de 350 °C. Quando a solução no tubo tornou-se incolor ou levemente azulada, a

digestão foi finalizada. Atentou-se ainda para, caso houvesse formação de precipitado no fundo do frasco, que esta fosse de cor branca ou levemente cinza. Com o termino da digestão, o aquecedor foi desligado e o tubo deixado em repouso até completo resfriamento.

II – Etapa de Destilação:

Com destilador ligado em temperatura ajustada no nível 2, transferiu-se a solução de NaOH a 40% para o copo superior do destilador, que foi adicionada, posteriormente, ao tubo de Kjeldahl contendo a farinha de sementes de *S. virgata* digerida. As paredes do tubo de Kjeldahl, contendo a farinha digerida, foram lavadas com água destilada. O tubo de Kjeldahl foi adicionado de 1,0 mL da solução de fenolftaleína a 1% e conectado ao destilador de proteínas. Em seguida, transferiu-se 25 mL de solução de ácido bórico a 4% para um Erlenmeyer de 125 mL, sendo o mesmo conectado a saída do condensador de Kjeldahl. Com a temperatura constante, foi adicionada lentamente a solução de NaOH a 40% até obtenção de pH alcalino. Após atingir o “ponto de viragem” da cor do tubo de Kjeldahl, aumentou-se a temperatura do destilador para os níveis 8 a 10, visando promover a destilação até que o volume final fosse de 75 mL, diminuindo a temperatura para o nível 2 e desligando o aquecedor. Retirou-se o tubo de proteína do destilador e descartou-se o conteúdo restante. Reservou-se a solução do ácido bórico contendo a proteína destilada para a titulação.

III – Etapa de Titulação:

Titulou-se a solução do Erlenmeyer com ácido clorídrico 0,1 N padronizado, até o aparecimento da coloração avermelhada.

O teor de proteínas totais foi determinado conforme emprego na **Equação 16**:

$$Proteínas\ totais\ (g/100g) = \frac{(Va - Vb) \times fa \times F \times 0,14}{Pa} \quad \text{Equação 16}$$

Onde **Va** (volume de ácido clorídrico 0,1 N padronizado gasto na titulação da farinha digerida), **Vb** (volume de ácido clorídrico 0,1 N padronizado gasto na titulação do branco), **fa** (fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 N), **F** [fator de 6,25, padronizado pela

ANVISA (2003) para carnes e proteínas de soja e de milho] e **Pa** (peso da farinha de sementes de *S. virgata*).

3.4.4 Determinação de lipídeos

Em ambiente protegido de luz, pesou-se 2,0 g da farinha de sementes de *S. virgata*, transferiu-se 30 mL da mistura clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e agitou-se por dois a três minutos em triturador. A mistura resultante foi filtrada. As paredes do Béquer foram lavadas com mais 10 mL da mistura clorofórmio:metanol e o volume obtido foi filtrado e juntado ao conteúdo da primeira filtragem. O volume final do extrato filtrado foi anotado.

Na sequência, adicionou-se 20% do volume final do extrato filtrado (lido na proveta) de sulfato de sódio a 1,5%, agitou-se e foi deixado em repouso até separar as fases, em ambiente fechado. A fase superior deve ficar com aproximadamente 40% e a inferior com 60%. Anotou-se o volume da fase inferior e descartou-se a fase superior. Tomou-se uma alíquota de 5,0 mL do extrato (fase inferior) e transferiu-se para o béquer previamente tarado. O Béquer foi colocado em estufa a 105 °C para evaporar a mistura de solventes com cuidado para não queimar. Aguardou-se o resfriamento em dessecador, pesou-se o béquer mais o resíduo de gordura. O teor de lipídeos foi determinado conforme **Equação 17**:

$$Lipídeos (\%) = \frac{Pf \times Vinf}{Pa \times 5} \times 100 \quad \text{Equação 17}$$

Onde **Pf** [(peso cápsula + peso resíduo de gordura) – peso da cápsula], **Vinf** (volume da fase inferior) e **Pa** (peso da amostra).

3.4.5 Teor de fibras brutas

O teor de fibras brutas foi determinado por método gravimétrico não enzimático. Pesou-se, separadamente, 500 mg de farinha de sementes de *S. virgata* e acomodou-as em recipientes de 250 mL. A cada um destes recipientes foi adicionado 25 mL de água destilada agitando-os suavemente até que a farinha fosse completamente homogeneizada. Os recipientes foram cobertos com papel alumínio e deixados em repouso durante 90 minutos a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 100 mL de etanol a 96% a cada recipiente, seguido de repouso durante uma hora à temperatura ambiente. Os resíduos foram recolhidos sob vácuo e

transferidos para cadinhos previamente pesados, contendo um auxiliar de filtração cada. Esses resíduos foram lavados com 20 mL de etanol a 78%, 10 mL de etanol a 95% e 10 mL de acetona, respectivamente.

Por fim, os resíduos foram secos ≥ 2 horas a 105 °C e depois arrefecidos > 2 horas num exsiccador e pesados. Um cadinho contendo o resíduo foi utilizado para determinação de cinzas a 525 °C, durante 5 horas. Assim determinado, o cadinho contendo as cinzas foi arrefecido durante 2 horas num exsiccador e pesado. O resíduo do cadinho duplicado remanescente foi utilizado para a determinação da proteína pelo método de Kjaldhal. E o teor de fibras foi calculado pelo emprego da **Equação 18**:

$$Fibras (\%) = 100 \times \frac{\left[\left(W_r - \frac{P + A}{100} \right) \times W_r \right]}{W_s} \quad \text{Equação 18}$$

Onde **W_r** (resíduo de mg), **P** (porcentagem de proteína no resíduo), **A** (cinza no resíduo) e **W_s** (peso de farinha de sementes de *S. virgata*).

3.4.6 Matéria seca e matéria orgânica

A matéria seca foi obtida pela diferença entre 100 e o percentual de umidade presente na amostra. Já a matéria orgânica foi obtida pela diferença entre a matéria seca previamente obtida com o teor de cinzas presentes na amostra.

3.4.7 Valor energético

O valor energético, por sua vez, foi calculado a partir da soma e produto dos macro nutrientes (proteína, carboidrato e lipídeos) das sementes pelo percentual energético produzido por cada um, conforme **Equação 19**, sugerida por Brasil (2000), abaixo:

$$Valor\ energético\ (Kcal/100g) = (\%p \times 4\ Kcal) + (\%l \times 9\ Kcal) + (\%c \times 4\ Kcal)$$

Onde **%p** (teor de proteínas), **%l** (teor de lipídeos) e **%c** (teor de carboidratos).

3.5 Perfil de ácidos graxos totais das sementes de *Sesbania virgata*

A metilação dos ácidos graxos presentes nos extratos lipídicos, obtidos a partir do método descrito por Folch, Less e Stanley (1957) foi realizada seguindo a metodologia descrita por Hartman e Lago (1973). A identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa (CG) (Varian 430 - GC, California, EUA), acoplado com detector de ionização de chama (DIC), coluna capilar de sílica fundida (SPTM – 2560, SUPELCO, Bellefonte, EUA) com dimensões de 100 m x 0,25 mm e 0,20 µm de espessura do filme. Foi utilizado o hélio como gás de arraste (vazão de 1,0 mL/minuto).

As condições do CG foram: Temperatura do injetor 250 °C, a temperatura inicial do forno foi de 40 °C por 2 minutos, aumentando-se 10 °C min⁻¹ até atingir 180 °C, permanecendo-se por 30 minutos, seguido por outro aumento com taxa de 10 °C min⁻¹ até atingir 240 °C permanecendo por mais 10 minutos com um tempo total de corrida de 62 minutos; a temperatura do detector foi de 250 °C. Fluxo dos gases auxiliares foram: Hélio 25 mL/minuto, Hidrogênio 30 mL/minuto, Ar sintético 300 mL/minuto. Alíquotas de 1,0 µL do extrato esterificado foram injetadas em injetor tipo Split/Splitless (Split 1:100). Os cromatogramas foram registrados em software tipo Galaxie Chromatography Data System. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras com padrões Supelco ME19 - Kit (Fatty Acid Methyl Esters C4 - C24).

3.6 Processamento das sementes e obtenção dos extratos e frações

Sementes maduras e íntegras de *S. virgata* foram postas para secar ao sol por cinco dias para emergência de possíveis bruquídeos e armazenadas à temperatura ambiente em potes hermeticamente fechados para análises posteriores. Mediante dificuldade em separar as cascas, endosperma e cotilédones, todos foram triturados em moinho elétrico até obtenção de uma farinha fina (FF).

Para obtenção dos extratos e frações proteicas, a FF de sementes de *S. virgata* foi previamente delipídada em n-hexano para remoção de compostos lipídicos. Depois de volatizado todo o n-hexano e a FF seca, foi pesado 1,0 g dessa para extração de suas proteínas. Colocando-a em contato e mantendo sob agitação contínua à temperatura ambiente (25 °C) contra seis diferentes soluções extratoras (15 mL, p/v) que proporcionassem a análise do rendimento protéico e da bioprospecção de proteínas com atividade lectínica e de

inibidores de proteases: i) Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,4; ii) Glicina-HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 2,6; iii) Glicina-NaOH 0,1 mol.L⁻¹ pH 9,0 e iv) Tris-NaOH 0,01 mol.L⁻¹ pH 7,2, todas contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹ além de v) NaCl 0,15 mol.L⁻¹ e vi) água destilada, onde alíquotas foram coletadas após 1, 4, 19, 22 e 24 horas de agitação, compreendendo os tempos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

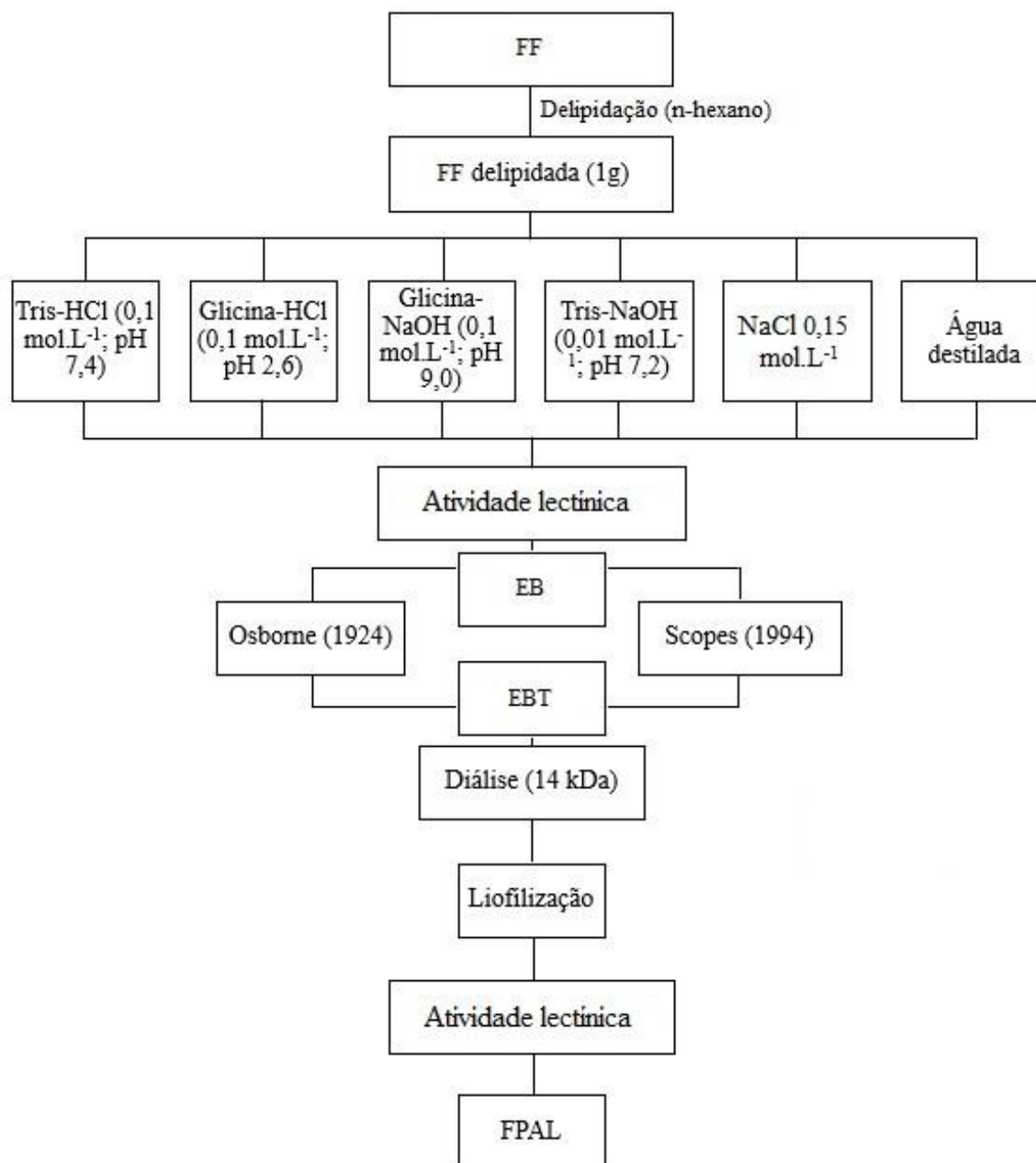
Quando coletadas, 10 mL dessas alíquotas foram centrifugadas a 7.076,3 x g durante 20 minutos a 4 °C. Os centrifugados tiveram seus precipitados descartados e os sobrenadantes, denominados extratos brutos (EB), recolhidos, acondicionados em frascos hermeticamente fechados e armazenados em câmara fria para posterior quantificação do teor de proteínas solúveis (**seção 3.8.1**), determinação da atividade lectínica (**seção 3.7.1.1**) e da atividade antitriptica (**seção 3.7.1.2**).

O EB que apresentou melhor atividade lectínica foi denominado extrato bruto total (EBT) e foi tratado pelo método de Osborne (1924), obtendo-se as frações protéicas albumínicas, globulínicas, prolamínicas, glutelínicas ácidas e básicas; e pelo método de precipitação proteica em sulfato de amônio (SCOPES, 1994). Essas mesmas frações foram avaliadas enquanto boas extratoras de proteínas solúveis, de proteínas com atividade lectínica e de inibidores de proteases.

A caracterização antinutricional, análise protéica e atividades biológicas também foram realizadas com a farinha fina homogeneizada apenas em água destilada. Para tanto, 1,0 g de FF foi homogeneizado em 15 mL de água destilada, agitada em agitador de tubos tipo vórtex por um minuto e centrifugada a 4.000 x g durante 4 minutos para que a parte solubilizada se destacasse da farinha não solubilizada, obtendo-se os homogeneizados de farinha fina (HFF) empregado na detecção de lectinas e inibidores de tripsina. Já nas atividades biológicas, o mesmo procedimento foi feito, contudo foram solubilizados 50 mg de FF tanto em 1,0 mL água destilada (atividade antioxidante) quanto em 10 mL de tampão Glicina-NaOH 0,1 mol.L⁻¹, pH 9,0, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹ (atividades antifúngica e antibacteriana). Nas análises proteicas (SDS-PAGE), 20 mg de FF foram solubilizadas em 1,0 mL de tampão de amostra.

A escolha das soluções e tempos de agitação magnética para delineamento experimental foi inteiramente casualizada, compondo um esquema fatorial em que se avaliaram a utilização dos seis extratos e seus tempos de agitação contra o rendimento protéico e atividade das proteínas presentes em cada extrato protéico. Todo o procedimento está ilustrado na **Figura 6**.

Figura 6 – Obtenção dos extratos e frações proteicas de sementes de *Sesbania virgata*



Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

3.6.1 Fracionamento protéico pelo método de Osborne (1924)

O tempo de agitação magnética e proporção de FF:solução extratora foi mantido; o EBT obtido foi exaustivamente dialisado contra água destilada, centrifugado a $7.076,3 \times g$ por 20 minutos, a 4°C . O sobrenadante compreendeu a fração albumina. O precipitado, depois de ressuspenso na solução de extração, centrifugado nas mesmas condições, rendeu a fração globulina. O precipitado dessa primeira centrifugação foi homogeneizado em etanol 70%

durante uma hora em agitação magnética constante à temperatura ambiente, com posterior centrifugação sob as mesmas condições. O sobrenadante foi filtrado, dialisado contra água destilada, resultando na fração prolamina.

O precipitado da centrifugação anterior foi homogeneizado em HCl 0,1 mol.L⁻¹ durante uma hora em agitação magnética constante à temperatura ambiente, centrifugado a 7.076,3 x g por 20 minutos, a 4 °C. Seu sobrenadante foi filtrado, dialisado contra água destilada, resultando em glutelinas ácidas. O precipitado foi homogeneizado em NaOH 0,1 mol.L⁻¹ durante uma hora em agitação magnética constante à temperatura ambiente e centrifugado sob as mesmas condições. Seu sobrenadante foi filtrado, dialisado contra água destilada, resultando em glutelinas básicas.

3.6.2 Precipitação proteica em sulfato de amônio

Nesta etapa de purificação, o sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) foi utilizado como agente precipitante para o EBT e suas concentrações variaram de 0 a 100%, empregando-se cinco intervalos de saturação: 0-20% (p/v), 20-40% (p/v), 40-60% (p/v), 60-80% (p/v) e 80-100% (p/v), de acordo com Scopes (1994). (NH₄)₂SO₄ foi incorporado lentamente ao EBT com agitação magnética constante até sua total dissolução. Cada intervalo de saturação foi mantido em agitação magnética constante durante três horas em temperatura ambiente, com posterior repouso *overnight*, a 4 °C. Após esse período, cada intervalo de saturação foi centrifugado a 7.076,3 x g durante 20 minutos, a 4 °C; dialisado exaustivamente contra água destilada em membrana de celulose regenerada com poro de 14 kDa; e liofilizado.

3.7 Caracterização antinutricional do homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica obtidos de sementes de *Sesbania virgata*

3.7.1 Fatores antinutricionais de origem protéica

3.7.1.1 Lectinas

A detecção da atividade lectínica foi realizada pelo emprego de ensaios de hemaglutinação contra hemácias de coelho a 3%, segundo metodologia de Debray et al. (1981). Nesse ensaio, inicialmente, os 30 EB foram confrontados contra dois tipos de

soluções de diluição ($\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ e a solução usada para obtenção dos EB, solução de extração – SE) para determinar sua habilidade em hemaglutinar eritrócitos. Posteriormente, o mesmo procedimento foi aplicado ao HFF, FPAL e demais frações obtidas, diferindo apenas na escolha da solução diluente. Para HFF, optou-se em confrontá-lo contra água destilada.

Os eritrócitos usados foram coletados por pulsão venosa da orelha esquerda de coelhos machos com três anos de idade da espécie *Oryctolagus cuniculus*. Tais animais foram mantidos no Biotério Thomas George, do Centro de Biotecnologia da UFPB e todo o procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA/UFPB), conforme **protocolo nº178/2015 (Anexo 1)**. Após coletados, os eritrócitos foram mantidos em solução de EDTA a 8%, posteriormente “lavados” com $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ e centrifugados a $2000 \times g$, durante cinco minutos, cinco vezes até a obtenção de uma massa íntegra de hemácias. Da última suspensão, uma alíquota de $300\mu\text{L}$ foi retirada para preparo de uma solução de eritrócitos a 3% (v/v).

A condução do experimento deu-se mediante uso de $100 \mu\text{L}$ de cada solução de diluição, com posterior acréscimo de igual volume de amostra nos primeiros tubos da estante. Ao fim, $100 \mu\text{L}$ de uma suspensão de hemácias de coelho a 3% (v/v) nativas foram adicionadas. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37°C durante 30 minutos com posterior repouso à temperatura de 25°C por 30 minutos.

A presença da atividade lectínica foi determinada macroscopicamente e observada em intervalos de tempo pre-definidos (30 e 60 min, e 2, 18 e 24 horas). Cada amostra foi submetida a uma série de diluições na base 2 (2^0 , 2^1 , 2^2 , 2^3 , ...), em triplicata, com homogeneização e transferência de $100 \mu\text{L}$ para o tubo seguinte e descarte no último tubo da estante. Os resultados foram expressos em unidade de atividade hemaglutinante (UH), obtida a partir do inverso da maior diluição que apresentou hemaglutinação visível. Tal dado é expresso pelo cálculo de $\text{UH/mg de proteína}^{-1}$.

3.7.1.2 Inibidores de tripsina

Todos os extratos, frações proteicas e o HFF foram submetidos a ensaios de detecção de atividade antitriptica, na presença ou ausência de inibidores de tripsina, de acordo com a metodologia descrita por Xavier-Filho et al. (1989). Para isso, utilizou-se de tripsina bovina e DL-BApNA como seu substrato cromogênico.

Em banho maria, 35 µL de solução da enzima tripsina foram incubados por 10 minutos à 37 °C em 120 µL de solução de HCl 0,0025 mol.L⁻¹, 345 µL de solução tampão de Tris-HCl 0,05 mol.L⁻¹, pH 7,5, e 100 µL de cada solução de amostra. Após pré-incubação, foram adicionados 500 µL de DL-BApNA em todos os tubos, exceto nos controles/brancos, prosseguindo-se de uma nova incubação por mais 15 minutos à 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v) em todos os tubos, completando-se o volume dos controles/brancos com 500 µL de DL-BApNA. Por fim, a hidrólise do substrato pela enzima foi quantificada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 410 nm.

O porcentual de inibição da enzima tripsina foi analisado conforme sugerido por Klomklao, Benjakul e Simpson (2015) e foi gerado a partir da determinação das leituras do controle da enzima e das amostras testadas, conforme emprego da **Equação 20**:

$$\text{Atividade antitriptica (\%)} = \frac{(Ac - As)}{Ac} \times 100 \quad \text{Equação 20}$$

Onde **As** (atividade proteolítica da amostra tratada com inibidor de protease) e **Ac** (controle). O controle foi obtido nas mesmas condições do ensaio, exceto que 100 µL de Tris-HCl 0,05 mol.L⁻¹, pH 7,5, foram usados ao invés da amostra.

A quantificação da unidade de inibidor de tripsina (U.I.T.) expresso por miligrama de proteína foi determinada conforme Klomklao et al. (2010). Esta é dada pelo aumento de absorbância em uma unidade de atividade inibitória por tripsina, correspondente a 0,01 mL⁻¹.min⁻¹ dentro das condições do ensaio. Essa unidade foi definida como a quantidade de inibidor capaz de reduzir a atividade da enzima em uma unidade e a obtenção da U.I.T. ocorreu pelo uso da **Equação 21**:

$$U.I.T. = \frac{\left(\frac{\text{média de absorbância da amostra}}{0,01} \right)}{\text{mgP/mL da amostra}} \quad \text{Equação 21}$$

3.7.2 Fatores antinutricionais de origem não-protéica e amido

Os fatores antinutricionais de origem não-proteica (taninos pirogálicos e catéquicos, saponinas, antocianinas, antocianidinas, flavonóides, catequinas, flavonóis, xantonas, leucoantocianidinas, esteroides e triterpenos) e amido presentes em HFF, EBT e FPAL foram caracterizados, submetendo-os a testes qualitativos, conforme metodologias prescritas por Barbosa et al. (2001), Matos (1997), Robbers et al. (1997), Miranda et al. (2013), Santos e

Mello (2004) e Skoog et al. (2008), com algumas adaptações. Para estas análises, 50 mg de FF foram homogeneizados em 1,0 mL de água destilada (obtendo-se o HFF), e 50 mg de EBT e 50 mg de FPAL foram homogeneizados, individualmente, em 1,0 mL de Glicina-NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 9,0, contendo NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$.

3.7.2.1 *Taninos pirogálicos e catéquicos*

Para a detecção de taninos nas amostras, usou-se 1,0 mL de cada solução de amostra suplementado com três gotas de FeCl_3 . Em seguida, a solução foi agitada e deixada em repouso por cinco minutos. Quando positiva para taninos pirogálicos, esta reação formou um precipitado escuro de tonalidade azul e para taninos catéquicos, um precipitado verde.

3.7.2.2 *Saponinas*

Para a detecção de saponinas nas amostras, transferiu-se 1,0 mL de cada solução de amostra para tubos de ensaio contendo 500 μL de clorofórmio e 1,250 μL de água destilada. Em seguida, a solução foi agitada vigorosamente em agitador de tubos tipo Vortex durante três minutos e deixada em repouso por cinco minutos. Quando positiva para saponinas, esta reação formou espuma e um colarinho no ápice do tubo.

3.7.2.3 *Antocianinas, antocianidinas, catequinas, flavononóis, flavononas e flavonóides*

Para avaliar a presença de antocianinas, antocianidinas, catequinas, flavononóis, flavononas e flavonóides, 2,0 mL de cada solução de amostra foram acomodados em três tubos de ensaio. O primeiro foi acidulado a pH 3,0 com HCl, o segundo alcalinizado a pH 8,5 com NaOH e o terceiro, a pH 11 também com NaOH. Em seguida, foram incubados em estufa a 37°C por 20 minutos observando a mudança de coloração de cada tratamento.

3.7.2.4 *Flavonóis, flavonas e xantonas*

Dilui-se, em dois tubos de ensaio, 500 μL de HCl $5,0 \text{ mol.L}^{-1}$ em 1,0 mL de água destilada e a estes foram adicionados 10 mg de MgSO_4 e 2,0 mL de cada solução de amostra. Em seguida, os tubos foram levados para estufa a 37°C , por 20 minutos, sendo verificado a

mudança/aparecimento da cor vermelha indicando a presença de flavonóis, flavanonas e xantonas.

3.7.2.5 *Leucoantocianidinas*

A 10 mL de cada solução de amostra foram adicionadas cinco gotas de ácido clorídrico concentrado. Em seguida, a solução foi induzida a ebulição, sendo a positividade da reação para a presença de leucoantocianidinas evidenciada pelo aparecimento de coloração vermelha.

3.7.2.6 *Esteroides e triterpenos*

Para detecção de esteroides e triterpenos, 2,0 mL de cada solução de amostra foram acomodados em tubos de ensaios com posterior secura em banho-maria, a 37 °C. Ao resíduo, foram adicionados 2,0 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de cloreto férrico a 1%. A solução foi homogeneizada e minuciosamente transferida para outro tubo de ensaio contendo 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Quando positivo para esteroides, a coloração formada era azulada, e verde para triterpenos.

3.7.2.7 *Amido*

Para a detecção de amido, transferiu-se 1,0 mL de cada solução de amostra para um tubo de ensaio contendo 500 µL de iodo. Em seguida, a solução foi agitada e deixada em repouso por cinco minutos. Quando positiva para amido, esta reação exibiu coloração azulada.

3.8 **Análise protéica e aminoacídica**

3.8.1 Determinação do teor de proteínas solúveis

O teor de proteínas solúveis foi determinado segundo o método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão. A cada 100 µL de amostra, diluídas por intermédio de diluições duplo-seriadas em 100 µL de tampão salino, foram adicionados 2,5 mL de reagente cromogênico de Bradford (*Coomassie Brilliant Blue G-250*). Após a

agitação e repouso por 10 minutos, foi feita a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 595 nm.

3.8.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em condições redutoras (SDS-PAGE)

Visando a determinação do grau de pureza e estimação da massa molecular relativa das proteínas presentes em FF, EBT e FPAL, foram conduzidas eletroforeses em géis compostos de polímeros reticulados de poliacrilamida (que agem como uma peneira molecular, retardando a migração de proteínas aproximadamente em proporção à sua razão carga-massa) em presença de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*, dodecil sulfato de sódio, um detergente capaz quebrar as cadeias polipeptídicas das proteínas, organizando-as em um sistema contínuo de acordo com sua massa molecular e dando-lhes carga final negativa) e β -mercaptoetanol (agente redutor das pontes de dissulfeto). Todo o procedimento (SDS-PAGE) foi conduzido conforme método descrito por Laemmli (1970).

O gel de aplicação foi preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 mol.L⁻¹, pH 6,8, e SDS a 1%, enquanto que o gel de separação foi montado formando um gradiente de 12,5 a 20% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3,0 mol.L⁻¹, pH 8,8, e SDS a 1%. As amostras foram inicialmente dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,625 mol.L⁻¹, pH 6,7, contendo SDS a 2%, glicerol a 10% e β -mercaptoetanol a 5%, aquecidas em estufa a 100 °C durante 10 minutos, centrifugadas por cinco minutos e, em seguida, homogeneizadas em 10 μ L de azul de bromofenol 0,02%.

Um volume de 30 μ L foi aplicado em cada poço e a corrida ocorreu sob amperagem constante de 25 mA. Ao fim, os géis foram retirados da placa e fixados em TCA (*Trichloroacetic acid*, ácido tricloroacético) 12,5% por uma hora, sendo então corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* a 0,005%. A remoção do excesso de corante foi realizada com o auxílio de uma solução descorante de metanol (47,5%) e ácido acético (5%) em água destilada. Foi utilizado marcador de altas massas moleculares (12-225 kDa).

3.8.3 Determinação do perfil de aminoácidos totais

FF e FPAL foram submetidas à hidrólise ácida de proteínas e peptídeos por meio de solução aquosa de ácido clorídrico bidestilado a 104 °C, contendo 0,1% de fenol (p/v), para a quantificação dos aminoácidos lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina,

ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, cisteína, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina e fenilalanina. Após a hidrólise ácida em solução, as amostras foram secas em concentrador rotativo e ressuspendidas em solução tampão de citrato de sódio $0,17 \text{ mol}^{-1}$ pH 2,2, contendo polietilenoglicol 400 a 15% (v/v) e tioglicol 0,4% (v/v) (MOORE, SPACKMAN e STEIN, 1958). Em seguida, as amostras submetidas à hidrólise foram aplicadas em analisador automático e, após eluição em HPLC (C 18 Luna 100 Å, 4,6 mm x 250 mm x 5µm) e reação com ninidrina, os aminoácidos foram detectados colorimetricamente e quantificados. Triptofano não foi determinado.

3.9 Atividades biológicas

As atividades biológicas foram testadas contra HFF, EBT e FPAL. Para estas análises, 10 mg de FF foram homogeneizados em 1,0 mL de água destilada, obtendo-se o HFF; e 10 mg de EBT e 10 mg de FPAL foram homogeneizados, individualmente, em 1,0 mL de Glicina-NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 9,0, contendo NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$.

3.9.1 Atividade sequestrante de radicais livres

3.9.1.1 Método de captura do radical livre ABTS^{•+}

Um dos métodos de determinação da atividade antioxidante empregados foi o de captura do radical orgânico ABTS^{•+}, conforme metodologia proposta por Re et al. (1999), com algumas modificações.

Inicialmente, foram preparadas soluções de metanol a 50% (500 mL de água destilada:500 mL de metanol, v/v), acetona a 70% (300 mL de água destilada:700 mL de acetona, v/v), ABTS^{•+} 7 mM (192 mg de ABTS^{•+} dissolvidos em água destilada ao volume final de 50 mL, p/v) e persulfato de potássio 140 mM (378,4 mg de persulfato de potássio dissolvidos em água destilada até volume final de 10 mL, p/v).

Posteriormente, preparou-se o radical ABTS^{•+} a partir da reação de 5,0 mL da solução estoque de ABTS^{•+} com 88 mL da solução de persulfato de potássio e foi mantido em ambiente protegido da luz, à temperatura ambiente, por 16 horas. Transcorrido esse tempo, 1,0 mL da solução obtida foi diluída em álcool etílico até obtenção de absorbância de $0,70 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$, a 734 nm, em espectrofotômetro. Paralelamente, foi preparada a solução

padrão de Trolox a 2 mM, a partir da dissolução de 25 mg de Trolox em álcool etílico até volume final de 50 mL.

A curva-padrão de Trolox foi determinada em ambiente escuro, pela transferência de alíquotas de 30 μ L de diferentes soluções de Trolox (100 μ M, 500 μ M, 1.000 μ M, 1.500 μ M e 2.000 μ M) para tubos de ensaio contendo 3,0 mL da solução do radical ABTS^{•+}.

A determinação da atividade antioxidante ocorreu em ambiente protegido da luz. Inicialmente, foram transferidos, em triplicata, 50 μ L, 100 μ L e 200 μ L de cada amostra para tubos de ensaio contendo 3,0 mL do radical ABTS^{•+} seguidos de homogeneização e espera de seis minutos para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 734 nm. Utilizou álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro.

A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições das amostras, foi plotada a absorbância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X, a partir da determinação da equação da reta. O valor obtido para o eixo x correspondeu à diluição da amostra (mg/L), equivalente a 1.000 μ M de Trolox. Como controle positivo foi utilizado o Trolox (1.000 μ M) e como negativo, água ultrapura (Mili-Q).

3.9.1.2 Método de captura do radical livre DPPH[•]

O outro método de determinação da atividade antioxidante empregado foi o de captura do radical orgânico DPPH[•], conforme metodologia proposta por Morales e Jimenez-Perez (2001), com algumas modificações.

Inicialmente, foram preparadas soluções de álcool metílico a 50% (500 mL de água destilada:500 mL de álcool metílico, v/v), acetona a 70% (300 mL de água destilada:700 mL de acetona, v/v), solução controle (40 mL da solução de álcool metílico 50% e 40 mL da solução de acetona 70%, com volume completado com água destilada até volume final de 100 mL, v/v/v) e DPPH[•] 0,06 mM (2,4 mg de DPPH[•] dissolvidos em álcool metílico até volume final de 100 mL, p/v).

A curva-padrão de Trolox foi determinada em ambiente escuro, por transferência de alíquotas de 30 μ L de diferentes soluções de Trolox (100 μ M, 500 μ M, 1.000 μ M, 1.500 μ M e 2.000 μ M) para tubos de ensaio contendo 4,0 mL de cada solução de DPPH[•] (10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M e 50 μ M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm após 6 minutos da mistura ser produzida e utilizou álcool metílico como branco.

A determinação da atividade antioxidante ocorreu em ambiente protegido da luz. Inicialmente, foram transferidos, em triplicata, 50 μL , 100 μL e 200 μL de cada amostra para tubos de ensaio contendo 3,0 mL do radical DPPH^{*} seguidos de homogeneização por 80 minutos, centrifugação a 14.152,6 x g e espera de 6 minutos para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm.

A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições das amostras, foi plotada a absorbância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X, a partir da determinação da equação da reta. O valor obtido para o eixo X correspondeu à diluição da amostra (mg/L), equivalente a 1.000 μM de Trolox. Como controle positivo foi utilizado o Trolox (1.000 μM) e como negativo, água ultrapura (Mili-Q).

3.9.2 Ensaios microbiológicos

Os microrganismos foram adquiridos na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ) e no Laboratório de Micologia e de Microbiologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB. As mesmas foram mantidas em meios de cultura apropriados, onde as bactérias foram acomodadas em Agar Nutriente (AN) e os fungos em Agar Sabouraud Dextrose (ASD), e conservados a 4 °C e a 35-37 °C, respectivamente.

A suspensão de microrganismos foi preparada conforme o tubo 0,5 da Escala McFarland, ajustada através de leitura espectrofotométrica, para 90% T (530nm), correspondendo, aproximadamente, a 10^5 Unidades Formadoras de Colônia/mL (UFC/mL) (HADACECK; GREEGER, 2000; NCCLS, 2000; CLEELAND e SQUIRES, 1991). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do HFF (10 mg de FF homogeneizados em 1,0 mL de Glicina 0,1 mol.L⁻¹, pH 9,0, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹), EBT (10 mg de EBT homogeneizados em 1,0 mL de Glicina 0,1 mol.L⁻¹, pH 9,0, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹) e FPAL (10 mg de FPAL homogeneizados em 1,0 mL de Glicina 0,1 mol.L⁻¹, pH 9,0, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹) contra as bactérias e fungos, foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” e em duplicata.

3.9.2.1 Atividade antifúngica

As leveduras utilizadas foram *Candida albicans* (ATCC-76645), *C. albicans* (LM-122), *Candida tropicalis* (ATCC-13803), *C. tropicalis* (LM-64) e *C. tropicalis* (LM-7).

Enquanto os fungos filamentosos foram *Aspergillus flavus* (LM-714), *A. flavus* (LM-247), *Penicillium citrinum* (LM- 9) e *P. citrinum* (LM-60). Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados em meio RPMI 1640, preparado e usado conforme as instruções do fabricante.

Conforme técnica de micro diluição, em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido RPMI 1640 duplamente concentrado, com posterior adição, nas cavidades da primeira linha da placa, de 100 µL das soluções de HFF, EBT e FPAL, também duplamente concentrados. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 32 µg/mL até 1024 µg/mL, onde, na primeira linha da placa se encontrou a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo de cada microrganismo nas cavidades, onde cada coluna da placa referiu-se, especificamente, a um microrganismo.

As placas foram seladas e incubadas a temperatura ambiente (28-30 °C), durante 24-72 horas. Para o controle de atividade antifúngica foi usado os antimicrobianos sintéticos nistatina (100 µg/mL) para leveduras e fluconazol (50 µg/mL), para fungos filamentosos. Sendo considerada como CIM, aquela que, em menor volume, foi capaz de inibir o crescimento dos microrganismos usados nos ensaios, quando comparado com o crescimento controle. Os resultados foram expressos pela média geométrica dos valores de CIM obtidas nos ensaios (CLEELAND e SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; SOUZA et al., 2007).

3.9.2.2 Atividade antibacteriana

Para o controle de atividade antibacteriana, foi usado o antimicrobiano sintético cloranfenicol (100 µg/mL). E as cepas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC-13150), *S. aureus* (LM-117), *S. epidermidis* (ATCC- 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC- 25853), *P. aeruginosa* (P-03), *Bacillus subtilis* (ATCC- 6633), *Echerichia coli* (ATCC- 10436) e *E. coli* (EC-12). Os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados em meio líquido Caldo *Brain Heart Infusion* (Caldo BHI), preparado e usado conforme as instruções do fabricante.

A técnica de micro diluição aplicada às cepas seguiu o mesmo protocolo da **seção 3.9.2.1**, contudo, substituiu-se a aplicação dos 100 µL do meio líquido RPMI 1640 duplamente concentrado, por Caldo BHI, nas mesmas condições. A incubação das placas foi a 35 °C durante 24-72 horas. Passadas as 24 horas de incubação, foi adicionado 20 µL de solução do corante resazurina a 0,01%, reconhecido como um indicador colorimétrico de

óxido-redução (MANN e MARKAN, 1998). Após a mudança de coloração do corante (azul para vermelho), considerou-se como indicador de crescimento microbiano; e se a cor permaneceu azul, significou a ausência de crescimento microbiano.

Sendo considerada como CIM, aquela concentração que em menor volume foi capaz de inibir o crescimento dos microrganismos usados nos ensaios, quando comparado com o crescimento controle. Cujas atividades antimicrobianas dos homogeneizados foram interpretadas e consideradas ativas ou não, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL (forte/ótima atividade); 600-1500 µg/mL (moderada atividade); e acima de 1500 µg/mL (fraca atividade ou produto inativo) (SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

3.10 Análises estatísticas

Os resultados obtidos nos ensaios de determinação de atividade antioxidante foram expressos como média e seu correspondente erro padrão. Utilizou-se a análise estatística One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnett, para investigar as diferentes concentrações de amostra em relação ao controle negativo (água ultra pura Milli-Q, que tem 0% de atividade antioxidante). Foram consideradas como significativas as diferenças com valores de *p* inferiores a 0,05. A obtenção dos dados e sua análise deu-se pelo uso do software Prism for Windows (GraphPad Prism®) versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises morfo-físico-químicas das sementes e vagens de *Sesbania virgata*

Para fins comparativos, os resultados obtidos foram contrastados com outras espécies de feijão, onde, de acordo com as análises realizadas, as sementes de *S. virgata* apresentam coloração em tons de marrom claro (**Tabela 1**), assemelhando com sementes de *S. aculeata* (marrom escuro), *S. rostrata* (marrom), *S. sesban* acessão 10865D (marrom esverdeado) e *S. sesban* acessão 15019D (verde), cuja análise foi publicada anteriormente por Hossain e Becker (2001). Esse parâmetro representa um dos determinantes na aceitação comercial de uma cultivar, haja visto que uma semente com tonalidades muito escuras é raramente aceita à comercialização (OLIVEIRA, 2010; VIEIRA et al., 2002). Assim, caso fossem expostas comercialmente como produto alimentar, é de se esperar que as sementes de *S. virgata* estariam livres dessa rejeição e seriam facilmente inseridas no mercado.

A densidade (0,86 g/mL) das sementes de *S. virgata* é similar às apresentadas por *Phaseolus vulgaris* L., variedades BRS Pontal (1,11 g/mL), BRS Supremo (1,17 g/mL) e WAF 75 (1,19 g/mL) (SILVA, ROCHA e CANNIATTI-BRAZACA, 2009) e às densidades de *S. aculeata* (0,88 g/mL), *S. rostrata* (0,83 g/mL), *S. sesban* acessão 10865D (0,86 g/mL) e *S. sesban* acessão 15019D (0,85 g/mL) (HOSSAIN e BECKER, 2001).

A massa seca das sementes de *S. virgata*, teve seu peso individual de 0,08 g/semente. O peso de 100 sementes (7,57 g/100 sementes) foi inferior ao de *P. vulgaris* L., variação Talismã (19,48 g/100 sementes) (NUNES et al., 2007) e genótipos Manchinha (29,14 g/100 sementes), Amendoim Lages (40,81 g/100 sementes), Preto Lages (17,61 g/100 sementes) e Taquara (22,23 g/100 sementes) (COELHO et al., 2010), porém superior ao de *S. aculeata* (1,58 g/100 sementes), *S. rostrata* (1,58 g/100 sementes), *S. sesban* acessão 10865D (0,95 g/100 sementes) e *S. sesban* (cessão 15019D (0,88 g/100 sementes) (HOSSAIN e BECKER, 2001). O peso de mil sementes (75,89 g/1000 sementes) foi inferior ao de *Vigna unguiculata*, cultivares BRS Novaera (158,55 g/100 sementes) e BRS Marataoã (146,75 g/100 sementes) (OLIVEIRA, 2012) e de *P. vulgaris* L., cultivares TPS Bionobre (244,08 g/1000 sementes), TPS Nobre (222,50 g/1000 sementes), Xamego (221,87 g/1000 sementes) e Iapar 44 (199,46 g/1000 sementes), mas foi superior ao de *V. unguiculata*, cultivar BRS Guariba (19,35 g/100 sementes) (OLIVEIRA, 2012).

Tabela 1 – Parâmetros morfo-físico-químicos das sementes e vagens de *Sesbania virgata*

Parâmetros avaliados	Percepções/valores
Coloração da semente	Marrom claro
Densidade da semente (g/mL) *	0,86 ± 0,005
Peso individual da semente (g/semence) **	0,08 ± 0,009
Peso de 100 sementes (g/100 sementes) **	7,57 ± 0,01
Peso de 1000 sementes (g/1000 sementes)	75,89
Espessura da semente (cm) *	0,37 ± 0,05
Largura da semente (cm) *	0,40 ± 0,000
Comprimento da semente (cm) *	0,60 ± 0,000
Peso individual da vagem com sementes (g/vagem) *	0,90 ± 0,003
Peso de 100 vagens com sementes (g/100 vagens) *	76,17 ± 0,02
Número de sementes por vagem ***	6,00 ± 0,5
Espessura da vagem (cm) ***	0,60 ± 0,000
Largura da vagem (cm) ***	0,87 ± 0,05
Comprimento da vagem (cm) ***	6,13 ± 0,05
Capacidade de hidratação da semente (g/semence) *	0,03 ± 0,001
Capacidade de hidratação da semente (%) *	15,19 ± 0,003
Capacidade de absorção aquosa da semente (mL/semence) *	0,01 ± 0,000
Capacidade de absorção aquosa da semente (%) *	37,98 ± 0,005
Índice de hidratação da semente *	0,34 ± 0,009
Índice de absorção aquosa da semente *	0,17 ± 0,01
Índice de absorção de água pela farinha (g H ₂ O/g farinha) *	3,64 ± 0,002
Índice de solubilidade da farinha em água (g H ₂ O/g farinha) *	3,64 ± 0,002
Teor de clorofila a presente na farinha (mg.100 ⁻¹ g) *	0,03 ± 0,008
Teor de clorofila b presente na farinha (mg.100 ⁻¹ g) *	0,03 ± 0,01
Teor de clorofila totais presente na farinha (mg.100 ⁻¹ g) *	0,26 ± 0,09
Teor de carotenoides totais presente na farinha (mg.100 ⁻¹ g) *	0,34 ± 0,09

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, com n=3 (*), n=8 (**) e n=10 (***).

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

Já as dimensões das sementes de *S. virgata* foram de 0,37 cm de espessura, 0,4 cm de largura e 0,6 cm de comprimento, o que foi permitido concluir, baseado nas análises de Coelho et al. (2007), que a forma e achatamento destas é do tipo cheia e sua morfologia se caracteriza como sendo do tipo elíptica.

A massa seca das vagens (0,90 g/vagem) de *S. Virgata* apresentou valores inferiores aos encontrados por Públio-Júnior (2014), cujo peso médio individual da vagem dos 20 cultivares e genótipos de *V. unguiculata* foi de 2,89 g/vagem, bem como aos encontrados (2,96 g/vagem) por Santos (2013) para as cultivares BRS Potengi, BRS Pajeú, BS Potiguar, Miranda IP A-207 e BRS Marataoã. Quanto ao peso de 100 vagens, observou-se que, quando com sementes, foi de 76,17 g/100 vagens.

O número médio de sementes presentes nas vagens de *S. virgata* foi de seis e em *V. unguiculata* (PÚBLIO-JÚNIOR, 2014) foi de 10 sementes. Essa característica é, segundo Lopes et al. (2001), um dos componentes de rendimento comumente atingidos pelas mudanças ambientais. Ademais, o tamanho da vagem da *V. unguiculata* permitiu o desenvolvimento de um número de sementes bem superior ao de *S. virgata*. A distância com que as vagens de *S. virgata* atingiram do solo compreendeu o comprimento superior a 50 cm de altura, um atributo intimamente relacionado ao melhoramento da semente mediante mecanização das fases de cultivo e colheita. Segundo Silva, Aidar e Kluthcouski (1999), quando o entrelaçamento entre as plantas ocorre em distâncias consideráveis do solo, as vagens situam-se ao alcance da barra de corte das máquinas, facilitando o ceifamento e promovendo baixo percentual de perda de sementes. Deste modo, ao estarem dentro das conformidades justapostas, o rendimento pós-colheita das sementes de *S. virgata* deve ser assegurado, pois a perda de sementes não será um fator que preocupará o agricultor.

As vagens de *S. virgata* apresentaram 0,6 cm de espessura, 0,87 cm de largura e 6,13 cm de comprimento, bem inferior a vagem de *V. unguiculata*, que tem média geral de 17,25 cm de comprimento. Quanto maior o comprimento da vagem, maior será o número de sementes presentes nelas, porém, de acordo com Silva e Neves (2011), essa condição só é desejada em colheitas manuais. Nos cultivos com colheita mecanizada, vagens com comprimentos elevados e com muitas sementes não são favoráveis devido às perdas pelo sistema empregado. Ademais, vagens menores e com um menor número de sementes, como as de *S. virgata*, fixam melhor sua infrutescência no pedúnculo que as sustentam, reduzindo as chances desse dobrar e quebrar, ou apodrecerem tardiamente por estarem menos sujeitas a encostarem no solo.

Pelo seu elevado teor protéico, o feijão tem maior facilidade de interagir com compostos aquosos, interferindo em suas CH e CAA (ROMANO, 2006). Isoladamente, a CAA pela semente reflete o balanço do fluxo aquoso com a perda de compostos sólidos solúveis do feijão, enquanto a CH compreende o estágio onde a absorção de água é baixa e a perda desses sólidos é maior (HINCKS e STANLEY, 1986). Em *S. virgata*, a CH apresentou valores de 0,03 g/semente e 15%, enquanto a CAA, 0,01 mL/semente e 38%. Os teores de CH são similares aos apresentados por *S. aculeata*, *S. rostrata* e *S. sesban* acessões 10865D e 15019D (0,01 g/semente). Já a CAA das sementes de *S. virgata* foi muito similar ao encontrado pelas mesmas espécies (0,01 mL/semente) (HOSSAIN e BECKER, 2001). De acordo com Romano (2006), essas capacidades são influenciadas pelo tempo em que o feijão fica armazenado e pelas condições de secagem impostas, além das mudanças bioquímicas

e/ou físico-químicas ocorridas nos cotilédones das sementes, com consequente deterioração de suas membranas.

As análises dos índices IHg (0,34) e IAAg (0,17) das sementes de *S. virgata* evidenciaram que foram semelhantes àqueles encontrados em *S. aculeata* (0,79 e 0,84), *S. rostrata* (0,44 e 0,42), *S. sesban* acessão 10865D (0,63 e 0,73) e *S. sesban* acessão 15019D (0,56 e 0,53), respectivamente (HOSSAIN e BECKER, 2001). Tais índices refletem a dureza e impermeabilidade das cascas das sementes, com consequente baixa hidratação e absorção aquosa, o que pode demandar um tempo maior na germinação (CHAVAN et al., 1998). Como, caracteristicamente, as sementes de *S. virgata* são rígidas, a evidente predileção pelos consumidores pode ser comprometida quando for requerido um tempo maior em cocção ao consumo humano.

A farinha de sementes de *S. virgata* apresentou IAAf (3,64 g H₂O/g farinha) superior ao das farinhas de *Zea mays* (2,78 g H₂O/g farinha), de *P. vulgaris* tipo carioca (3,30 g H₂O/g farinha) e de *Oryza sativae* (2,42 g H₂O/g farinha), enquanto seu ISAf (3,6 g H₂O/g farinha) superou apenas o das farinhas de *Z. mays* (1,76 g H₂O/g farinha) e de *O. sativae* (0,76 g H₂O/g farinha), conforme Moura (2012). Esses índices relacionam a ação da água no cotilédone com sua consequente qualidade pós-intervenção aquosa. Enquanto o IAAf reflete a quantidade de água que é absorvida pelos grânulos de amido presentes na farinha, cuja elevada absorção é requerida em alimentos pastosos, como sopas, mingaus e pudins (ANDERSON et al., 1969; TORRES et al., 2005); o ISAf aponta o grau de degradação que a água ocasiona nas fibras presentes na farinha, onde o elevado índice de solubilidade correlaciona a funcionalidade que essa mesma fibra vem a dispor, além de sua estabilidade e viscosidade (GUTKOSKY, 1997; GUILLON e CHAMP, 2000). Assim, a análise desses resultados indicam que a FF de *S. virgata* pode ser manipulada no intuito de se obter subprodutos diversos, aplicados à variados ramos da indústria alimentícia.

Dentre os pigmentos fotossintéticos presentes em vegetais, as clorofilas são pigmentos situados no interior dos cloroplastos, são categorizadas em clorofila a e clorofila b, e imprimem grande importância à fisiologia dos cloroplastos (ZHOU et al., 2017). Nas sementes de *S. virgata*, tanto o teor de clorofila a (0,03 mg.100⁻¹g) quanto o de clorofila b (0,03 mg.100⁻¹g), foram inferior ao de *P. aureus* (0,09 mg.100⁻¹g e 0,38 mg.100⁻¹g, respectivamente) (SRIVASTAVA et al., 2011). Contudo, o teor de clorofila total (0,26 mg.100⁻¹g) encontrado na FF de sementes de *S. virgata* foi semelhante aos teores de *P. aureus* (0,47 mg.100⁻¹g) (SRIVASTAVA et al., 2011) e *Cassia pumila* (0,75 mg.100⁻¹g), mas

inferior aos de *C. nodosa* (0,94 mg.100⁻¹g) e *C. renigera* (0,94 mg.100⁻¹g) (SHARMA et al., 2013).

Os carotenóides são pigmentos vegetais lipossolúveis, que, ao serem inseridos na alimentação humana, promovem, através de sua conversão metabólica, a síntese da vitamina A, a prevenção do envelhecimento prematuro da pele e o retardamento do câncer (CHACÓN-ORDÓÑEZ, 2017). Se caracterizam como um dos grupos mais importantes à fisiologia vegetal (HOSSEINI, TAVAKOLI e SARRAFZADEH, 2017) ao se correlacionarem com os mecanismos de fotoproteção e de resistência à variações e nitrogênio ou senescência foliar (KIRCHGEßNER et al., 2003; MUNNÉ-BOSCH e PEÑUELAS, 2003). Na FF de sementes de *S. virgata*, o teor de carotenoides totais encontrado (0,34 mg.100⁻¹g) foi semelhante aos de *C. nodosa* (0,36 mg.100⁻¹g), *C. pumila* (0,3 mg.100⁻¹g), *C. renigera* (0,1 mg.100⁻¹g) (SHARMA et al., 2013) e *P. aureus* (0,06 mg.100⁻¹g) (SRIVASTAVA et al., 2011).

4.2 Composição química parcial e valor energético das sementes de *Sesbania virgata*

A determinação da composição proximal da FF, obtida de sementes de *S. virgata* encontra-se na **Tabela 2**, cujos valores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos foram obtidos em triplicata e expressos em porcentagem.

A umidade (8,42%) apresentada pela FF de sementes de *S. virgata* se encontrou abaixo do valor máximo (15,0%) (**Tabela 2**) estimado para farinhas vegetais, conforme a Resolução RDC nº 263 (BRASIL, 2005); estando, portanto, de acordo com a legislação brasileira, podendo ser considerada como um alimento estável, passível de ser posta no mercado, sob este parâmetro. Foi ainda, inferior aos teores apresentados por *V. unguiculata*, cultivares BRS Xiquexique (9,38%), BRS Tumucumaque (9,77%), BRS Aracê (10,41%) e BR-17Gurguéia (9,29%) (PEREIRA, 2014) e às cultivares de *P. vulgaris*, TARS-MST1 (11,2%), Verano (11,1%) e Zorro (11,2%) (PORCH et al., 2016). Contudo, foi similar aos teores de *P. lunatus*, cultivares Munición morado 562 (8,5%) e IBES-503-B (8,7%) (LA VEGA e SOTELO, 1986). Quando comparado com o teor de umidade das sementes de outras espécies de *Sesbania*, percebe-se que foi inferior aos teores de *S. aculeata* (10,5 g/100g⁻¹) e *S. rostrata* (9,6 g/100g⁻¹), similar aos de *S. sesban* acessão 10865D (8,7 g/100g⁻¹) e superior ao de *S. sesban* acessão 15019D (7,8 g/100g⁻¹) (HOSSAIN e BECKER, 2001).

Tabela 2 – Composição química parcial e valor energético das sementes de *Sesbania virgata*

Parâmetros avaliados	Índices
Umidade	8,42 ± 0,000
Cinzas totais	4,77 ± 0,02
Proteína total	60,79 ± 0,18
Extrato etéreo (lipídeos)	7,64 ± 0,19
Fibras alimentares insolúveis	4,40 ± 0,21
Fibras alimentares solúveis	0,35 ± 0,04
Fibras totais	4,75 ± 0,32
Carboidratos digeríveis	13,68 ± 0,30
Matéria seca	91,58 ± 0,09
Matéria orgânica	90,45 ± 0,03
Valor energético 366,60 kcal/100g	

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, com n=3.

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

O teor de cinzas totais (4,77%) observado para a FF de sementes de *S. virgata* (**Tabela 2**) foi superior àqueles encontrados em *O. sativae* (0,45%); *Z. mays* (0,36%) (MOURA, 2012); *P. vulgaris*, cultivares TARS-MST1 (3,83%), Verano (3,84%) e Zorro (4,10%) (PORCH et al., 2016); e *P. lunatus*, variedades IBES-503-B (4,0%) e Munición morado 562 (3,9%) (LA VEGA e SOTELO, 1986), assim como na FF de sementes de *S. aculeata* (3,9%), *S. rostrata* (4,0%), *S. sesban* acessão 10865D (2,7%) e *S. sesban* acessão 15019D (3,3%) (HOSSAIN e BECKER, 2001). Esse teor compreende a parte inorgânica do alimento que possui relação direta com o solo onde a semente foi cultivada (SILVA, 1990). Embora a FF de sementes de *S. virgata* esteja em desconformidade (0,77%) ao teor máximo (4,0%) permitido pela legislação brasileira para farináceos vegetais (BRASIL, 1978), ela pode ser considerada um alimento estável. Porém, nem sempre esse índice caracteriza a real riqueza inorgânica presente na semente, uma vez que alguns nutrientes podem ser alterados em contato com o calor extremo imposto pelo processo (AOAC, 2005). A elevação do teor de cinzas pode estar correlacionada com o solo onde as sementes foram germinadas, caracterizado por sua abundância em matéria úmida e de constante visitação de bovinos, que corroboram com a fertilização e riqueza mineralógica deste.

O elevado conteúdo protéico (60,79%) da FF de sementes de *S. virgata* (**Tabela 2**) se destaca em relação a outras espécies de feijão, como o *P. vulgaris* (21,2% segundo FROES, 2012; e 21,34%, segundo MOURA, 2012), além de suas cultivares TARS-MST1 (22,8%), Verano (24,3%) e Zorro (22,9%) (PORCH et al., 2016). As cultivares de *P. lunatus*, Munición

morado 562 (18,3%) e IBES-503-B (21,2%) (LA VEGA e SOTELO, 1986); e de *V. unguiculata*, BRS Xiquexique (22,4%), BRS Tumucumaque (23,7%), BRS Aracê (24,8%), BRS Guariba (24,1%) e BR-17 Gurguéia (24,5%) (PEREIRA, 2014); além do *O. sativae*, (9,03%) e *Z. mays* (19,47%) (MOURA, 2012) e da *S. aculeata* (33,1%), *S. rostrata* (32,0%), *S. sesban* acessão 10865D (32,3%) e *S. sesban* acessão 15019D (29,1%) (HOSSAIN e BECKER, 2001), também não superam o teor protéico da *S. virgata*.

As sementes de *S. virgata* são excelentes fontes protéicas que superarem os teores de proteína (25%) esperados para a maioria das cultivares de feijão (MOURA, 2012). Contudo, mesmo sendo uma surpreendente matriz nutricional, a legislação brasileira recomenda, conforme Resolução-RDC Nº 269, de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005), que a ingestão diária seja quantificada conforme a faixa etária, a saber: crianças de 1-3 anos (13 g), crianças de 4-6 anos (19 g), crianças de 7-10 anos (34 g), adultos (50 g), gestantes (71 g), lactantes de 0-6 meses (9,1 g) e lactantes de 7-11 meses (11 g).

A composição da FF de *S. virgata* detém um teor de lipídios de 7,64% (**Tabela 2**), sendo superior aos cultivares de *V. unguiculata*, BRS Xiquexique (2,67 %), BRS Tumucumaque (2,57%), BRS Aracê (2,77%), BRS Guariba (2,43%) e BR-17 Gurguéia (2,15%) (PEREIRA, 2014); aos cultivares de *P. lunatus*, Município morado 562 (2,1%) e IBES-503-B (1,4%) (LA VEGA e SOTELO, 1986); ao *P. vulgaris* (0,9%) (FROES, 2012) e suas cultivares, TARS-MST1 (1,53%), Verano (1,58%) e Zorro (1,08%) (PORCH et al., 2016); além dos teores apresentados pela *S. aculeata* (6,0%), *S. rostrata* (4,7%), *S. sesban* acessão 10865D (5,0%) e *S. sesban* acessão 15019D (6,0%) (HOSSAIN e BECKER, 2001).

De acordo com a *American Association of Cereal Chemists* (AACC, 2001), as fibras alimentares compreendem carboidratos resistentes à digestão e absorção no intestino delgado humano. Dentre os tipos de fibras alimentares possíveis, têm-se as insolúveis e as solúveis. Ramírez-Jiménez et al., (2015) descrevem as fibras alimentares insolúveis como correlacionadas à baixa absorção lipídica no intestino, aumentando o volume de fezes no trato gastrointestinal, enquanto as fibras alimentares solúveis categorizam-se como carboidratos capazes de reduzir a formação das lipoproteínas de baixa e média densidade no intestino.

Mediante análise do teor de fibras alimentares presentes na FF de *S. virgata*, observou-se que as fibras alimentares insolúveis correspondem a 4,40% do teor de carboidratos; as fibras alimentares solúveis compreendem 0,35%; e o teor de fibras alimentares totais foi de 4,75% (**Tabela 2**). Quando comparadas com os teores presentes nas sementes de *Ocimum basilicum* (total 62,85%; insolúvel 41,86% e solúvel 20,99%) (HAJMOHAMMADI et al., 2016); *P. vulgaris* variedades Negro 8025 (total 35,97%,

insolúvel 32,23% e solúvel 1,87%) e Bayo Made,o (total 43,91%, insolúvel 41,52% e solúvel 2,39%) (RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2014); *Cicer arietinum* (total 9,19%, insolúvel 5,45% e solúvel 3,74%); *Lens culinaris* (total 9,23%, insolúvel 8,17% e solúvel 1,06%); *P. lunatus* (total 8,42%, insolúvel 6,96% e solúvel 1,46%); e *Pisum sativum* (total 5,92%, insolúvel 4,57% e solúvel 1,35%) (ALDWAIRJI et al., 2014) viu-se que aqueles apresentados foram inferiores. Contudo, quando comparados com os teores das sementes de *V. mungo* (total 4,43%, insolúvel 3,64% e solúvel 0,79%) (ALDWAIRJI et al., 2014), percebeu-se uma aproximação dos valores.

Quando calculado o teor de carboidratos digeríveis (13,68%) presente na FF de sementes de *S. virgata* (**Tabela 2**), viu-se que este foi inferior aos apresentados pelos cultivares de *V. unguiculata*, BRS Xiquexique (62,22%), BRS Tumucumaque (60,15%), BRS Aracê (58,0%), BRS Guariba (61,17%) e BR-17 Gurguéia (59,90%) (PEREIRA, 2014); dos cultivares de *P. vulgaris*, TARS-MST1 (60,16%), Verano (59,18%) e Zorro (60,72%) (PORCH et al., 2016); aos cultivares de *P. lunatus*, Munición morado 562 (69,3%) e IBES-503-B (67,5%) (LA VEGA e SOTELO, 1986); dos valores de *O. sativae* (75,73%), *Z. mays* (79,71%) e *P. vulgaris* (62,05%) (MOURA, 2012) e de *P. vulgaris* (86,03%) (FROES, 2012). Quando comparados com os teores de *S. aculeata* (46,5%), *S. rostrata* (49,7%), *S. sesban* acessão 10865D (51,3%) e *S. sesban* acessão 15019D (53,8%) (HOSSAIN e BECKER, 2001) percebe-se que o teor de carboidratos de *S. virgata* também foi inferior.

A matéria seca das sementes de *S. virgata* apresentou valor superior (91,58 g/100g⁻¹) (**Tabela 2**) ao dos cultivares de *V. unguiculata*, BRS Xiquexique (90,62 g/100g⁻¹), BRS Tumucumaque (90,23 g/100g⁻¹), BRS Aracê (89,959 g/100g⁻¹) e BR-17 Gurguéia (90,71 g/100g⁻¹) (PEREIRA, 2014), além de *S. aculeata* (89,5 g/100g⁻¹) e *S. rostrata* (90,4 g/100g⁻¹) (HOSSAIN e BECKER, 2001); foi semelhante ao encontrado em *S. sesban* acessão 10865D (91,3 g/100g⁻¹) (HOSSAIN e BECKER, 2001) e nos cultivares de *P. lunatus*, Munición morado 562 (91,5 g/100g⁻¹) e IBES-503-B (91,3 g/100g⁻¹) (LA VEGA e SOTELO, 1986); e inferior ao de *Z. mays* (96,16 g/100g⁻¹) (MOURA, 2012) e de *S. sesban* acessão 15019D (92,2 g/100g⁻¹) (HOSSAIN e BECKER, 2001).

A matéria orgânica (90,45 g/100g⁻¹) das sementes de *S. virgata* (**Tabela 2**) apresentou teor superior ao de *S. aculeata* (85,6 g/100g⁻¹), *S. rostrata* (86,4 g/100g⁻¹), *S. sesban* acessão 10865D (88,6 g/100g⁻¹), *S. sesban* acessão 15019D (88,9 g/100g⁻¹) (HOSSAIN e BECKER, 2001); aos cultivares de *V. unguiculata*, BRS Xiquexique (87,29 g/100g⁻¹), BRS Tumucumaque (86,42 g/100g⁻¹), BRS Aracê (85,57 g/100g⁻¹), BRS Guariba (87,70 g/100g⁻¹) e BR-17 Gurguéia (86,55 g/100g⁻¹) (PEREIRA, 2014); aos

cultivares de *P. vulgaris*, TARS-MST1 (84,97 g/100g⁻¹), Verano (85,06 g/100g⁻¹) e Zorro (84,69 g/100g⁻¹) (PORCH et al., 2016); aos cultivares de *P. lunatus*, Munición morado 562 (87,6 g/100g⁻¹) e IBES-503-B (87,3 g/100g⁻¹) (LA VEGA e SOTELO, 1986); e ao de *O. sativae* (85,20 g/100g⁻¹), *P. vulgaris* (87,84 g/100g⁻¹) (MOURA, 2012). Contudo, foi inferior ao de *Z. mays* (91,73 g/100g⁻¹) (MOURA, 2012).

O valor energético das sementes de *S. virgata* (366,60 kcal/100g) (**Tabela 2**) foi superior ao encontrado em *O. sativae* (342,95 kcal/100g), *Z. mays* (356,80 kcal/100g), *P. vulgaris* (346,33 kcal/100g) (MOURA, 2012), e aos cultivares de *V. unguiculata*, BRS Xiquexique (362,51 kcal/100g), BRS Tumucumaque (358,53 kcal/100g), BRS Aracê (356,13 kcal/100g), BRS Guariba (362,95 kcal/100g) e BR-17 Gurguéia (356,95 kcal/100g) (PEREIRA, 2014), e nas cultivares de *P. vulgaris*, TARS-MST1 (345,61 kcal/100g), Verano (348,14 kcal/100g) e Zorro (344,2 kcal/100g) (PORCH et al., 2016). Contudo, foi inferior ao encontrado nos cultivares de *P. lunatus*, Munición morado 562 (369,3 kcal/100g) e IBES-503-B (367,4 kcal/100g) (LA VEGA e SOTELO, 1986), *S. sesban* acessão 15019D (385,6 kcal/100g), *S. sesban* acessão 10865D (379,4 kcal/100g), *S. aculeata* (369,1 kcal/100g) e *S. rostrata* (372,4 kcal/100g) (HOSSAIN e BECKER, 2001).

Desse modo, e considerando a importância do consumo de feijão em face de seu elevado teor protéico e por ser responsável pelo abrandamento da fome oculta que assola bilhões de pessoas em todo o mundo, acredita-se no potencial nutricional das sementes de *S. virgata*, baseado nos valores de sua composição química parcial apresentados na presente pesquisa.

4.3 Perfil de ácidos graxos totais das sementes de *Sesbania virgata*

Caracteristicamente, os lipídeos são polímeros de ácidos graxos, que podem ou não apresentar saturações, caracterizando-os como saturados ou insaturados. Os ácidos graxos saturados dispõem de todos os seus átomos de hidrogênio ocupados com interações com átomos de carbono, mediante ligações simples (KODALI e LIST, 2006). Os ácidos graxos insaturados apresentam de uma a seis duplas ligações entre os seus constituintes, variando quanto sua localização e configuração (VISENTAINER e FRANCO, 2006). Visando acompanhar a biodisponibilidade lipídica das sementes de *S. virgata*, a **Tabela 3** apresenta o perfil de ácidos graxos totais que compreendem tais sementes, cujos valores estão expressos em porcentagem (%).

Tabela 3 – Perfil de ácidos graxos totais presentes nas sementes de *Sesbania virgata*

Variável		Ácido graxo	%
Saturados		C16:0 (Palmítico)	26,05 ± 2,95
		C18:0 (Esteárico)	4,85 ± 0,55
		C22:0 (Behênico)	0,00 ± 0,00
		C24:0 (Lignocérico)	0,80 ± 0,00
Insaturados	Monoinsaturados	C16:1 (Palmitoléico)	9,60 ± 0,50
		C18:1 (Oléico)	12,95 ± 0,95
	Poli-insaturados	C18:2 (Linoléico)	27,85 ± 3,15
		C18:3 (Linolênico)	17,90 ± 0,40

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, com n=3.

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

Dentre os oito ácidos graxos detectados na FF das sementes de *S. virgata*, quatro deles caracterizaram-se como saturados e quatro como insaturados (subdivididos em dois monoinsaturados e dois poli-insaturados) (**Tabela 3**). Os poli-insaturados foram os ácidos graxos mais abundantes na FF de sementes de *S. virgata*, onde o ácido linoléico representou 27,85% do teor total, enquanto o ácido linolênico, 17,90%. Linoléico e linolênico são ácidos graxos essenciais, cujos mamíferos necessitam que sejam fornecidos através de sua dieta, pois não conseguem sintetizar através de seu metabolismo. A presença destes ácidos graxos é desejável para suprir tais necessidades, tornando a FF investigada um alimento potencial para suprir a carência desses ácidos graxos essenciais.

O somatório de todos os ácidos graxos insaturados detectados perfaz 68,40% dos ácidos graxos determinados no cromatograma. As análises feitas por Hossain e Becker (2001) apontaram teores inferiores (5,22%) de ácido linolênico aos encontrados aqui e em *S. aculeata*, *S. rostrata*, *S. sesban* acessão 10865D e *S. sesban* acessão 15019D, enquanto os teores de ácido linoléico foram superiores (58,12%) nas mesmas espécies investigadas.

O restante das áreas totais do cromatograma contemplam os ácidos graxos saturados. Destes, o ácido palmítico foi o que mais contribuiu (26,05%) para o perfil dos ácidos graxos, seguido do ácido esteárico, com 4,85% do teor total. O ácido palmítico se caracteriza como o ácido graxo saturado frequentemente abundante na alimentação humana, seguido dos ácidos esteárico e mirístico (CHONG, SINCLAIR e GUYMER, 2006). Embora os teores de ácido palmítico também tenham sido elevados em *S. aculeata*, *S. rostrata*, *S. sesban* acessão 10865D e *S. sesban* acessão 15019D (13,45%) (HOSSAIN e BECKER, 2001), estes foram inferiores quando comparados aos encontrados nessa pesquisa.

Frente a esta biodisponibilidade energética e sua influência na saúde humana, sabe-se que o estilo de vida adotado tem ação direta no desenvolvimento de patologias. Os fatores relacionados à predileções por consumo de *fast-foods*, ricos em sal e com alta densidade energética, associados a redução da prática de atividades físicas e do consumo de vegetais, têm permitido aos brasileiros, nas últimas décadas, notórias transições nutricionais e epidemiológicas, contribuindo com a instalação de doenças crônicas não transmissíveis (BRASIL, 2005; BRASIL, 2004; CARVALHAES, MOURA e MONTEIRO, 2008).

Tal problemática fez com que, em 2002, especialistas da Organização Mundial da Saúde e da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação, reconhecessem que mudanças nesses fatores deveriam ser emergencialmente implementados, amparadas pela redução do consumo de óleos e gorduras prejudiciais ao organismo (NISHIDA e UAUY, 2009).

Deste modo, por mais que a FF de sementes de *S. virgata* seja uma excelente fonte lipídica, faz-se necessário empregar mais estudos toxicológicos para avaliar a viabilidade de seu consumo; se aprovado, é provável que este seja moderado, obedecendo aos padrões propostos pela *American Heart Association* (AHA), cuja dieta a ser sugerida não deverá ultrapassar 7% de gordura saturada e 1% de gordura trans, ofertando de 15 a 30g de gordura monoinsaturada (AHA, 2006). Ademais, a aplicabilidade desses ácidos graxos pode exceder a indústria alimentícia, em face de seu potencial para aproveitamento na indústria cosmética, por exemplo.

4.4 Caracterização antinutricional dos extratos, do homogeneizado da farinha fina e demais frações proteicas obtidas da farinha de sementes de *Sesbania virgata*

4.4.1 Fatores antinutricionais de origem protéica

4.4.1.1 Atividade lectínica

Quando postos a ensaios de hemaglutinação contra hemácias de coelho a 3% e nativas, percebeu-se que todos os EB apresentaram elevados títulos de hemaglutinação, o que compreendeu atividade específica de 32 UH.100 μ L⁻¹, com 480 UH/gFa, seguidos de elevados e específicos valores de UH/mgP. Segundo Castanheira (2011), este ensaio é o que melhor descreve a detecção da atividade lectínica, fundamentado na hipótese de que a membrana

eritrócita contempla vários sítios ligantes para lectinas, hábeis em reconhecer e precipitar carboidratos e glicoproteínas.

Para todos os tempos de agitação magnética investigados, não foi possível detectar atividade lectínica nas duas primeiras horas do teste. Dentre todos os EB homogeneizados em NaCl 0,15 mol.L⁻¹ que apresentaram atividade lectínica visível, o obtido com tampão Glicina-HCl 0,1 mol.L⁻¹, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹, pH 2,6, foi o que deteve o maior índice de UH/mgP (46,2163) quando permanecera sob quatro horas de agitação magnética constante, seguido do EB obtido de NaCl 0,15 mol.L⁻¹ com 19 horas de agitação magnética (14,2967 UH/mgP). Contudo, a estabilidade dessas hemaglutinações é perdida rapidamente, não sendo mais percebidas após 18 horas; o que não acontece com os EB obtidos do tampão Glicina-NaOH 0,1 mol.L⁻¹, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹, pH 9,0, e do tampão NaCl 0,15 mol.L⁻¹, agitados magneticamente por 22 horas constantes, cujos índices de UH/mgP são, respectivamente, 4,4878 e 8,1568 e a atividade lectínica é percebida com até 24 horas após o início do ensaio (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Determinação da atividade lectínica dos extratos obtidos da farinha de sementes de *Sesbania virgata* em função do tempo de agitação magnética e solução de homogeneização (NaCl 0,15 mol.L⁻¹)

TA	EB	18 horas			24 horas		
		UH/mL	UH/gFa	UH/mgP	UH/mL	UH/gFa	UH/mgP
1 H	A	16	240	1,4879	-	-	-
4 H	B	32	480	46,2163	-	-	-
	C	-	-	-	32	480	3,3343
19 H	D	32	480	6,6344	-	-	-
	E	32	480	14,2967	-	-	-
	F	16	240	4,0359	-	-	-
22 H	C	32	480	4,4878	32	480	4,4878
	D	32	480	8,1568	32	480	8,1568
24 H	C	-	-	-	32	480	6,5008
	F	32	480	7,9395	8	120	1,9849

- (não detectada atividade lectínica), H (hora), TA (Tempo de Agitação Mecânica), UH/mL (unidades hemaglutinante por mililitro de solução), UH/gFa (unidades hemaglutinante por grama de farinha), UH/mgP (unidades hemaglutinante por miligrama de proteína), EB (Extrato Bruto): A (Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ NaCl 0,15 mol.L⁻¹ pH 7,4), B (Glicina-HCl 0,1 mol.L⁻¹ NaCl 0,15 mol.L⁻¹ pH 2,6), C (Glicina-NaOH 0,1 mol.L⁻¹ NaCl - (0,15 mol.L⁻¹ pH 9,0), D (NaCl 0,15 mol.L⁻¹), E (Água Destilada) e F (Tris-HCl 0,01 mol.L⁻¹ NaCl 0,15 mol.L⁻¹ pH 7,2).

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

Quando homogeneizados em suas soluções extratoras, todos os extratos gerados com 19 horas de agitação magnética não renderam atividade lectínica. Semelhantemente, os extratos B, C, D, E e F não apresentaram hemaglutinações mesmo quando permaneceram em agitação magnética por uma e quatro horas. Em contrapartida, quando presente, a atividade lectínica já é percebida com 60 minutos após o início do ensaio. Dentre todos os EB que obtiveram atividade lectínica visível, aquele obtido a partir da solução tampão Glicina-NaOH 0,1 mol.L⁻¹, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹, pH 9,0, foi o que deteve o maior índice de UH/mgP (4,4878) quando permanecera sob 22 horas de agitação magnética constante, seguido do extrato obtido a partir de solução tampão Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹, pH 7,4 (4,4843 UH/mgP), sob as mesmas condições. Mesmo apresentando índices tão próximos, o primeiro EB se destacou por apresentar atividade lectínica com 60 minutos de iniciado o teste e mantê-la com até 24 horas após; diferentemente do segundo EB, cuja atividade só foi percebida com exatas 18 horas do início do teste, perdendo-a logo em seguida (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Determinação da atividade lectínica dos extratos obtidos da farinha de sementes de *Sesbania virgata* em função do tempo de agitação magnética e solução de homogeneização (solução de extração)

TA	EB	60 min			2 horas			18 horas			24 horas		
		UH/ mL	UH/ gFa	UH/ mgP	UH/ mL	UH/ gFa	UH/ mgP	UH/ mL	UH/ gFa	UH/ mgP	UH/ mL	UH/ gFa	UH/ mgP
1 H	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	240	1,4879
4 H	A	-	-	-	-	-	-	32	480	3,7948	-	-	-
22 H	A	-	-	-	-	-	-	32	480	4,4843	-	-	-
	C	32	480	4,4878	32	480	4,4878	32	480	4,4878	32	480	4,4878
	F	-	-	-	-	-	-	32	480	4,7715	32	480	4,7715
24 H	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	240	3,2504
	F	-	-	-	-	-	-	8	120	1,9849	-	-	-

- (não detectada atividade lectínica), H (hora), TA (Tempo de Agitação Mecânica), UH/mL (unidades hemaglutinante por mililitro de solução), UH/gFa (unidades hemaglutinante por grama de farinha), UH/mgP (unidades hemaglutinante por miligrama de proteína), EB (Extrato Bruto): A (Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ NaCl 0,15 mol.L⁻¹ pH 7,4), B (Glicina-HCl 0,1 mol.L⁻¹ NaCl 0,15 mol.L⁻¹ pH 2,6), C (Glicina-NaOH 0,1 mol.L⁻¹ NaCl - (0,15 mol.L⁻¹ pH 9,0), D (NaCl 0,15 mol.L⁻¹), E (Água Destilada) e F (Tris-HCl 0,01 mol.L⁻¹ NaCl 0,15 mol.L⁻¹ pH 7,2).

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

Quando confrontadas com a atividade lectínica das lectinas presentes em sementes de outras leguminosas, observou-se que a manutenção das condições ótimas de cada lectina são dadas em função do pH em que seus extratos são obtidos: i) pH entre 2,0-5,0: lectinas obtidas de *Ficus cunia* (RAY et al., 1992), de *Ricinus communis* (RCA I) (NICOLSON, BLAUSTEIN e ETZLER, 1974) e de *Araucaria brasiliensis* (lectina I) (DATTA, FIGUEROA e LAJOLO 1991); ii) pH em torno de 7,0: lectinas de *A. brasiliensis* (lectina II) (DATTA, FIGUEROA e LAJOLO 1991), de *Pisum sativum* (ALMEIDA et al., 2000), de *Abelmoschus esculentus* (SOARES et al., 2012) e de *S. laevicarpa* (FERNANDES et al., 2012); iii) pH em torno de 9,0: lectina de *R. communis* (RCA II) (NICOLSON, BLAUSTEIN e ETZLER, 1974).

Por mais elevados que tenham sido os valores de UH/mgP (46,2163) do extrato obtido de solução tampão Glicina-HCl 0,1 mol.L⁻¹, conendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹, pH 2,6, e da contradição com estudos prévios de isolamento de lectinas de sementes (HOSSAIN e BECKER, 2001), raízes (BISWAS, SAROHA e DAS, 2009) e folhas (BISWAS et al., 2009) de outras espécies de *Sesbania*, que apresentaram atividade lectínica ótima quando a solução de extração encontrava-se com faixas de pH em torno de 7,0; o extrato obtido com 22 horas de agitação magnética em solução tampão Glicina-NaOH 0,1 mol.L⁻¹, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹, pH 9,0, com 32 UH.100μL⁻¹, 480 UH/gFa e 8,6677 UH/mgP, homogeneizados na mesma solução de extração, foi o escolhido para pesquisar proteínas com atividade lectínica. Optou-se em incluir NaCl 0,15 mol.L⁻¹ nas soluções de extração (exceto água destilada), pois, em estudo prévio idealizado por Fernandes et al. (2011), viu-se que os extratos com visível atividade lectínica comumente são ativos nos ensaios de hemaglutinação quando obtidos de solução salina.

HFF, EBT (liofilizado e não-liofilizado) e as frações proteicas tiveram sua atividade lectínica avaliada e seus resultados, expressos na **Tabela 6**. Dentre todas as frações protéicas obtidas pelo método de Osborne, apenas a fração glutelina básica, mesmo que fracamente, apresentou atividade lectínica. Bioquimicamente, as frações obtidas pelo método de Osborne são organizadas de acordo com sua solubilidade, onde a fração albumina é solubilizada em água e soluções salinas diluídas; a fração globulina é solubilizada em soluções salinas e, fracamente, em água; a fração prolamina é solubilizada em etanol 70-80%, mas não tem afinidade por etanol puro ou água; já as frações glutelinas têm afinidade por soluções ácidas ou alcalinas diluídas (ROMANO, 1983). Mediante as características apresentadas, confirmou-se (**Tabela 6**) que a atividade lectínica em *S. virgata* só foi visível, mesmo que fracamente, quando os extratos foram preparados em condições alcalinas.

Tabela 6 – Determinação da atividade lectínica manifestada em homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total (liofilizado e não-liofilizado) e frações proteicas obtidos pelo método de Osborne e por precipitação em sulfato de amônio

Material biológico	UH/mL	UH/gFa	UH/mgP
Homogeneizado da farinha fina (1:15, g/mL)	NH	NH	NH
Extrato bruto total não-liofilizado	32 UH.100 μ L ⁻¹	480	8,6677
Extrato bruto total liofilizado (1:1, mg/mL)	32 UH.100 μ L ⁻¹	480	273,6134
Frações albumínicas	NH	NH	NH
Frações globulínicas	NH	NH	NH
Frações prolamínicas	NH	NH	NH
Frações glutelínicas ácidas	NH	NH	NH
Frações glutelínicas básicas	HF	HF	HF
Fração 0-20% (p/v)	2 UH.100 μ L ⁻¹	30	17,9033
Fração 20-40% (p/v)	8 UH.100 μ L ⁻¹	120	15,0014
Fração 40-60% (p/v)	32 UH.100 μ L ⁻¹	480	18,8618
Fração 60-80% (p/v)	8 UH.100 μ L ⁻¹	120	5,1906
Fração 80-100% (p/v)	NH	NH	NH

UH/mL (unidades hemaglutinante por mililitro de solução), UH/gFa (unidades hemaglutinante por grama de farinha), UH/mgP (unidades hemaglutinante por miligrama de proteína), NH (não hemaglutinou) e HF (hemaglutinou fracamente).

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

Dentre as frações proteicas submetidas à precipitação em sulfato de amônio, apenas a fração 80-100% (p/v) não apresentou atividade lectínica visível (**Tabela 6**). Muito embora as demais frações detivessem atividade lectínica visível, o método de precipitação protéica induzida pela adição de sais (*salting-out*) promoveu a concentração das proteínas com atividade lectínica presentes no intervalo de saturação salina 40-60% (p/v), rendendo-lhe 32 UH.100 μ L⁻¹, 480 UH/gFa e 18,8618 UH/mgP. Isto ocorre porque as moléculas de água presentes nesse intervalo, ocupadas em sua interação com os íons do sal adicionado, "abandonam" a estrutura protéica do extrato, permitindo a ocorrência de uma maior interação proteína-proteína, com diminuição da solubilidade em meio aquoso e, decorrente, precipitação da proteína com atividade lectínica.

A atividade lectínica do EBT não-liofilizado e do liofilizado foi avaliada e observou-se que a maior atividade específica (273,6134 UH/mgP) foi típica ao EBT liofilizado, devido a concentração de todas as proteínas presentes no EBT pelo processo de liofilização. Já HFF (1:15, g/mL) não apresentou atividade lectínica devido a ausência de agitação magnética e o emprego da água como agente solubilizante não serem suficientes para precipitar as proteínas com atividade lectínica. Assim sendo, passou-se a utilizar o EBT liofilizado e o intervalo de

saturação salina 40-60% (p/v) como sendo o capaz de render a fração proteica com atividade lectínica (FPAL) para a condução das atividades biológicas e demais testes dessa pesquisa.

4.4.1.2 Atividade antitriptica

Os efeitos da agitação magnética sob os diferentes tipos de EB obtidos de sementes de *S. virgata* na determinação da atividade residual/antitriptica e da U.I.T. estão descritos na **Tabela 7**. Os extratos obtidos a partir de solução tampão Glicina-HCl 0,1 mol.L⁻¹, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹, pH 2,6, foram os que detiveram os maiores índices de atividade antitriptica e de U.I.T. em todos os tempos de agitação magnética empregados, cujos valores oscilaram entre 62,99% e 74,16% de inibição, e 0,71 mg de tripsina inibida/g de amostra e 6,96 mg de tripsina inibida/g de amostra. Dentre todos os tempos de agitação magnética empregados à esta solução extratora, foi o tempo cinco (24 horas) que rendeu os maiores índices de atividade residual (com cerca de 75% de inibição) e de U.I.T. (com cerca de 7,0 mg de tripsina inibida/g de amostra).

Até o tempo três, os extratos obtidos com a solução extratora de NaCl 0,15 mol.L⁻¹ apresentaram atividade residual em torno de 15% de inibição. Contudo, quando permaneceram em agitação magnética, em tempos superiores a quatro horas, a atividade antitriptica para estes foi nula. O mesmo aconteceu com o EB obtido de água destilada, cuja atividade residual (2,46%) foi evidente somente empregando-se uma hora de agitação magnética constante. Os EB obtidos a partir de solução tampão Glicina-NaOH 0,1 mol.L⁻¹, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹, pH 9,0, não apresentaram atividade antitriptica em nenhum dos tempos de agitação magnética empregados (**Tabela 7**).

A análise dos resultados sugeriram que a atividade antitriptica dos extratos de *S. virgata* variou de acordo com a solução de extração utilizada e o tempo de agitação empregado; sendo máxima quando testada contra soluções com pH ácido e mínimas ou nula, contra básico, soluções salinas ou água. Tal ação pode estar relacionada à especificidade dos sítios de ligação dos inibidores presentes nos extratos, que, conforme Bariani et al. (2012), atuam em função da composição e conformação do sítio catalítico, além da estrutura global da molécula deste inibidor.

Sabe-se que o contato entre os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima e do inibidor ocorre através de interações químicas, propiciando uma relação específica e reversível, além da formação de um complexo estável, cuja atividade varia de acordo com a amostra (MATHESON, VAN HALBEEK e TRAVIS, 1991; BODE e HUBER, 2000).

Tabela 7 – Efeitos da agitação magnética na determinação da atividade residual/antitriptica e o número de unidade inibitória de tripsina nos diferentes extratos brutos, obtidos de farinha de sementes de *Sesbania virgata*

TA	Extrato Bruto	%	U.I.T.
TEMPO 1 (1 hora)	Tris-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,4	14,83 ± 0,013	1,87 ± 0,013
	Glicina-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 2,6	65,01 ± 0,002	0,71 ± 0,002
	Glicina-NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 9,0	0,00 ± 0,002	0,00 ± 0,002
	NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	6,87 ± 0,000	1,97 ± 0,000
	Água Destilada	2,46 ± 0,002	2,32 ± 0,002
	Tris-HCl 0,01 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,2	1,80 ± 0,04	2,07 ± 0,04
TEMPO 2 (4 horas)	Tris-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,4	11,02 ± 0,007	2,49 ± 0,007
	Glicina-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 2,6	70,63 ± 0,000	0,72 ± 0,000
	Glicina-NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 9,0	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001
	NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	10,09 ± 0,008	2,58 ± 0,008
	Água Destilada	0,00 ± 0,02	0,00 ± 0,002
	Tris-HCl 0,01 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,2	15,94 ± 0,016	2,53 ± 0,016
TEMPO 3 (19 horas)	Tris-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,4	37,99 ± 0,01	2,04 ± 0,02
	Glicina-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 2,6	63,32 ± 0,008	1,38 ± 0,008
	Glicina-NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 9,0	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001
	NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	15,00 ± 0,011	3,17 ± 0,011
	Água Destilada	0,00 ± 0,003	0,00 ± 0,003
	Tris-HCl 0,01 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,2	11,52 ± 0,003	4,84 ± 0,003
TEMPO 4 (22 horas)	Tris-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,4	46,19 ± 0,002	1,78 ± 0,002
	Glicina-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 2,6	62,99 ± 0,001	6,79 ± 0,001
	Glicina-NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 9,0	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01
	NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	0,00 ± 0,02	0,00 ± 0,02
	Água Destilada	0,00 ± 0,012	0,00 ± 0,012
	Tris-HCl 0,01 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,2	33,78 ± 0,008	2,18 ± 0,008
TEMPO 5 (24 horas)	Tris-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,4	24,58 ± 0,047	2,44 ± 0,001
	Glicina-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 2,6	74,16 ± 0,002	6,96 ± 0,002
	Glicina-NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 9,0	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001
	NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001
	Água Destilada	0,00 ± 0,006	0,00 ± 0,006
	Tris-HCl 0,01 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,2	30,17 ± 0,006	3,46 ± 0,006

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, com n=3. TA (tempo de agitação magnética), % (atividade residual/anti-triptica) e U.I.T. (unidade inibitória de tripsina por grama de amostra).

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

Em estudos realizados com outras espécies de leguminosas, Calderon et al. (2001) demonstraram que extratos de *Cassia brasselari*, *C. occidentalis*, *Dialium guianense*, *Inga rubiginosa*, *I. umbratica*, *I. velutina* e *Mimosa guilandinae* também apresentam inibidores de tripsina em sua composição. Quando detectados em genótipos e cultivares de *Sesamum indicum*, a atividade antitriptica desses inibidores variaram entre 51,85% e 90,76% e os valores de U.I.T. oscilaram entre 0,61 e 5,18 mg de tripsina inibida/g de amostra, sendo máximos para o cultivar CNPA G4 (GOMES, 2014). Em sementes de *Ricinus communis*, a atividade antitriptica foi de 40,44% e a U.I.T. compreendeu 21,23 mg de tripsina inibida/g de amostra (RAMOS, 2012).

Na perspectiva de avaliar se outros métodos de extração ou formas de purificação auxiliariam na bioprospecção desses inibidores em *S. virgata*, o HFF (1:15, g/mL), EBT e as frações obtidas pelo método de Osborne e advindas da precipitação em sulfato de amônio foram analisadas (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Determinação da atividade residual/antitriptica e o número de unidade inibitória de tripsina por grama de amostra no homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e frações obtidos pelo método de Osborne e por precipitação em sulfato de amônio

Material biológico	%	U.I.T.
Homogeneizado da farinha fina (1:15, g/mL)	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01
Extrato bruto total (1:1, mg/mL)	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01
Frações albumínicas	56,59 ± 0,002	68,34 ± 0,002
Frações globulínicas	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
Frações prolamínicas	0,00 ± 0,002	0,00 ± 0,002
Frações glutelínicas ácidas	90,85 ± 0,000	10,06 ± 0,000
Frações glutelínicas básicas	13,95 ± 0,002	0,32 ± 0,002
Fração 0-20% (p/v)	0,50 ± 0,002	107,87 ± 0,002
Fração 20-40% (p/v)	0,00 ± 0,002	0,00 ± 0,002
Fração 40-60% (p/v)	0,00 ± 0,009	0,00 ± 0,009
Fração 60-80% (p/v)	0,15 ± 0,004	10,41 ± 0,004
Fração 80-100% (p/v)	0,00 ± 0,031	0,00 ± 0,031

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, com n=3. TA (tempo de agitação magnética), % (atividade residual/anti-triptica) e U.I.T. (unidade inibitória de tripsina por grama de amostra).

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

Observou-se que tanto HFF quanto EBT não detêm atividade residual aparente (**Tabela 8**), comprovando que, para sementes de *S. virgata*, é necessário que estes inibidores sejam extraídos em solução tamponada em pH alcalino, no caso de EBT. Muito embora a

estrutura da fração albumínica seja mais complexa (DUARTE et al., 2010) e a atividade dos inibidores de tripsina seja mais evidente (MARQUEZ e LAJOLO, 1981), foi a fração das glutelinas ácidas que deteve o maior índice de atividade antitriptica (90,85%), seguida pela fração albumina (56,59%), contradizendo Duarte et al. (2010), que encontrou em *P. vulgaris* 99,81% de atividade antitriptica na fração albumina e 31,98% na fração globulina.

A bioprospecção desses inibidores nas frações proteicas advindas da precipitação em sulfato de amônio mostrou que nenhum grau de saturação salina empregado foi capaz de precipitar inibidores de tripsina (**Tabela 8**), evidenciando que esse processo foi suficientemente capaz de remover os inibidores de tripsina do EBT de *S. virgata*, diferentemente das frações proteicas de *Trigonella foenum-graecum*, que apresentaram 75% de atividade residual (ODDEPALLY, SRIRAM e GURUPRASAD, 2013). Por mais que pequenos precipitados pudessem ser vistos nas frações 0-20% (m/v) e 60-80% (m/v) de *S. virgata*, de acordo com Wati et al. (2009), isso é comum ocorrer, pois essas concentrações salinas possibilitam a ligeira exibição do sítio hidrofílico do inibidor, com aumento de sua flexibilidade.

4.4.2 Fatores antinutricionais de origem não-protéica e amido

Os resultados de avaliação da presença dos fatores antinutricionais e amido bioprospectados em HFF (50 mg de FF :1,0 mL de água destilada), EBT e FPAL (50 mg de ambos :1,0 mL de Glicina-NaOH 0,1 mol.L⁻¹, contendo NaCl 0,1 mol.L⁻¹, pH 9,0), obtidos de farinha de sementes de *S. virgata* estão descritos na **Tabela 9**.

Das análises fitoquímicas realizadas, percebeu-se que, quando presentes, os componentes antinutricionais de origem não-protéica manifestaram-se com pouca intensidade. Dentre os fatores testados, não foram presenciados taninos pirogálicos ou catéquicos (**Tabela 9**). Esse resultado foi semelhante ao descrito por Huber (2012) para *P. vulgaris*, variação branca, sugerindo que sua não-precipitação foi resultado dos complexos insolúveis que se formaram entre as proteínas ou carboidratos presentes em *S. virgata*, como também pela ação dos solventes e sais empregados nas etapas de extração e purificação. Deste modo, foi possível inferir que as atividades biológicas e bioprospecção de proteínas biologicamente ativas ocorreram sem interferência de taninos, excluindo a possibilidade de resultados falso-positivos, como comumente ocorre nos testes de atividade lectínica.

A ausência de taninos é um fator determinante na qualidade de um grão, haja visto que eles interferem na biodisponibilidade mineralógica, na digestibilidade da faseolina

(ROMANO, 2006) e na qualidade (cor e dureza) do feijão (DE LEÓN, BRESSANI e ELÍAS, 1989). Os taninos também atuam diretamente na CAA, uma vez que quanto maior tal capacidade, maior a tendência de precipitação de taninos (RIOS, ABREU e CORREA, 2003). Em *S. virgata*, essa correlação não foi válida devido ao fato de os taninos não terem conseguido migrar da camada mais externa da semente para o cotilédono, impossibilitando sua precipitação. Contudo, quando presentes, podem ser inibidos sob fervura, reduzindo sua digestibilidade tanto pela ação direta das proteínas, quanto pela inativação de enzimas digestivas (MARQUEZ e LAJOLO, 1981).

Tabela 9 – Determinação qualitativa de componentes fitoquímicos e amido em homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica, obtidos da farinha de sementes de *Sesbania virgata*

Classes de componentes	Reações	Material biológico			
		HFF	EBT	FPAL	
Fitoquímicos					
Taninos pirogálicos e catéquicos	Cloreto Férrico	-	-	-	
Saponinas	Clorofórmio	+	+	+	
Catequinas	Colorimétrica	+	+	-	
Flavonas, flavonóis e xantonas	Colorimétrica	+	+	-	
Antocianinas, Antocianidinas e flavonoides	Colorimétrica	+	+	-	
Leucoantocianidinas	Colorimétrica	-	-	-	
Esteroides	Colorimétrica	-	-	-	
Triterpenos	Colorimétrica	-	-	-	
Outros					
Amido	Iodo	-	-	-	

HFF (homogeneizado da farinha fina), EBT (extrato bruto total), FPAL (fração proteica com atividade lectínica), - (Reação negativa), + (Reação positiva).

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

Assim como em *P. vulgaris* (GUAJARDO-FLORES, SERNA-SALDÍVAR e GUTIÉRREZ-URIBE, 2013) e *P. lunatus* (DORIA et al., 2012), HFF, EBT e FPAL apresentaram saponinas em sua composição (**Tabela 9**). A presença desse fitocomposto justificou a atividade hemolítica encontrada durante os ensaios de atividade lectínica (dados não mostrados) em algumas soluções extratoras.

A capacidade hemolítica das saponinas em vegetais é dada à pequenas modificações na estrutura aglicônica da saponina (SECTAL, SHATKOVSKY e MILO-GOLDZWEIG, 1974). Dos ensaios de atividade lectínica realizados, percebeu-se que quanto menor o tempo

de agitação magnética e maior for a concentração de amostra empregados, maior o índice de hemólises. Esses valores crescem quando a solução extratora tem caráter ácido, a exemplo dos EB obtidos com a solução tampão Glicina-HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, contendo NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 2,6. O mesmo foi percebido com os extratos de *Swartzia* spp. (FERNANDES, 2012), confirmando a presença de saponinas ou de hemolisinas.

As reações colorimétricas indicaram a presença de catequinas, flavonas, flavonóis, xantonas, antocianinas, antocianidinas e flavonoides apenas na HFF e EBT (**Tabela 9**). Sendo as catequinas muito comuns em polpas e sementes de *Persea americana* (TREMOCOLDI, 2015; KOSINSKA et al., 2012; WANG, BOSIC e GU, 2010) e de *Vitis* sp., cujo sabor e adstringência dos vinhos são conseguidos através dessas (MONTEIRO, 2011). Não foram observados leucoantocianidinas, esteroides e triterpenos em nenhuma das amostras avaliadas. Em *Xylosma ciliatifolium* só foi possível detectar leucoantocianidinas e flavonoides quando o extrato foi obtido com acetato de etila; assim como esteroides e triterpenos, quando o extrato foi obtido de hexano e clorofórmio (PHILIPPSEN, 2010), sugerindo que os tratamentos empregados foram suficientes para não precipitar tais fitocompostos.

A reação das amostras com iodo não foi capaz de detectar amido em *S. virgata* (**Tabela 9**), diferentemente de *P. vulgaris* que, além de identificado, apresentou aplicações biotecnológicas na produção de filmes biodegradáveis (KUMAR e PRABHASANKAR, 2015; DU et al., 2014; JAFARI et al., 2016). Assim como nos taninos, o tratamento térmico afeta a digestibilidade, biodisponibilidade e desidratação do amido em vegetais (RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015), porém, como não foram empregados tal tratamento, a ausência do amido é dada em função das características fisiológicas das amostras e das características químicas das soluções extratoras, que não permitiram extrair tal composto das sementes de *S. virgata*.

4.5 Análise protéica e aminoacídica de *Sesbania virgata*

4.5.1 Determinação do teor de proteínas solúveis presentes nos extratos, homogeneizado da farinha fina, fração proteica com atividade lectínica e demais frações proteicas obtidos da farinha de sementes de *Sesbania virgata*

Tabela 10 – Teores de proteína solúveis presentes nos diferentes extratos brutos obtidos da farinha de sementes de *Sesbania virgata*

TA	Extrato bruto	mgP/mL	mgP/gF
TEMPO 1 (1 hora)	Tris-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,4	10,75 ± 0,001	161,30 ± 0,001
	Glicina-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 2,6	9,93 ± 0,001	148,91 ± 0,001
	Glicina-NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 9,0	9,00 ± 0,001	135,04 ± 0,001
	NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	9,65 ± 0,001	144,70 ± 0,001
	Água Destilada	7,98 ± 0,001	119,68 ± 0,001
	Tris-HCl 0,01 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,2	8,77 ± 0,001	131,57 ± 0,001
TEMPO 2 (4 horas)	Tris-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,4	8,43 ± 0,001	126,49 ± 0,001
	Glicina-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 2,6	8,54 ± 0,001	128,10 ± 0,001
	Glicina-NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 9,0	9,60 ± 0,001	143,96 ± 0,001
	NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	7,58 ± 0,001	113,73 ± 0,001
	Água Destilada	7,99 ± 0,001	119,92 ± 0,001
	Tris-HCl 0,01 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,2	8,34 ± 0,001	125,13 ± 0,001
TEMPO 3 (19 horas)	Tris-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,4	7,17 ± 0,001	107,53 ± 0,001
	Glicina-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 2,6	3,90 ± 0,001	58,48 ± 0,001
	Glicina-NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 9,0	6,62 ± 0,001	99,36 ± 0,001
	NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	4,82 ± 0,001	72,35 ± 0,001
	Água Destilada	2,24 ± 0,001	33,57 ± 0,001
	Tris-HCl 0,01 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,2	3,96 ± 0,001	59,47 ± 0,001
TEMPO 4 (22 horas)	Tris-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,4	7,14 ± 0,001	107,04 ± 0,001
	Glicina-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 2,6	0,69 ± 0,000	10,38 ± 0,000
	Glicina-NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 9,0	7,13 ± 0,002	106,96 ± 0,002
	NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	3,92 ± 0,001	58,85 ± 0,001
	Água Destilada	2,16 ± 0,001	32,33 ± 0,001
	Tris-HCl 0,01 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,2	6,71 ± 0,001	100,60 ± 0,001
TEMPO 5 (24 horas)	Tris-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,4	7,28 ± 0,001	109,27 ± 0,001
	Glicina-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 2,6	0,66 ± 0,001	9,91 ± 0,001
	Glicina-NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 9,0	4,92 ± 0,001	73,84 ± 0,001
	NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	2,08 ± 0,001	31,22 ± 0,001
	Água Destilada	2,43 ± 0,001	36,42 ± 0,001
	Tris-HCl 0,01 mol.L ⁻¹ NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ pH 7,2	4,03 ± 0,001	60,46 ± 0,001

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, com n=3. TA (tempo de agitação magnética), mgP/mL (miligrama de proteína por ml de solução) e mgP/gF (miligrama de proteína por grama de farinha).

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

A determinação do teor de proteínas solúveis em cada um dos EB (**Tabela 10**) ocorreu mediante reação colorimétrica com o reagente cromogênico de Bradford, que, ao se ligar aos grupamentos aromáticos das proteínas, tem sua absorvância alterada de 465 nm para 595 nm, causando uma visível mudança de coloração dos tons de castanho para azul, de acordo com a concentração protéica (BRADFORD, 1976).

Os extratos obtidos a partir de solução tampão Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹, pH 7,4, foram os que detiveram os maiores teores de proteína solúveis em todos os tempos de agitação magnética empregados, com valores que oscilam entre 7,14-10,75 mgP/mL e 107,04-161,30 mgP/gF (**Tabela 10**). Ambos foram inferiores ao teor de 177,50 mgP/gF, encontrado por Moreira e Perrone (1997) no extrato aquoso de sementes de *P. vulgaris*. A precipitação de proteínas solúveis foi peculiar à cada solução de extração empregada, bem como o tempo em que o extrato permaneceu em agitação magnética, que foram máximos quando agitados durante uma hora ou mínimos quando a partir de 22 horas, a exemplo dos extratos obtidos com a solução tampão Glicina-HCl 0,1 mol.L⁻¹, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹, pH 2,6.

Barbosa (2013), avaliando a influência da solução extratora na precipitação de proteínas solúveis em extratos aquosos de *Canavalia brasiliensis*, constatou que, quando extraídos em NaCl 0,15 mol.L⁻¹, o teor de proteínas solúveis foi de 107,19 mgP/gF; em Glicina 0,1 mol.L⁻¹, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹, pH 2,6, foi de 36,6 mgP/gF e em Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹, pH 7,4, foi de 12,20 mgP/gF. Isso corrobora com os estudos realizados com a *S. virgata*, confirmando que as condições de extração induziram a melhor precipitação protéica.

O teor de proteínas solúveis (0,16 mgP/mL e 0,16 mgP/mF) observado em HFF (1:15, g/mL) de *S. virgata*, quando comparado com o do EBT não liofilizado (7,13 mgP/mL e 106,96 mgP/mF), refletiu a condição de que apenas solubilizando a FF em água destilada, sem emprego de agitação magnética, a solubilização proteica será mínima. Quando liofilizado, o EBT concentrou o teor de proteínas solúveis presentes neste (0,12 mgP/mL e 1,75 mgP/mF), refletindo uma diminuição no teor de proteínas solúveis com visível dificuldade de solubilização, quando comparado ao não liofilizado (**Tabela 11**).

Isso aconteceu porque o processo de liofilização removeu a umidade do interstício da amostra e, segundo George e Datta (2002) e Ratti (2001), devido à ausência de água líquida nesta e às baixas temperaturas requeridas no processo, os sólidos solúveis que compunham o material biológico tenderam a encolher minimamente. Contudo as propriedades físico-químicas do material foram preservadas e não ocorreu desnaturação protéica (MARQUES,

2008). O que pôde ser comprovado (**Tabela 6**), pela manutenção da atividade lectínica no EBT mesmo quando liofilizado. Mesmo havendo essa notória diminuição no teor de proteínas solúveis, optou-se em manter os testes com o EBT liofilizado.

Quando quantificado o teor de proteínas solúveis das frações proteicas obtidas pelo método de Osborne, viu-se que estes foram máximos para as frações glutelinas básicas (5,72 mgP/gP e 85,85 mgP/gF), superando os teores da HFF (1:15, g/mL) e do EBT. E dentre as cinco frações proteicas submetidas à precipitação em sulfato de amônio, foi a FPAL que rendeu os maiores teores (1,70 mgP/mL e 25,45 mgP/gF) (**Tabela 11**), aproximando-se do encontrado por Moreira e Perrone (1997) para a fração 50-75% (p/v), obtida de sementes de *P. vulgaris* (24,8 mgP/gF).

Tabela 11 – Teores de proteínas solúveis presentes no homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total (liofilizado e não-liofilizado) e frações proteicas obtidos pelo método de Osborne e por precipitação em sulfato de amônio

Material biológico	mgP/mL	mgP/gF
Homogeneizado da farinha fina (1:15, g/mL)	0,16 ± 0,04	0,16 ± 0,04
Extrato bruto total não-liofilizado	7,13 ± 0,002	106,96 ± 0,002
Extrato bruto total liofilizado	0,12 ± 0,009	1,75 ± 0,009
Frações albumínicas	0,12 ± 0,002	1,73 ± 0,002
Frações globulínicas	0,14 ± 0,001	2,04 ± 0,001
Frações prolamínicas	0,11 ± 0,01	1,70 ± 0,01
Frações gluteínicas ácidas	0,21 ± 0,001	3,20 ± 0,001
Frações gluteínicas básicas	5,72 ± 0,001	85,85 ± 0,001
Fração 0-20% (p/v)	0,11 ± 0,005	1,66 ± 0,005
Fração 20-40% (p/v)	0,53 ± 0,004	8,00 ± 0,004
Fração 40-60% (p/v)	1,70 ± 0,005	25,45 ± 0,005
Fração 60-80% (p/v)	1,54 ± 0,002	23,12 ± 0,002
Fração 80-100% (p/v)	0,16 ± 0,008	2,40 ± 0,008

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, com n=3. mgP/mL (miligrama de proteína por mL de solução) e mgP/gF (miligrama de proteína por grama de farinha). =Desvio padrão (n=3).
Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

4.5.2 Teor de proteínas totais presentes na farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica, obtidos de sementes de *Sesbania virgata*

O elevado teor de proteína total, obtido pelo método de micro-Kjedahl, encontrado na FF de *S. virgata* (60,79%) (**Tabela 12**) supera os teores observados por Petchiammal e Hopper (2013) para a FF de sementes de *Macrotyloma uniflorum*, *P. vulgaris*, *L. culianris*, *V.*

unguiculata, *V. mungo* e *Cicer arietinum* (entre 18,74% e 24,94%). Esses mesmos teores, na mucilagem de espécies do gênero *Cassia*, foram expressos entre 10,4% e 31,1% (KAPOOR, FAROOQI e KAPOOR, 1980) e em vagens de *Cassia renigera* foi de 55,55% (SHARMA et al., 2013). Em sementes de leguminosas, como *Glycine max* (L.), foram registrados teores de 39-44% de proteína total (SHARMA et al., 2014). Os elevados teores proteicos de *S. virgata* são referência dentre as leguminosas ou outras partes vegetativas de demais gêneros botânicos, comportando-se como promissora fonte de proteína.

Tabela 12 – Teor de proteína total presente na farinha fina, extrato bruto total e fração protéica com atividade lectínica, obtidos de sementes de *Sesbania virgata*

Tratamento	Proteína (%)*
Farinha fina	60,79 ± 0,18
Extrato bruto total	49,34 ± 0,03
Fração proteica com atividade lectínica	55,84 ± 0,63

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, com n=3. *Utilizou-se do fator de conversão (6,25) padronizado pela ANVISA (2003) para carnes e proteínas de soja e de milho. Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

O declínio de 11,45% do teor de proteína total encontrado entre o EBT (49,34%) e FF pode estar relacionado a capacidade da glicina (empregada na obtenção do EBT) em solubilizar as proteases presentes no extrato, ocorrendo hidrólises e liberação de peptídeos de baixa solubilidade. Já o teor de proteínas totais presente na FPAL (55,84%), quando confrontado com os da FF, apresentou um declínio (4,95%) inferior ao visto pelo EBT e superou todos os teores encontrados para as frações de *P. vulgaris*, que apresentou valores entre 6,2% a 46,2% (MOREIRA e PERRONE, 1977). Neste último caso, o sulfato de amônio, que é um agente caotrópico, causou a precipitação de inúmeras proteínas não precipitadas em EBT, rendendo-lhe a recuperação do teor proteico perdido nas etapas de extração; o que torna FPAL, assim como FF, uma promissora fonte proteica.

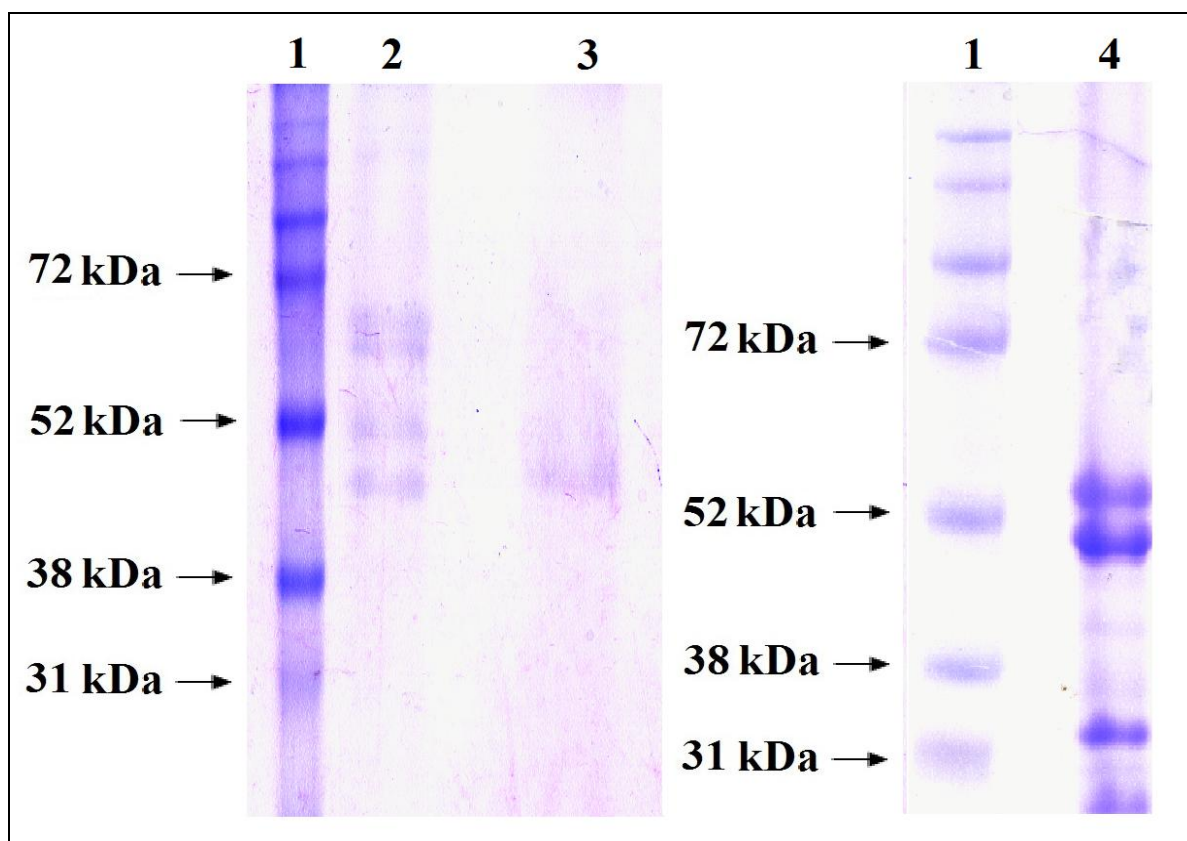
4.5.3 Estimativa da massa molecular aparente por SDS-PAGE das proteínas presentes no homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica, obtidos de sementes de *Sesbania virgata*

Visando acompanhar o perfil protéico ao longo das etapas de extração e purificação, tanto FF quanto EBT e FPAL tiveram as massas moleculares de suas proteínas estimadas por meio de eletroforeses em géis compostos de polímeros reticulados de poliacrilamida em

presença de SDS (SDS-PAGE) (**Figura 7**). Dessa forma, foi constatada a presença de seis bandas proteicas em FF, com massas moleculares entre 49 e 225 kDa. Ao passo que em EBT muitas dessas bandas fixaram-se no gel, formando um aglomerado na faixa de 52-70 kDa.

Em FPAL constatou-se que, semelhantemente ao que foi verificado em FF, ocorreu a presença de seis bandas proteicas, com massas moleculares entre 31 e 54 kDa. Contudo, a forma como essas bandas proteicas se arranjaram no gel de poliacrilamida permitiu a visualização de “pares” de bandas proteicas mais espessas, com massas moleculares próximas a 52 kDa, seguidas de outro par de bandas proteicas, só que menos espessas que as anteriores, cujas massas moleculares oscilaram na faixa de 38 kDa, além de demarcar outras duas bandas proteicas com massas moleculares na faixa de 31 kDa (**Figura 7**).

Figura 7 – Perfil eletroforético das proteínas presentes na farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica, obtidos de sementes de *Sesbania virgata* por meio de SDS-PAGE (12,5%)



1 (marcadores de massa molecular, 12 kDa – 225 kDa); 2 (FF – farinha fina, 30µl); 3 (EBT – extrato bruto total, 30µl); e 4 (FPAL – fração protéica com atividade lectínica, 30µl).

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

O comportamento peculiar visto no perfil eletroforético deve-se ao processo de precipitação proteica em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com intervalo de saturação específico (40-60%, p/v), que

além de concentrar as proteínas presentes no EBT, parece ter permitido que estas proteínas desfizessem sua oligomerização característica, resultando na formação de subunidades proteicas menores. Por outro lado, através desse mesmo processo, verificou-se tanto um decaimento de massa molecular (refletido pelo surgimento de proteínas com massa molecular de 31kDa, não detectadas em EBT) quanto um fracionamento dessas proteínas, excluindo aquelas com massa molecular superior a 60 kDa.

Comumente, as lectinas de leguminosas apresentam um protômero com massa molecular em torno de 30 kDa que pode ser clivado em polipeptídios menores, formando estruturas semelhantes ou não (FERNANDES, 2012), capazes de se arranjar espacialmente na forma de dímeros ou até octâmeros (BARRE et al., 2001). As massas moleculares encontradas em FPAL corroboram com esta visão, assim como com a massa molecular encontrada para a lectina isolada de raízes de *S. aculeata*, que apresentou 39 kDa (BISWAS, SAROHA e DAS, 2009), e se aproxima da massa molecular (26 kDa) da lectina isolada do caule da mesma espécie (BISWAS et al., 2009).

4.5.4 Análise do perfil de aminoácidos totais da farinha fina e fração proteica com atividade lectínica, obtidas de sementes de *Sesbania virgata*

Os principais aminoácidos não-essenciais presentes na FF de sementes de *S. virgata* foram o ácido glutâmico (168,75 mg aminoácido/g proteína⁻¹), a arginina (122,25 mg aminoácido/g proteína⁻¹) e o ácido aspártico (94,62 mg aminoácido/g proteína⁻¹) (**Tabela 13**). Na FF de sementes de *Vicia spp.*, os teores de ácido glutâmico, arginina e ácido aspártico variaram entre 18,6 mg aminoácido/g proteína⁻¹ e 143,2 mg aminoácido/g proteína⁻¹ (MEGÍAS et al., 2016).

Por assim serem classificados, os aminoácidos não essenciais amparam o fornecimento de nitrogênio ao organismo, podendo ser convertidos em outros aminoácidos (não essenciais) e/ou subsidiar a demanda de energia requerida aos eventos celulares. A digestibilidade proteica e o elevado valor biológico de uma proteína relaciona-se aos teores de aminoácidos essenciais presentes nessas, sendo esses mais desejadas do ponto de vista nutricional pelo fato do organismo humano não conseguir sintetizá-los, devendo, pois, ser adquiridos mediante dieta.

Mesmo dispondo de elevados teores proteicos, lipídicos, glicídicos, mineralógicos e vitamínicos, as sementes de leguminosas, são deficitárias à alimentação por apresentarem baixos teores de aminoácidos sulfurados (MUBARAK, 2005), especificamente cisteína,

metionina e triptofano, que são os aminoácidos estruturantes da faseolina, a principal proteína do feijão (CHANG e SATTERLEE, 1981).

O perfil de aminoácidos essenciais da FF de sementes de *S. virgata* (**Tabela 13**) revelou elevada quantidade de histidina (152,72 mg aminoácido/g proteína⁻¹), leucina (63,10 mg aminoácido/g proteína⁻¹) e lisina (54,08 mg aminoácido/g proteína⁻¹), e deficiência nos teores de metionina (7,85 mg aminoácido/g proteína⁻¹) e cisteína (2,27 mg aminoácido/g proteína⁻¹), corroborando com Chang e Satterlee (1981).

É sabido que a metionina e a cisteína são aminoácidos sulfurados, sendo o primeiro categorizado como alifático apolar e o segundo, polar não-carregado. Na FF de *S. virgata*, perfazem, juntos, 10,12 mg aminoácido/g proteína⁻¹, um teor que, quando comparado com o padrão de referência da WHO/FAO/UNU (FAO, 2007) apresenta menos da metade do valor recomendado.

Tal deficiência pode ser correlacionada às condições do ambiente de cultivo e pode variar de acordo com a cultivar empregada (ANTUNES et al., 1995; MARQUES e BORA, 2000; GUZMÁN-MALDONADO et al., 2000; RIBEIRO et al., 2007), cuja importância biológica é comprovada por sua capacidade de formação de quelatos solúveis com o ferro, permitindo que a absorção desse mineral pelo intestino seja viável, ao tempo em que regula a absorção e acúmulo de gordura no/pelo fígado (FRANCO, 2005). Por outro lado, os elevados teores de lisina presentes nas sementes de *S. virgata* permitem um balanço energético e nutritivo à dieta se seu consumo (caso permitido) for associado a cereais, como arroz e milho, que contemplam os aminoácidos sulfurados limitantes desse feijão.

A análise dos resultados do perfil de aminoácidos totais (**Tabela 13**) permitiu evidenciar variações nos aminoácidos essenciais abundantes em FPAL que, diferente da FF, foram leucina, lisina e valina com 90,78, 66,64 e 58,32 mg aminoácido/g proteína⁻¹, respectivamente. Esses aminoácidos ou têm grupos R carregados positivamente (lisina) ou são alifáticos e apolares (isoleucina e valina).

Quando comparados com os teores de aminoácidos encontrados na FF, percebeu-se que todos encontram-se em teores superiores, mostrando que o processo de fracionamento empregado na obtenção de FPAL tanto foi capaz de concentrar esses aminoácidos no escopo das proteínas, quanto confirmou que o tegumento da semente de *S. virgata* poderia estar impermeabilizado pela ação de componentes secundários, que impossibilitavam a migração destes aminoácidos para o cotilédone. Em contrapartida, o teor de histidina presente em FPAL (29,56 mg aminoácido/g proteína⁻¹) reduziu expressivamente, quando comparada com os da FF.

Tabela 13 – Composição de aminoácidos totais (mg aminoácido/g proteína⁻¹) presentes na farinha fina e na fração proteica com atividade lectínica de *Sesbania virgata*

Aminoácidos	FF	PA*	EAE**	FPAL	PA*	EAE**	Soja ³	PA*	EAE**
<i>Aminoácidos essenciais</i>									
Histidina	152,72 ± 0,00	15	10,18	29,56 ± 0,00	15	1,97	23,60 ± 0,13	15	1,57
Treonina	30,35 ± 0,00	23	1,31	50,19 ± 0,00	23	2,18	36,20 ± 0,2	23	1,57
Tirosina	30,94 ± 0,00	-	-	44,02 ± 0,00	-	-	28,50 ± 0,11	-	-
Valina	38,47 ± 0,01	39	0,97	58,32 ± 0,02	39	1,50	47,00 ± 0,23	39	1,2
Metionina	7,85 ± 0,00	-	-	15,41 ± 0,00	-	-	55,40 ± 0,1	-	-
Cisteína	2,27 ± 0,00	-	-	2,55 ± 0,00	-	-	24,00 ± 0,03	-	-
Isoleucina	34,89 ± 0,01	30	1,26	49,82 ± 0,01	30	1,66	42,40 ± 0,17	30	1,41
Leucina	63,10 ± 0,01	59	1,07	90,78 ± 0,02	59	1,54	69,40 ± 0,25	59	1,18
Fenilalanina	42,00 ± 0,00	-	-	53,34 ± 0,00	-	-	44,60 ± 0,19	-	-
Lisina	54,08 ± 0,00	45	1,20	66,64 ± 0,00	45	1,48	57,90 ± 0,3	45	1,27
Metionina + Cisteína ¹	10,12	22	0,46	17,96	22	0,82	79,40	22	3,61
Fenilalanina + Tirosina ²	72,94	38	1,92	97,36	38	2,56	73,10	38	1,87
<i>Aminoácidos não-essenciais</i>									
Ácido Aspártico	94,62 ± 0,02	-	-	105,69 ± 0,00	-	-	102,90 ± 0,4	-	-
Ácido Glutâmico	168,75 ± 0,00	-	-	143,27 ± 0,00	-	-	156,10 ± 0,6	-	-
Serina	49,26 ± 0,01	-	-	56,60 ± 0,01	-	-	43,30 ± 0,17	-	-
Glicina	40,53 ± 0,01	-	-	57,18 ± 0,01	-	-	43,30 ± 0,17	-	-
Arginina	122,25 ± 0,02	-	-	81,43 ± 0,01	-	-	77,40 ± 0,33	-	-
Alanina	31,45 ± 0,01	-	-	51,03 ± 0,01	-	-	39,90 ± 0,2	-	-
Prolina	36,38 ± 0,01	-	-	44,10 ± 0,01	-	-	46,00 ± 0,41	-	-

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, com n=3. FF (farinha fina de sementes de *Sesbania virgata*), FPAL (fração proteica com atividade lectínica), ¹ (aminoácidos sulfurados); ² (aminoácidos aromáticos, exceto triptofano), ³ (farinha de sementes de soja, utilizada como referência, disponível em Amarakoon, 2012), * (Padrão FAO/WHO/UNU, 2007, com valores de aminoácidos essenciais indispensáveis à dieta humana, para indivíduos com idade >18 anos), ** (Escore de Aminoácidos Essenciais), - (não aplicado), Triptofano não determinado.

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

Semelhante ao encontrado em FF, ácido glutâmico, ácido aspártico e arginina foram os aminoácidos não-essenciais mais abundantes em FPAL, com teores de 105,69, 143,27 e 81,43 mg aminoácido/g proteína⁻¹, respectivamente (**Tabela 13**).

Dos teores de aminoácidos essenciais apresentados pela FF de sementes de *S. virgata*, apenas os de histidina e tirosina foram inferiores aos apresentados pela FF de soja. Já em FPAL, metionina e cisteína são os que detiveram os menores índices, quando comparados com os teores da soja. O escore de aminoácidos essenciais revelou que a valina e os aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína) são limitantes em FF. Já em FPAL, apenas os aminoácidos sulfurados são limitantes (**Tabela 13**).

4.6 Atividades biológicas

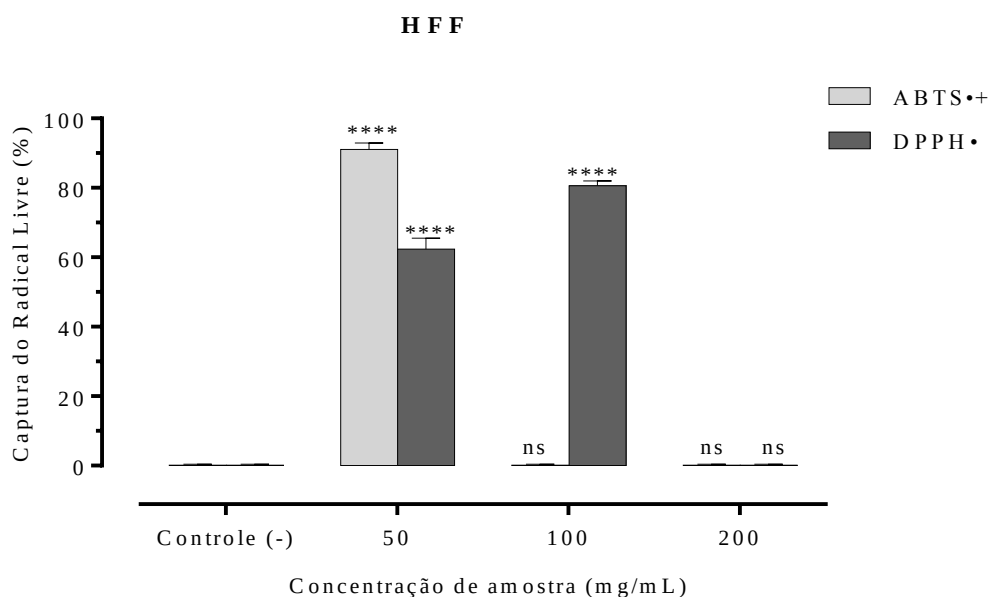
4.6.1 Atividade sequestrante de radicais livres

Conhecendo-se a importância da determinação, *in vitro*, da atividade antioxidante expressa por compostos biologicamente ativos, bem como a dificuldade encontrada em representar de forma segura e precisa qual dos diferentes métodos de quantificação se aplica a cada um desses compostos, avaliou-se a atividade antioxidante, pelo método de captura dos radicais orgânicos ABTS^{•+} e DPPH[•], de HFF (1:15, g/mL), EBT e FPAL, obtidos de farinha de sementes de *S. virgata*.

A concentração de 50 mg/mL foi capaz de proporcionar atividade antioxidante pelo método de captura do radical ABTS^{•+}, com 91,10% de inibição, em HFF (**Gráfico 1**). Para as concentrações de 100 e 200 mg/mL, já não mais foi possível detectar a mesma atividade. Em contrapartida, registrou-se que o consumo de DPPH[•], até a concentração de 100 mg/mL foi diretamente proporcional à concentração de HFF, ou seja, quão maior o teor de proteínas ou metabólitos secundários (haja visto que estão presentes nessa amostra) utilizados, maior o rendimento da atividade antioxidante, o que comprova os 62,34% e 80,64% de inibição para as concentrações de 50 e 100 mg/mL, respectivamente.

Porém, assim como no método de captura do radical ABTS^{•+}, a concentração de 200 mg/mL de HFF não permitiu o consumo de DPPH[•], não apresentando portanto, atividade antioxidante nessa concentração. Dessa forma, constatou-se que o método de captura do radical ABTS^{•+} foi o melhor indicado para a determinação da sensibilidade de HFF nas condições de perda de absorbância a baixas concentrações, o que pode ser comprovado pelo percentual de inibição encontrado (91,10%).

Gráfico 1 – Atividade antioxidante do homogeneizado da farinha fina de sementes de *Sesbania virgata*, determinada pelos métodos de captura dos radicais livres ABTS^{•+} e DPPH[•]



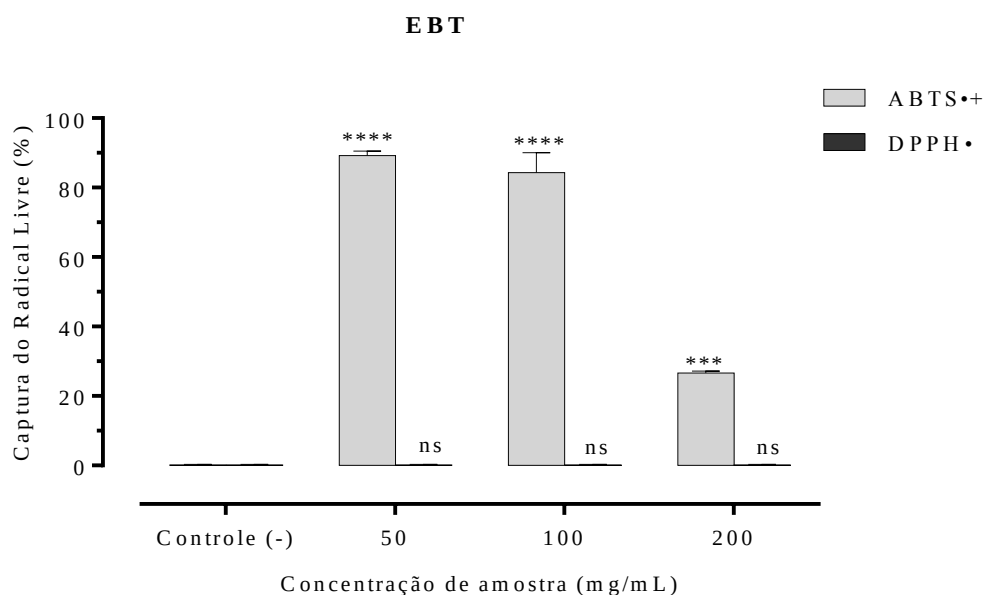
Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, com $n=3$. HFF (homogeneizado da farinha fina), Controle – (0% de inibição, em água ultra pura), ns: não significativo ($p < 0,05$) e ****: $p < 0,0001$

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

O **Gráfico 2** elucida que, diferentemente do encontrado para HFF, a captura do radical ABTS^{•+} pelo EBT até a concentração de 200 mg/mL foi inversamente proporcional à concentração da amostra, presenciando a formação de uma curva de decaimento, ou seja, quanto maior o teor de proteínas empregado, menor o rendimento da atividade antioxidante, cujos valores para as concentrações de 50, 100 e 200 mg/mL de EBT foram de 89,25%, 84,34% e 26,59%, respectivamente. Contraditoriamente, não foi verificado sequestro do radical DPPH[•] pelo EBT em nenhuma das concentrações investigadas. Todas as concentrações de EBT empregadas, quando comparadas ao controle negativo, apresentaram diferenças ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$) apenas para método de captura do radical ABTS^{•+}.

Enquanto FPAL, apresentou atividade antioxidante com visível estabilidade para o método de captura do radical ABTS^{•+} com quase 100% de inibição em todas as concentrações testadas (91,17%, 91,31% e 83,92%, respectivamente). Na captura do radical DPPH[•], percebeu-se um crescimento linear da atividade antioxidante em função da concentração de amostra empregada, sendo vistos 22,71%, 32,84% e 55,31% de captura para as concentrações de 50, 100 e 200 mg/mL de FPAL, respectivamente; reforçando a ideia de que o aumento da atividade antioxidante é proporcional a concentração de amostra. Foram encontradas significâncias estatísticas ($p < 0,0001$) em todas as concentrações testadas (**Gráfico 3**).

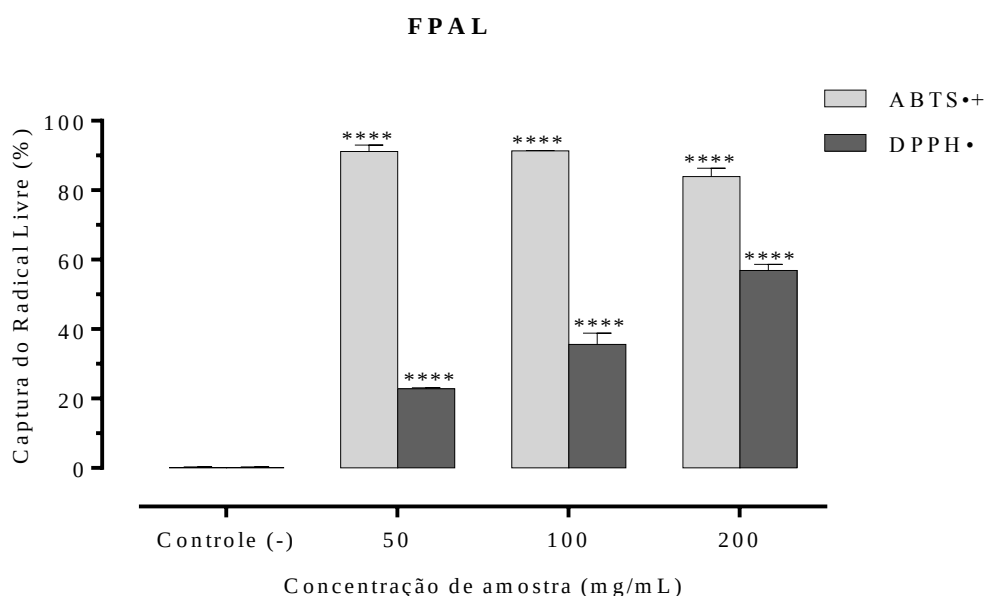
Gráfico 2 – Atividade antioxidante do extrato bruto total de sementes de *Sesbania virgata*, determinada pelos métodos de captura dos radicais livres ABTS^{•+} e DPPH[•]



Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, com $n=3$. EBT (extrato bruto total), Controle – (0% de inibição, em água ultra pura), ns: não significativo ($p<0,05$), ***: $p<0,0001$ e ****: $p<0,0001$

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

Gráfico 3 – Atividade antioxidante da fração proteica com atividade lectínica de sementes de *Sesbania virgata* determinada pelos métodos de captura dos radicais livres ABTS^{•+} e DPPH[•]



Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, com $n=3$. FPAL (fração proteica com atividade lectínica), Controle – (0% de inibição, em água ultra pura), ns: não significativo ($p<0,05$) e ****: $p<0,0001$

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

Diferentemente de HFF e EBT, os dois métodos de captura de radicais pela FPAL foram eficazes, pois, enquanto o método de consumo de ABTS^{•+} ilustra a estabilidade da reação frente a transição dos elétrons, o método de captura do radical DPPH[•] apresenta a atividade de remoção de radicais como reflexo dose-dependente, haja visto que o aumento na concentração de amostra induz ao aumento da atividade (**Gráfico 3**).

Além de fatores antinutricionais de origem proteica, HFF e EBT apresentam componentes fitoquímicos que podem corroborar com a atividade antioxidante verificada. Os melhores resultados vistos em HFF e EBT para a captura do radical ABTS^{•+} foram reflexo das reações estereoquímicas comumente ocorridas neste método, onde a permuta de dois elétrons livres da hidroxila do componente fitoquímico para o sítio ativo da reação induz uma previsível estruturação do sistema antioxidante (SCHAICH, TIAN e XIE, 2015). Uma vez elevada a concentração desses componentes fitoquímicos, a reação é saturada e interrompida pela formação de ductos adicionais gerados por tais componentes, impossibilitando a chegada dos elétrons ao sítio ativo do sistema antioxidante.

As reações envolvidas no método de consumo de DPPH[•] não renderam atividade antioxidante para EBT em nenhuma concentração testada, pois, segundo Schaich, Tian e Xie (2015), as transferências eletrônicas ocorridas não contemplaram o acesso desses elétrons, em tempo hábil, ao sítio ativo do radical DPPH[•], para permitir sua redução. Neste caso, faz-se necessária a formação de um complexo entre o radical e os componentes fitoquímicos e proteicos de EBT para que a atividade antioxidante seja visível. Em FPAL, o percentual de atividade antioxidante intensificou-se com o aumento das concentrações empregadas, pois, quando em concentrações muito baixas, os elétrons das proteínas presentes tiveram dificuldade de se ligar ao sítio ativo do radical DPPH[•], rendendo-lhes um percentual de atividade antioxidante diminuto.

Como os processos de fracionamento empregados até a obtenção de FPAL promoveram a eliminação dos compostos fitoquímicos, mas mantiveram a atividade antioxidante, sugere-se uma ação proteica para esta atividade biológica. Tais resultados, associados ao perfil de aminoácidos (**Tabela 13**), que expressa a abundância de aminoácidos carregados negativamente (ácido aspártico e ácido glutâmico), capazes de atuar como intermediários na doação de elétrons, constatou-se que HFF, EBT e FPAL são reconhecidamente bons eliminadores de radicais livres. A partir dessa premissa, sugere-se que os componentes (de origem proteica ou não) sejam isolados e testados separadamente, para que se tenha uma confirmação da origem da atividade antioxidante apresentada pelos produtos investigados.

4.6.2 Atividade antifúngica

Dentre os diversos tipos de infecções nosocomiais, àquelas acometidas por fungos são as mais comuns entre pacientes com malignidade sólida ou em recuperação de tratamentos abdominais (TONG e TANG, 2017). As espécies do gênero *Candida*, em especial, acometem principalmente pacientes imunossuprimidos (HASSAN et al., 2017). Tais microrganismos são patógenos oportunistas indutores da candidíase, sendo a *Candida albicans* o principal agente causador (TAN et al., 2016), com cerca de 90% dos casos registrados (ZIDA et al., 2017).

C. albicans costuma colonizar a pele e as superfícies das mucosas humanas, propagando-se comensalmente no trato gastrointestinal, cavidade oral e vagina (HASSAN et al., 2017). A *C. tropicalis*, por sua vez, é um patógeno oportunista taxonomicamente semelhante à *C. albicans* que costuma acometer pacientes com enfermidades em órgãos periféricos, em tratamentos leucêmicos (JOTHIPRAKASAM et al., 2017), neutropênicos e em terapia anti-neoplásica (BRILHANTE et al., 2016), o que representa 50% das infecções mucocutâneas e sistêmicas registradas (MARIONI et al., 2016). A *C. tropicalis* é considerada a segunda ou terceira espécie comumente identificada em culturas de urina (ALMEIDA et al., 2015), podendo, ainda, associar-se à infecções cerebrais relacionadas à hemorragia difusa (GUO et al., 2014).

Assim, conhecendo-se a patogenicidade de tal gênero e a importância de inibir seus mecanismos de ação biológica, viu-se HFF, EBT e FPAL, obtidos de sementes de *S. virgata*, todos conseguiram inibir o crescimento das leveduras *C. albicans* (ATCC-76645), *C. albicans* (LM-122), *C. tropicalis* (ATCC-13803), *C. tropicalis* (LM-64) e *C. tropicalis* (LM-7) (**Tabela 14**).

No geral, evidencia-se que tanto HFF, EBT e FPAL conseguiram inibir o crescimento das leveduras investigadas (**Tabela 14**). FPAL deteve a menor concentração proteica capaz de inibir (C.I.M. = 256 µg/mL) o crescimento dos microrganismos testados, o que representou uma ótima atividade quando considerados os critérios adotados por Sartoratto et al. (2004) e Houghton et al. (2007). Inibição do crescimento de leveduras do gênero *Candida*, mais especificamente de *C. albicans*, foi observada por Maregesi et al. (2008) com extratos de *S. sesban*. A mesma atividade não foi observada para *S. grandiflora* (SRINIVASAN et al., 2001). Extratos de outras espécies vegetais contendo proteínas biologicamente ativas também apresentam atividade inibidora do crescimento de leveduras do gênero *Candida*, como, por exemplo, a lectina (35,7 kDa) isolada de sementes da leguminosa

Archidendron jiringa (CHARUNGCHITRAK et al. 2011) e uma proteína (30 kDa) isolada de sementes do cereal *Sorghum bicolor* (MINCOFF et al., 2006).

Tabela 14 – Determinação da concentração inibitória mínima (µg/mL) do homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica sobre algumas leveduras e fungos filamentosos

Produto (µg/mL)	Microrganismos								
	<i>C. albicans</i> (ATCC-76645)	<i>C. albicans</i> (LM-122)	<i>C. tropicalis</i> (ATCC-13803)	<i>C. tropicalis</i> (LM-64)	<i>C. tropicalis</i> (LM-7)	<i>A. flavus</i> (LM-714)	<i>A. flavus</i> (LM-247)	<i>P. citrinum</i> (LM-9)	<i>P. citrinum</i> (LM-60)
HFF	512	512	512	1024	1024	1024	1024	1024	1024
EBT	512	512	512	512	512	1024	1024	512	512
FPAL	256	256	256	256	256	512	512	512	512
Controle do meio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle fungos	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nistatina (100µl/mL)	-	-	-	-	-	-----	-----	-----	-----
Fluconazol (50µg/mL)	-----	-----	-----	-----	-----	+	+	+	+

HFF (homogeneizado da farinha fina), EBT (extrato bruto total), FPAL (fração proteica com atividade lectínica), + (ocorreu crescimento fúngico) e- (não ocorreu crescimento fúngico).

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

Globalmente, as espécies do gênero *Aspergillus* colonizam diferentes ambientes e alimentos, destacando-se *A. flavus*, que é capaz de produzir e secretar metabólitos carcinogênicos (aflatoxinas) (KOSEGARTEN et al., 2017). Este fungo também sintetiza ácido ciclopiazônico, ocratoxinas, patulina e fumagilina (BOZIK et al., 2017). Notoriamente, é um fitopatógeno oportunista capaz de infectar uma grande variedade de sementes economicamente importantes (WANG et al., 2017). Além dos *Aspergillus*, também merecem atenção os fungos do gênero *Penicillium*, que utilizam os manguezais como ambiente de secreção de metabólitos (WU et al., 2015). *P. citrinum*, em especial, além de ambientes marinhos, povoam ambientes de solos saprófitos (TING, MAHA e TEE, 2012).

Além das leveduras, os fungos filamentosos *A. flavus* e *P. citrinum* são responsáveis por inúmeras patogenidades humanas, sendo de particular interesse a inibição do

crescimento de suas hifas. Dessa forma, HFF, EBT e FPAL, obtidos de sementes de *S. virgata*, foram testados quanto ao seu potencial fungicida (**Tabela 14**). Da análise dos resultados obtidos, constatou-se que FPAL deteve a menor concentração proteica (C.I.M. = 512 µg/mL) capaz de inibir os microrganismos testados, o que representou uma ótima atividade, quando considerados os critérios adotados por Sartoratto et al. (2004) e Houghton et al. (2007). A atividade antifúngica do EBT mostrou-se mais específica para *P. citrinum*, pois, na mesma concentração que FPAL (C.I.M. = 512 µg/mL), demonstrou uma ótima atividade.

Atividade antifúngica já foi relatada por Praxedes et al. (2011) para uma proteína com massa molecular de 50 kDa isolada de sementes de *S. virgata*. Tal proteína foi capaz de inibir o crescimento de *A. niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *Colletotrichum gloesporioides*. Extratos de *S. sesban* (MAREGESI et al., 2008) e *S. grandiflora* (AJITHA et al., 2016; SRINIVASAN et al., 2001) não inibiram o crescimento de *Aspergillus* spp. e, isoladamente, o extrato obtido de folhas de *S. grandiflora* conseguiu inibir o crescimento do *Penicillium* spp (AJITHA et al., 2016).

Conhecendo-se, pois, as patogenidades humanas e danos à indústria alimentar acometidas pelos enteropatógenos aqui investigados, faz-se necessário o desenvolvimento e aplicação de instrumentos interventivos e alternativos como uma forma de erradicar esses patógenos. Uma possibilidade é o desenvolvimento de fármacos antifúngicos tópicos para controle da contaminação fúngica com base nos produtos aqui investigados (HFF, EBT e FPAL), ou, devido os potenciais efeitos colaterais desses microrganismos à saúde humana (HU et al., 2017), utilizar esses subprodutos na alimentação animal, neutralizando a ação desses agentes patogênicos. Além da possibilidade de uso como fungicidas naturais na agricultura, incentivando a redução do impacto ambiental causado pelos fungicidas comumente usados, o que, conseqüentemente, incentiva a realização de novas pesquisas visando a exploração de medidas alternativas para o controle de fitopatógenos.

4.6.3 Atividade antibacteriana

Os resultados de atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas encontram-se dispostos na **Tabela 15**. Nesta, evidencia-se que HFF, EBT e FPAL, nas concentrações de 32 a 1024 µg/mL, não conseguiram inibir o crescimento de nenhuma das cepas investigadas.

Tabela 15 – Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do homogeneizado da farinha fina, extrato bruto total e fração proteica com atividade lectínica sobre algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Produto ($\mu\text{g/mL}$)	Cepas							
	<i>S. aureus</i> (ATCC-13150)	<i>S. aureus</i> (LM-117)	<i>S. epidermidis</i> (ATCC-12228)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC-25853)	<i>P. aeruginosa</i> (P-03)	<i>B. subtilis</i> (ATCC- 6633)	<i>E. coli</i> (ATCC- 10436)	<i>E. coli</i> (EC-12)
HFF	+	+	+	+	+	+	+	+
EBT	+	+	+	+	+	+	+	+
FPAL	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle do meio	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle da bactéria	+	+	+	+	+	+	+	+
Cloranfenicol (100 $\mu\text{g/mL}$)	-	-	-	+	+	-	-	+

HFF (homogeneizado da farinha fina), EBT (extrato bruto total), FPAL (fração proteica com atividade lectínica), + (ocorreu crescimento bacteriano) e – (não ocorreu crescimento bacteriano).

Fonte: Pesquisa direta, 2015-2017.

O gênero *Staphylococcus* compreende 52 espécies e 28 subespécies de bactérias Gram-positivas (PODKOWIK et al., 2016). Dentre elas, *S. aureus*, um patógeno comensal causador de inúmeras enfermidades em diferentes espécies, incluindo o homem (JANSEN et al., 2013), gerando desde infecções cutâneas até doenças altamente invasivas, como a endocardite infecciosa (THAPALIYA et al., 2017). Infecções nosocomiais (POURAKBARI et al., 2017), a síndrome de pele escaldada, a septicemia, a pneumonia, a osteomielite e a artrite também são exemplos (SHAH DORDIZADEH et al., 2017). Outra espécie, a *S. epidermidis*, é comum aos epitélios humanos (LI et al., 2016), ocorrendo em enfermidades como osteomielite e infecção de articulações (MANTRIPRAGADA e JAYASURIYA, 2016). Ademais, *S. aureus* costuma evocar intoxicações alimentares mediado pela secreção de enterotoxinas termicamente estáveis (PODKOWIK et al., 2016).

O gênero *Pseudomonas*, por sua vez, envolve bactérias Gram-negativas aeróbias (BRUGUERA-CASAMADA et al., 2017) comumente isoladas de ambientes ricos em matéria orgânica (DEVARAJAN et al., 2017). *P. aeruginosa*, em especial, associa-se frequentemente às infecções oculares, como queratite e esclerite (MURUGAN et al., 2017), além de acometer

pacientes com otite externa, dermatite, fibrose cística e pneumonia; sendo a quinta causa mais frequente de infecções nosocomiais (BRUGUERA-CASAMADA et al., 2017). Por ser um microorganismo de ampla ocorrência, difunde-se rapidamente por corpos aquosos, alimentos e fezes de animais, podendo induzir infecções urinárias (YUE et al., 2017).

Por fim, *E. coli* compreende a classe de bactérias Gram-negativas capazes de colonizar a microbiota normal de ruminantes sem acometer-lhes doenças (KINTZ et al., 2017). Em humanos, esses enteropatógenos também podem ser encontrados no trato gastrointestinal, cujas infecções (urinárias, em especial) são decorrentes do consumo de carnes contaminadas (CHIEN et al., 2017). Tais enteropatógenos podem causar diarreia (KONATÉ et al., 2015) e infecção do trato urinário (MOHANTY et al., 2017), passíveis de evoluir para síndrome hemolítica urêmica (KINTZ et al., 2017).

Os extratos obtidos de *S. grandiflora* (DAS, DAS e VELUSAMY, 2013; AJITHA et al., 2016; GOUN et al., 2003; SRINIVASAN et al., 2001; VALSARAJ et al., 1997) também não conseguiram inibir o crescimento de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, além de outras cepas não investigadas aqui, como *Salmonella enterica*, *S. paratyphi* e *Enterococcus faecalis*. Extratos obtidos de *S. sesban* (MAREGESI et al., 2008) também não conseguiram inibir o crescimento da *E. coli*, mas foram antagonísticos ao *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *S. typhimurium*. O mesmo comportamento foi verificado para os extratos de *S. aculeata* (GROSVENOR, SUPRIONO e GRAY, 1995), que não inibiram o crescimento de *E. coli*, mas inibiram o de *S. aureus*.

O gênero *Bacillus*, outro modelo investigado, apresenta espécies capazes de formar esporos resistentes à condições ambientais adversas (FAN et al., 2017). Envolve bactérias Gram-positivas (LIU et al., 2017), como a espécie *B. subtilis*, um enteropatógeno aeróbio utilizado na indústria alimentar para produção de enzimas lipolíticas e proteases (PARACCHINI et al., 2017; LIN et al., 2016) e como modelo no combate à nematoides que parasitam vegetais, atuando como biocidas (RAO et al., 2017).

O resultado negativo apresentado pelos produtos aqui testados frente a *B. subtilis* (**Tabela 15**), corrobora com aqueles já relatados para *S. grandiflora* (AJITHA et al., 2016; GOUN et al., 2003; SRINIVASAN et al., 2001; VALSARAJ et al., 1997), evidenciando a possibilidade de aplicação desses produtos como antagonistas à fitopatógenos, uma vez que servindo de meio para crescimento de *B. subtilis*, diminui a população de nematoides. Tal observação explica a simbiose bem-sucedida de alguns microrganismos funcionais com alimentos ou produtos de origem vegetal, ampliando a possibilidade de utilização das sementes de *S. virgata* e seus produtos como vermicomposto amparados pela possibilidade de

redução do uso de bioinseticidas e ser facilmente replicado (no caso da HFF) pelos pequenos e grandes agricultores. Um exemplo bem sucedido de nematicidas empregados na agricultura foi o investigado por Rao et al., (2017), quando erradicou mazelas causadas por nematóides em cenouras.

O gênero *Sesbania*, caracteristicamente, tem constituintes de origem protéica e/ou fenólica que não são capazes de inibir diversas cepas, independentemente da espécie ou parte vegetativa utilizadas (sementes, raízes, caules e folhas, ou o combinado destes). Para a inibição do crescimento bacteriano são requeridas interações entre o ácido murâmico, presente nas paredes celulares das bactérias, e os fatores antinutricionais presentes no material biológico investigado. No caso da FPAL, as lectinas presentes nessa fração, por não reconhecerem os carboidratos (ácido murâmico) ou os fragmentos da parede celular (muramilpeptídeos) das bactérias investigadas, não conseguiram inibir o crescimento destas.

5 CONCLUSÃO

Os parâmetros morfológicos, físicos e químicos apresentados pelas sementes de *Sesbania virgata* propiciam sua potencial implementação no mercado, livres da rejeição dos consumidores e produtores. Este resultado é reforçado pela composição química parcial das suas sementes.

Dentre os ácidos graxos insaturados, o linoleico é o mais abundante e, dentre os saturados, é o palmítico o mais abundante.

A otimização dos extratos gerados permitiu a detecção de fatores antinutricionais de origem proteica e não-proteica.

Os teores de aminoácidos encontrados proporcionam o uso da farinha de sementes e FPAL como promissoras na complementação de dietas (animais ou humanas) com notória deficiência destes aminoácidos desde que estudos toxicológicos comprovem tal percepção.

As análises proteicas revelaram um elevado teor de proteína total para FF, EBT e FPAL, com massas moleculares relativas oscilando entre 31 e 225 kDa.

FF, EBT e FPAL apresentaram atividade antioxidante. Embora não tenham apresentado atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Echerichia coli*; promoveram a inibição do crescimento das leveduras *Candida albicans* e *C. tropicalis*, e dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium citrinum*, o que evidencia a possibilidade de sua aplicação como fármacos antifúngicos tópicos para controle da contaminação por estes patógenos.

Referências

AACC – American Association for Clinical Chemistry. The definition of dietary fiber (Report of the dietary fiber definition committee to the board of director of the AACC). **Cereal Foods World**, v.46, n.3, p.112-126, 2001.

ABREU, P.A.A. **Caracterização dos fatores nutricionais e antinutricionais de sementes de frutos do cerrado**. 2015. 157f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

AFONSO-CARDOSO, S.R. et al. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in murine macrophages. *Experimental Parasitology*, v.128, p.61-67, 2011.

AHA – American Heart Association. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. **Circulation**, v.114, p.82-96, 2006.

AJITHA, B. et al. *Sesbania grandiflora* leaf extract assisted green synthesis of silver nanoparticles: antimicrobial activity. **Materials Today: Proceedings**, v.3, p.1977-1984, 2016.

ALBUQUERQUE, L.P. et al. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, v.138, p.23-27, 2014.

ALDWAIRJI, M.A. et al. Analysis of dietary fibre of boiled and canned legumes commonly consumed in the United Kingdom. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.36, p.111-116, 2014.

ALMEIDA, A.A. et al. Genotypic variability and antifungal susceptibility of *Candida tropicalis* isolated from patients with candiduria. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.32, n.3, p.153-158, 2015.

ALMEIDA, M.S. et al. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.378, n.2, p.278-286, 2000.

ALVES, L.F.; ROCHA, M.S.; GOMES, C.C.F. Avaliação da qualidade protéica da Quinoa Real (*Chenopodium quinoa* Willd) através de métodos biológicos. **e-scientia**, v.1, p.1-16, 2008.

AMARAKOON, R. Study on amino acid content in selected varieties of *Pisum sativum* (peas) by ion exchange chromatography. **International Conference on Nutrition and Food Sciences - IACSIT Press**, v.39, p.211-214, 2012.

ANDERSON, R.A. et al. Gelatinization of corngrits by Roll-and extrusion-cooking. **Cereal Science Today**, v.14, p.4-12, 1969.

ANTUNES, P.L. et al. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivares “Rico 23”, “Carioca”, “Piratã-1” e “Rosinha-G2”. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.1, p.12-18, 1995.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n° 360, de 23 de dezembro de 2003. **Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados**. In: Diário Oficial da União. Brasília, 23 de dezembro, 2003.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International. Método n° 923.03, item 9.2.39, p.46 – ICP**. 18ª edição. International, Gaithersburg, MD: 2005.

_____. **Official Methods Analysis of AOAC International**. Washington: AOAC, 2000.

ARAÚJO, E.C. et al. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, p.105-110, 2004.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, v.24, p.1-15, 1949.

ASHMEAD, H.D. **Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic metals salts**. *Itonin*: ASHMEAD, H.D. (Org.). The roles of amino acid chelates in animal nutrition. New Jersey: Noyes, 1993.

AZARKAN, M. et al. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β -sheet glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1764, p.1063-1072, 2006.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.6, n.2, p.71-79, 2016.

BALZARINI, J. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. **Antiviral Research**, v.71, p.237-247, 2006.

BARBOSA, P.P.S. **Purificação, caracterização e atividades biológicas de lectinas do extrato de sementes de *Canavalia brasiliensis* (Feijão-bravo do Ceará)**. 74f. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

BARBOSA, W.L.R. et al. **Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais**. Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém - PA, 2001.

BARIANI, A. et al. Purificação parcial de inibidores de sementes de *Caesapinia férrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.2, p.131-138, 2012.

BARRE, A. et al. Mannose-binding plant lectins: different structural scaffolds for a common sugar-recognition process. **Biochimie**, v.83, n.7, p.645-651, 2001.

- BATISTA, I.F.C. et al. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Phytochemistry**, v.41, p.1017-1022, 1996.
- BENITO, F.N. et al. Constitutive and inducible type 1 ribosome-inactivating proteins (RIPs) in elberry (*Sambucus nigra* L.). **FEBS Letters**, v.428, p.75-79, 1998.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. Second ed., Plenum Press, New York, 1994.
- BILIADERIS, C.G. The structure and interactions of starch with food constituents. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, v. 69, p.60-78, 1991.
- BISWAS, H.; CHATTOPADHYAYA, R. Thermal, chemical and pH induced unfolding of turmeric root lectin: modes of denaturation. **PLoS ONE**, v.9, n.8, p.1-14, 2014.
- BISWAS, S. et al. Purification and mass spectrometric characterization of *Sesbania aculeata* (Dhaincha) stem lectin. **Protein Journal**, v.28, p.391-399, 2009.
- BISWAS, S.; SAROHA, A.; DAS, H.R. A lectin from *Sesbania aculeata* (Dhaincha) roots and its possible function. **Biochemistry**, v.74, n.3, p.329-335, 2009.
- BODE W.; HUBER R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, v.204, n.2, p.433-51, 1992.
- _____. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1477, n.1-2, p.241-52, 2000.
- BOZIK, M. et al. Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus* spp. in oats with improved consumer acceptability. **Industrial Crops and Products**, v.98, p.146-152, 2017.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Anal Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAGGIO, M.M. et al. Atividades farmacológicas das folhas da *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, n.4, p.49-53, 2002.
- BRANZINI A., GONZÁLEZ R.S., ZUBILLAGA M. Absorption and translocation of copper, zinc and chromium by *Sesbania virgata*. **Journal of Environmental Management**, v.102, p.50-54, 2012.
- BRASIL, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>. Acesso em 24 de Dez de 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Acompanhamento da Safra Brasileira 2016/2017: grãos – Observatório Agrícola** (Janeiro de 2017), v.4, n.4. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), 2017. 162p.
- _____. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.

_____. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, CNNPA. **Resolução CNNPA nº 12 de julho 1978**. Brasília: CNNPA, 1978.

_____. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, DCANVS. **Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005**. Brasília: DCANVS, 2005-a.

_____. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, DCANVS. **Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005**. Brasília: DCANVS, 2005-b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não-transmissíveis: DCNT no contexto do Sistema Único de Saúde Brasileiro**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2005-c.

_____. Resolução RDC n. 94 de 01 de novembro de 2000. **Regulamento Técnico para Rotulagem Nutricional Obrigatória de Alimentos e Bebidas Embalados**. Brasília: Diário Oficial da União, 2000.

_____. **Vigilância alimentar e nutricional – SISVAN**: orientações básicas para a coleta, processamento, análise de dados e informação em serviços de saúde. Brasília: SISVAN, 2004.

BRILHANTE, R.S.N. et al. *Candida tropicalis* from veterinary and human sources shows similar in vitro hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*. **Veterinary Microbiology**, v.192, p.213-219, 2016.

BRUGUERA-CASAMADA, C. et al. Effect of electrogenerated hydroxyl radicals, active chlorine and organic matter on the electrochemical inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* using BDD and dimensionally stable anodes. **Separation and Purification Technology**, v.178, p.224-231, 2017.

BRZIN, J.; KIDRIC, M. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.13, p.421-467, 1995.

BUCKERIDGE, M.S. et al. Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p.31-50.

BYNG, J.W. et al. An update of angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants – APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.181, p.1-20, 2016.

CALDERON, L.A. et al. Serine protease inhibitors from Amazon Leguminosae seeds: purification and preliminary characterization of two chymotrypsin inhibitors from *Inga umbratica*. **Protein and Peptide Letters**, v.8, n.6, p.485-493, 2001.

CAMMUE, B.P.A.; PEETERS, B.; PEAUMANS, W.J. A new lectin from tulip (*Tulipa*) bulbs. **Planta**, v.169, n.4, p.583-588, 1986.

CAMPBELL, J.B.; PEERBAYE, Y.A. Saponins. **Research in Immunology**, v.143, n.5, p.526-530, 2012.

CARVALHAES, M.A.B.L.; MOURA, E.C.; MONTEIRO, C.A. Prevalência de fatores de risco para doenças crônicas: inquérito populacional mediante entrevistas telefônicas em Botucatu, São Paulo, 2004. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.11, n.1, p.14-23, 2008.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1993. 429p.

CASTANHEIRA, L.E. **Purificação e caracterização química e funcional de uma lectina tipo-C ligante de D-galactose da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*)**. 2011. 72f. Dissertação (Mestre em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

CAVALCANTI, M.S.M. et al. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with one disulfide bridge purified from *Swartzia pickellii*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.29, p.635-639, 2002.

CEREDA, M.P. **Propriedades gerais do amido**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. 221p.

CERQUEIRA, V.C. **Produção de frutose a partir de hidrólise do enzimático de amido de mandioca**. 2012. 76f. Tese (Doutorado em Energia na Agricultura), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

CHACÓN-ORDÓÑEZ, T. et al. Carotenoids and carotenoid esters of orange- and yellow-fleshed mamey sapote (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) fruit and their postprandial absorption in humans. **Food Chemistry**, v.221, p.673-682, 2017.

CHANG, K.C.; SATTERLEE, L.D. Isolation and characterization of the major protein beans by enzymatic hydrolysis and diffusion. **Journal of Food Science**, v.46, p.1368-1373, 1981.

CHARUNGCHITRAK, S. et al. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chemistry**, v.126, p.1025-1032, 2011.

CHAVAN, U.D. et al. Physico-chemical properties and nutrient composition of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). **Food Chemistry**, v.66, p.43-50, 1999.

CHEVREUIL, L.R. **Extração e purificação de inibidores proteolíticos em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia**. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Florestas Tropicais), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2009.

CHIEN, S-Y. et al. Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and Uropathogenic *E. coli* in ground beef by high pressure processing and citral. **Food Control**, v.73, p.672-680, 2017.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 783p.

CHONG, E.W.; SINCLAIR, A.J.; GUYMER, R.H. Facts on fats. **Clinical Experimental Ophthalmology**, v.34, n.5, p.464-71, 2006.

CHRISTELLER, J.; LIANG, W. Plant serine protease inhibitors. **Protein and Peptide Letters**, v.12, p.439-447, 2005.

CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evalution of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V.M.D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

COELHO, C.M.M. et al. Influência das características morfológicas e físicas dos grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) na sua capacidade de hidratação e cocção. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.105-107, 2007.

_____. Potencial fisiológico em sementes de cultivares de feijão crioulo (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.3, p.97-105, 2010.

CUBERO, J.I. Traditional varieties of grain legumes for human consumption. **Plant Production and Protection Series**, v.26, p.273-288, 1994.

CUNHA, C.R.A. **Avaliação da atividade antitumoral da lectina recombinante de *Cratylia mollis* (rCRAMOLL) livre e encapsulada em lipossomas furtivos**. 2014. 123f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

DAI, H. et al. Bowman–Birk inhibitor attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by delaying infiltration of inflammatory cells into the CNS. **Immunology Research**, v.51, p.145-152, 2011.

DAS, J.; DAS, M.P.; VELUSAMY, P. *Sesbania grandiflora* leaf extract mediated green synthesis of antibacterial silver nanoparticles against selected human pathogens. **Spectrochimica Acta, Part A – Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.104, p.265-270, 2013.

DATTA, P.K.; FIGUEROA, M.O.D.C.R.; LAJOLO, F.M. Purification and characterization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn. *Araucaria angustifolia* a seeds (pinhão). **Plant Physiology**, v.97, p.856-62, 1991.

DE LEÓN, L.; BRESSANI, R.; ELÍAS, L.G. Effect of seed coat on the hard-to-cook phenomenon of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.39, p.405-407, 1989.

DEBRAY, H. et al. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. **European Journal of Biochemistry**, v.117, p.41-55, 1981.

DEENEN, N.; PRÜFER, D.; SCHULZE GRONOVER, C. A latex lectin from *Euphorbia trigona* is a potent inhibitor of fungal growth. **Biologia Plantarum**, v.55, n.2, p.335-339, 2011.

DELLAVALLE, P.D. et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.71, n.2, p.231-239, 2011.

DEVARAJAN, N. et al. Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in the aquatic environment: A prevalence study under tropical and temperate climate conditions. **Water Research**, v.115, p.256-265, 2017.

DIXON, R.A.; SUMNER, L.W. Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. **Plant Physiology**, v.131, p.878-885, 2003.

DORIA, E. et al. Anti-nutrient components and metabolites with health implications in seeds of 10 common bean (*Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L.) landraces cultivated in southern Italy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.26, p.72-80, 2012.

DOYLE, J.J.; LUCKOW, M.S. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, v.131, p.900-910, 2003.

DU, S. et al. Physicochemical properties and digestibility of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) starches. **Carbohydrate Polymers**, v.108, p.200-205, 2014.

DUARTE, M.S.L. et al. Determinação da atividade in vitro de inibidores de tripsina em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) preto, albumina e globulina. **Alimentos e Nutrição**, v.21, n.3, p.373-376, 2010.

DURIGAN, J.F. **Influência do tempo e das condições de estocagem sobre as propriedades químicas, físico-mecânicas e nutricionais do feijão mulatinho (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Campinas, 1979. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade de Campinas, Campinas, 1979.

E-LACERDA, R.R. et al. Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.95, p.1072-1081, 2017.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, p.711-713, 1978.

ESHUN, G.; AMANKWAH, E.A.; BARIMAH, J. Nutrients content and lipid characterization of seed pastes of four selected peanut (*Arachis hypogaea*) varieties from Ghana. **African Journal of Food Science**, v.7, n.10, p.375-381, 2013.

EVANS, D.O.; ROTAR, P.P. **Sesbania in agriculture**. United States of America: Westview. 196p, 1987.

EVANS, R.J.; BANDEMER, S.L. Nutritive Value of Legume Seed Proteins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.15, n.3, p.439-443, 1967.

FAN, H. et al. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. **Microbiological Research**, v.199, p.89-97, 2017.

FAO – Food and Agriculture Organization & World Health Organization – WHO. (2007). **Protein and amino acid requirements in human nutrition**. Geneva: WHO. Technical Report Series 935.

FERNANDES, A.V. **Caracterização bioquímica e avaliação da atividade antifúngica de lectinas de sementes de *Fabaceae* da Amazônia**. 103f. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

FERNANDES, A.V. et al. Purification and characterization of a lectin of the *Swartzieae* Legume Taxa. **Protein and Peptide Letters**, v.19, n.10, p.1082-1088, 2012.

_____. Seeds of Amazonian *Fabaceae* as a source of new lectins. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.23, p.237-244, 2011.

FERREYRA, M.L.F.; RIUS, S.P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v.3, n.222, p.1-15, 2012.

FLORENTINO, L.A.; MOREIRA, F.M.S. Características simbióticas e fenotípicas de *Azorhizobium doebereineriae*, microsimbiote de *Sesbania virgata*. **Árvore**, v.33, n.2, p.215-226, 2009.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.

FORZZA, R.C. et al. (Org.) **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. v.1. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/Andrea Jakobsson Estúdio, 2010-a. 875p.

_____. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. v.2. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/Andrea Jakobsson Estúdio, 2010-b. 830p.

FRANCO, G. **Tabela de composição química de alimentos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005, 307p.

FRANCO, O.L. et al. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: Structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, v.269, p.397-412, 2002.

FROES, L.O. **Emprego da farinha de bandinha de feijão carioca extrusada na formulação de misturas para bolo sem glúten contendo farinha de quirera de arroz**. 2012. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

GARCIA-VELA, L A.; STANLEY, D.W. Water-holding capacity in hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.): effect of pH and ionic strength. **Journal of Food Science**, v.54, n.4, p.1080-1081, 1989.

GEORGE, J.P.; DATTA, A.K. Development and validation of heat and mass transfer models for freeze-drying of vegetable slices. **Journal of Food Engineering**, v.52, p.89-93, 2002.

GEVRENOVA, R. et al. Quantitative structure – activity relationship study on saponins as cytotoxicity enhancers. **Letters in Drug Design & Discovery**, v.12, n.3, p.166-171, 2015.

GIULIETTI, A.M. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p.52-61, 2005.

GLOVER, B.J.; MARTIN, C. Anthocyanins. **Current Biology**, v. 22, n.5, p.R147-R150, 2012.

GOMES, F.S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v.114, n.3, p.672-679, 2013.

GOMES, G.L.B. **Detecção de inibidores de tripsina em genótipos de gergelim visando controle de *Plodia interpunctella***. 2014. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

GOON, E. et al. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. **Fitoterapia**, v.76, p.592-596, 2003.

GROSVENOR, P.W.; SUPRIONO, A.; GRAY, D. Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2: antibacterial and antifungal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, p.97-111, 1995.

GUAJARDO-FLORES, D.; SERNA-SALDÍVAR, S.O.; GUTIÉRREZ-URIBE, J.A. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v.141, p.1497-1503, 2013.

GÜÇLÜ-USTÜNDAĞ, O; MAZZA, G. Saponins: properties, applications and processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, n.3, p.231-258, 2007.

GUILLON, F.; CHAMP, M. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. **Food Research International**, v.33, p.233-245, 2000.

GUO, Y. et al. Rare appearance of *Candida tropicalis* infection of the brain: multiple micro-abscesses combined with diffuse hemorrhages. **Radiology of Infectious Diseases**, v.1, p.33-36, 2014.

GUTKOSKY, L.C. **Caracterização tecnológica de frações de moagem de aveia e efeito de umidade e temperatura de extrusão na sua estabilidade**. 241f. 1997. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

GUZMÁN, C. et al. Amylose content and starch properties in emmer and durum wheat lines with different waxy proteins composition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, n.9, p.1625-1629, 2011.

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**, v.80, n.13, p.1874-1881, 2000.

HABIB, H.; FAZILI, K.M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.2, n.3, p.68-85, 2007.

HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HAJMOHAMMADI, A. et al. Enrichment of a fruit-based beverage in dietary fiber using basil seed: Effect of Carboxymethyl cellulose and Gum Tragacanth on stability. **Food Science and Technology**, v.74, p.84-91, 2016.

HARMON, J.P., MORAN, N.A.; IVES, A.R. Species response to environmental change: impacts of food web interactions and evolution. **Science**, v.323, n.5919, p.1347-1350, 2009.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**, v.22, n.8, p.475-476, 1973.

HASSAN, R.Y.A. et al. Carbon nanotube-based electrochemical biosensors for determination of *Candida albicans*'s quorum sensing molecule. **Sensors and Actuators, Part B – Chemical**, v.244, p.565-570, 2017.

HEITZ, T. et al. cDNA cloning and gene expression analysis of the microbial proteinase inhibitor of tobacco. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.23, p.16987-16992, 1993.

HENTEGES, D.L.; WEAVER, C.M.; NIELSEN, S.S. Change of selected physical and chemical componentes in the developement of the hard-to-cook defect. **Journal of Food Science**, v.56, n.2, p.436-442, 1991.

HINCKS, M.J.; STANLEY, D.W. Multiple Mechanisms of bean hardening. **Journal of Food Technology**, v.21, p.723-750, 1986.

HOSSAIN, M.A.; BECKER, K. Nutritive value and antinutritional factors in different varieties of *Sesbania* seeds and their morphological fractions. **Food Chemistry**, v.73, p.421-431, 2001.

HOSSEINI, S.R.P.; TAVAKOLI, O.; SARRAFZADEH, M.H. Experimental optimization of SC-CO₂ extraction of carotenoids from *Dunaliella salina*. **The Journal of Supercritical Fluid**, v.121, p.89-95, 2017.

HOUGHTON, P.J. et al. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Etnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

HU, Y. et al. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v.220, p.1-8, 2017.

- HUBER, K. **Evidências da interação entre proteínas e taninos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e seus efeitos na digestibilidade protéica**. 107f. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- INGALE, S.; SHRIVASTAVA, S.K. Nutritional study of new variety of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) JL-24 seeds. **African Journal of Food Science**, v.5, n.8, p.490-498, 2011.
- ISLAM, F.M.A. et al. Association between seed coat polyphenolics (tannins) and disease resistance in common bean. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.58, p.285-297, 2003.
- ITO, Y. Occurrence of lectins in leaves and flowers of *Sophora japonica*. **Plant Science**, v.47, n.2, p.77-82, 1986.
- JAFARI, M. et al. Physicochemical characterization of a navy bean (*Phaseolus vulgaris*) protein fraction produced using a solvent-free method. **Food Chemistry**, v.208, p.35-41, 2016.
- JANSEN, K.U. et al. Vaccine review: “*Staphylococcus aureus* vaccines: problems and prospects”. **Vaccine**, v.31, p.2723-2730, 2013.
- JESUS, N.Z.T. et al. Hippocratic screening and subchronic oral toxicity assessments of the methanol extract of *Vatairea macrocarpa* heartwood in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.6, p.1308 -1314, 2012.
- JOTHIPRAKASAM, V. et al. *Candida tropicalis* biofilm inhibition by ZnO nanoparticles and EDTA. **Archives of Oral Biology**, v.73, p.21-24, 2017.
- KAPOOR, V.P.; FAROOQI, M.I.H.; KAPOOR, L.D. Chemical investigation of seed mucilages from *Cassia* species. **Indian Forest**, v.106, n.11, p.810-812, 1980.
- KELEMU, S.; CARDONA, C.; SEGURA, G. Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of *Clitoria ternatea*, a tropical forage legume. **Plant Physiology Biochemistry**, v.42, p.867-873, 2004.
- KINTZ, E. et al. Transmission pathways for sporadic Shiga-toxin producing *E. coli* infections: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.220, p.57-67, 2017.
- KIRCHGEßNER, H.D. et al. Light and temperature, but not UV radiation, affect chlorophylls and carotenoids in Norway spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst.). **Plant, Cell and Environment**, v.26, n.7, p.1169-1179, 2003.
- KIRK, J.T.O.; ALLEN, R.L. Dependence of chloroplast pigment synthesis on protein synthesis: effect of actidione. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.21, n.6, p.523-30, 1965.
- KLOMKLAO, S. et al. A heat-stable trypsin inhibitor in adzuki bean (*Vigna angularis*): effect of extraction media, purification and biochemical characteristics. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.163-169, 2010.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; SIMPSON, B.K. Inhibition of bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) proteinases by trypsin inhibitor from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) roe. **Journal of Food Biochemistry**, v.39, p.501-507, 2015.

KNOPS, J.M.H., BRADLEY, K.L.; WEDIN, D.A. Mechanisms of plant species impacts on ecosystem nitrogen cycling. **Ecology Letters**, v.5, p.454-466, 2002.

KNOPS, J.M.H.; TILMAN, D. Dynamics of soil carbon and nitrogen accumulation for 61 years after agricultural abandonment. **Ecology**, v.81, p.88-98, 2000.

KODALI, D.R.; LIST, G.R. **Trans Fats Alternatives**. AOCS Press, United States of America, 2006.

KOIWA, H. et al. Insecticidal activities of soybean cysteine proteinase inhibitors are correlated with their papain-binding affinities as phage-displayed proteins. **Plant Physiology**, v.114, p.1115-1120, 1997.

KONATÉ, K. et al. Antidiarrheal and antimicrobial profiles extracts of the leaves from *Trichilia emetica* Vahl. (*Meliaceae*). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.5, n.3, p.242-248, 2015.

KOSEGARTEN, C.E. et al. Description of *Aspergillus flavus* growth under the influence of different factors (water activity, incubation temperature, protein and fat concentration, pH, and cinnamon essential oil concentration) by kinetic, probability of growth, and time-to-detection models. **International Journal of Food Microbiology**, v.240, p.115-123, 2017.

KOSINSKA, A. et al. Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill. peels and seeds of two varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.18, p.4613-4619, 2012.

KUMAR, K.K. et al. Lectins and its biological role: a review. **Journal of Orofacial Sciences**, v.4, p.20-25, 2015.

KUMAR, S.B.; PRABHASANKAR, P. A study on starch profile of rajma bean (*Phaseolus vulgaris*) incorporated noodle dough and its functional characteristics. **Food Chemistry**, v.180, p.124-132, 2015.

LA VEGA, A.; SOTELO, A. The nutritional quality and toxin content of wild and cultivated lima beans (*Phaseolus lunatus*). **Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition**, v.36, p.75-83, 1986.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.659-680, 1970.

LAN, S. et al. Sesbania gum-based magnetic carbonaceous nanocomposites: facile fabrication and adsorption behavior. **Colloids and Surfaces – Part A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.446, p.163-171, 2014.

LAW, I.J. Characterization of cDNA for mannose-binding lectin of peanut and expression in nodules and other plant tissues. **Plant Science**, v.115, p.81-89, 1996.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Physicochemical characterization of some starchy tubers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, p.65-69, 2002.

LI, B.M.; CARDOZO, M.S. Nonenzymatic-gravimetric determination of dietary fiber in fruit and vegetable. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International – Official methods of analysis**, v.77, n.3, p.687-689, 1994.

LI, Q. et al. Characterization of CRISPR-Cas system in clinical *Staphylococcus epidermidis* strains revealed its potential association with bacterial infection sites. **Microbiological Research**, v.193, p.103-110, 2016.

LIN, H-T.V. et al. Enhanced anti-inflammatory activity of brown seaweed *Laminaria japonica* by fermentation using *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v.51, p.1945-1953, 2016.

LISBOA, C.G.S. et al. Endo- β -mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.2, p.269-280, 2006.

LIU, Y. et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: recent advances and future directions. **Biotechnology Advances**, v.35, p.20-30, 2017.

LOPES, A.C.A. et al. Variabilidade e correlações entre caracteres agronômicos em caupi (*Vigna unguiculata*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n. 3, p. 515-520, 2001.

LÓPEZ, L. Grain legumes for animal feed. **Plant Production and Protection Series**, v.26, p.273-288, 1994.

LORIS, R. et al. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1383, p.9-36, 1998.

MA, J. et al., Interactions of Flavonoids with Biomacromolecules. **Current Organic Chemistry**, v.15, p.2627-2640, 2011.

MACHADO, R.J.A. et al. Characterization and pharmacological properties of a novel multifunctional Kunitz inhibitor from *Erythrina velutina* seeds. **PLoS ONE**, v.8, n.5, p.1-15, 2013.

MAJUMDER, P.; MONDAL, H.A.; DAS, S. Insecticidal activity of *Arum maculatum* tuber lectin and its binding to the glycosylated insect gut receptors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.17, p.6725-6729, 2005.

MAKELA, D. Studies in haemagglutinins of Leguminosae seeds. **Annals of Medical and Experimental Biology Fenniae**, v.35, (Supplementum 11), p.1-156, 1957.

MAMILLA, R.K.; MISHRA, V.K. Effect of germination on antioxidant and ACE inhibitory activities of legumes. **LWT – Food Science Technology**, v.75, p.51-58, 2017.

MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.538-544, 1998.

MANTRIPRAGADA, V.P.; JAYASURIYA, A.C. Effect of dual delivery of antibiotics (vancomycin and cefazolin) and BMP-7 from chitosan microparticles on *Staphylococcus epidermidis* and pre-osteoblasts *in vitro*. **Materials Science and Engineering, Part C – Material of Biological Applications**, v.67, p.409-417, 2016.

MARADINI-FILHO, A.M. **Caracterização físico-química, nutricional e fatores antinutricionais de quinoa da variedade brasileira BRS Piabiru**. 2014. 202f. Tese (*Doctor Scientiae*), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

MAREGESI, S.M. et al. Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.58-66, 2008.

MARGIS, R.; REIS, E.M.; VILLET, V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystalins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.359, p.24-30, 1998.

MARIKE, T. et al. Diversity and biogeographical patterns of legumes (*Leguminosae*) indigenous to southern Africa. **PhytoKeys**, v.70, p.53-96, 2016.

MARIONI, J. et al. The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. **Phytomedicine**, v.23, p.1321-1328, 2016.

MARQUES, L.G. **Liofilização de frutas tropicais**. 255f. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

MARQUES, M.F.; BORA, P.S. Composición química y análisis de aminoácidos de alubias. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v.2, n.5, p.248-252, 2000.

MARQUEZ, U.M.L.; LAJOLO, F.M. Composition and digestibility of albumins, globulins and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.29, n.5, p.1068-1074, 1981.

MARTIN-CABREJAS, M.A. et al. Changes in physicochemical properties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) during long-term storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.8, p.3223-3227, 1997.

MASSEY, L.K. Dietary animal and plant protein and human bone health: a whole foods approach. **The Journal of Nutrition**, v.133, n.3, p.862S-865S, 2003.

MATHESON, N.R.; VAN HALBEEK, H.; TRAVIS, J. Evidence for a tetrahedral intermediate complex during serpin-proteinase interactions. **The Journal Biology Chemistry**, v.266, n.25, p.13489-13491, 1991.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: EUFC, 1997.

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solution. **Phytochemistry**, v.29 n.4, p.1097-1102, 1990.

MCDUGALL, G.J.; STEWART, D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **Biofactors**, v.23, n.4, p.189-195, 2005.

MEGÍAS, C. et al. Free amino acids, including canavanine, in the seeds from 32 *Vicia* species belonging to subgenus *Vicilla*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.8, p.126-129, 2016.

MINCOFF, P.C. et al. Isolation and characterization of a 30 kD antifungal protein from seeds of *Sorghum bicolor*. **Research in Microbiology**, v.157, p.326-332, 2006.

MIRANDA, G.S. et al. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.104-111, 2013.

MOHANTY, S. et al. Extract of *Clinopodium bolivianum* protects against *E. coli* invasion of uroepithelial cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.198, p.214-220, 2017.

MONTEIRO, M.P. **Bebida à base de subproduto da uva: efeitos sobre o estresse oxidativo e marcadores de risco de doenças cardiovasculares em mulheres saudáveis**. 101f. 2011. Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. **Caracterização estrutural de três lectinas apresentando especificidades para açúcar distintas, isoladas de sementes de fruta-pão (*Artocarpus incisa* L.)**. 2002. 164f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

MOORE, S.; SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Federation Proceedings**, v.17, n.4, p.1107-1115, 1958.

MORALES, F.J.; JIMENEZ-PEREZ, S. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. **Food Chemistry**, v.72, p.119-125, 2001.

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

MOSOLOV, V.V.; VALUEVA, T.A. Proteinase Inhibitors and their function in plants: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.41, n.3, p.227-246, 2005.

MOUGHAN, P.J. Dietary protein for human health – Preface. **The British Journal of Nutrition**, v.108, suppl 2, p.S1-S2, 2012.

MOURA, L.S.M. **Caracterização físico-química e reológica de farinhas mistas instantâneas de arroz, milho e feijão por extrusão termoplástica**. 123f. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

MUBARAK, A.E. Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. **Food Chemistry**, v.89, p.489-495, 2005.

MUNNÉ-BOSCH, S.; PEÑUELAS, J. Photo and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. grown under Mediterranean field conditions. **Annals of Botany**, v.92, p.385-391, 2003.

MURUGAN, N. et al. Virulence genome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* VRFPA10 recovered from patient with scleritis. **Genomics Data**, v.12, p.1-3, 2017.

MUZARD, J. et al. Probing the soybean Bowman-Birk inhibitor using recombinant antibody fragments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.6164-6172, 2012.

NAEEM, A. et al. Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.396, p.99-105, 2001.

NCCLS – National Committee For Clinical Laboratory Standards. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 7 ed. Villanova, PA: NCCLS, 2000.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298p.

NEURATH, H. Proteolytic processing and physiological regulation. **Trends in Biochemical Sciences**, v.14, p.268-271, 1989.

NICOLSON, G.L.; BLAUSTEIN, J.; ETZLER, M.E. Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. **Biochemistry**, v.13, p.196-204, 1974.

NIE, X. et al. Phenolics-protein interaction involved in silver carp myofibrillar protein films with hydrolysable and condensed tannins. **LWT – Food Science and Technology**, v.81, p.258-264, 2017.

NISHIDA, C.; UAUY, R. WHO Scientific Update on health consequences of trans fatty acids: introduction. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.63, p.1-4, 2009.

NOMURA, K. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. **Phytochemistry**, v.49, n.3, p.667-673, 1998.

NORIOKA, N. et al. Distribution of the kunitz and Bowman-Birk family proteinase inhibitor in leguminosae seeds. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.52, p.1245-1252, 1988.

NUNES, U.R. et al. Qualidade fisiológica de sementes de feijão em plantio direto sobre diferentes coberturas de plantas em Diamantina, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.6, p.1737-1743, 2007.

ODDEPALLY, R.; SRIRAM, G.; GURUPRASAD, L. Purification and characterization of a stable Kunitz trypsin inhibitor from *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds. **Phytochemistry**, v.96, p.26-36, 2013.

OKEZIE, B.O.; BELLO, A B. Physico chemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. **Journal of Food Science**, v.53, n.2, p.450-454, 1988.

OLIVA, M.L.V. et al. *Bauhinia bauhinoides* plasma kallikrein inhibitor interaction with synthetic peptides and fluorogenic peptide substrates related to the reactive site sequence. **Current Medicinal Chemistry Journal**, v.8, p.977-984, 2001.

_____. Kinetic characterization of factor Xa binding using a quenched fluorescent substrate based on the reactive site of factor Xa inhibitor from *Bauhinia unguolata* seeds. **Current Medicinal Chemistry Journal**, v.10, p.1085-1093, 2003.

_____. Structural and functional properties of Kunitz proteinase inhibitors from leguminosae: a mini review. **Current Protein and Peptide Science**, v.12, n.5, p.348-357, 2011.

OLIVEIRA, A.S. **Purificação e caracterização de inibidores de tripsina da família Kunitz de sementes de *Pithecellobium dumosum* e seus efeitos *in vitro* sobre insetos pragas**. 2007. 222f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

OLIVEIRA, G.P. **Maturação e qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)** 2012. 100f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2012.

ONYEYIRICHI, I. et al. Evaluation of haemagglutination potentials of lectin isolated from ordeal tree (*Erythrophleum Suaveolens*) stem bark. **International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy**, v.4, n.6, p.869-875, 2013.

OSBORNE, T.B. **The vegetable proteins**. 2nd. ed. London: Longmans Green and Company, 1924. 154p.

PARACCHINI, V. et al. Molecular characterization of an unauthorized genetically modified *Bacillus subtilis* production strain identified in a vitamin B2 feed additive. **Food Chemistry**, v.230, p.681-689, 2017.

PATIL, D.N. et al. Structural basis for dual inhibitory role of tam arind Kunitz inhibitor (TKI) against factor Xa and trypsin. **FEBS Journal**, v.279, p.4547-4564, 2012.

PELIKAN, W. The *Leguminosae*: nitrogen and the astral element in plants. **British Homoeopathic Journal**, v.68, n.2, p.93-101, 1979.

PEREIRA, E.J. **Estudo da composição em macronutrientes, retenção e bioacessibilidade de ferro e zinco em cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L Wap) em grãos crus e após o cozimento**. 2014. 115f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

PETCHIAMMAL, C.; HOPPER, W. Antioxidant activity of proteins from fifteen varieties of legume seeds commonly consumed in India. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, suppl.2, p. 476-479, 2014.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v.109, n.2, p.347-352, 1995.

_____. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.33, n.3, p.209-258, 1998.

PHILIPPSEN, A.F. **Caracterização fitoquímica e atividades biológicas de *Xylosma ciliatifolium* Clos (Eichler) Flacourtiaceae (Salicaceae sensu lato)**. 111f. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

PHILLIPS, R.D. Nutritional quality of cereal and legume storage proteins. **Food Technology**, v.51, n.5, p.62-66, 1997.

PIOVESAN, J.V. et al. Voltammetric determination of condensed tannins with a glassy carbon electrode chemically modified with gold nanoparticles stabilized in carboxymethylcellulose. **Sensors and Actuators**, v.240, p.838-847, 2017.

PIZZI, A. Tanin-Based adhesives. In: PIZZI, A. (Ed.). **Wood adhesives: chemistry and technology**. New York: M. Dekker, 1993. p.177-246.

PLHAK, L.C.; CALDWELL, K.B.; STANLEY, D.W. Comparison of methods used to characterize water imbibition in hard-to-cook beans. **Journal of Food Science**, v.54, n.3, p.326-336, 1989.

PODKOWIK, M. et al. Genotype and enterotoxigenicity of *Staphylococcus epidermidis* isolate from ready to eat meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v.229, p.52-59, 2016.

PORCH, T.G. et al., Nutritional composition and cooking characteristics of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* Gray) in comparison with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genetic Resources and Crop Evolution**, p.1-19, 2016.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal – Corumbá, Ms: Embrapa-Spi, 1994. 179p.

POURAKBARI, B. et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal colonization among patients and their parents /guardian in an Iranian referral hospital. **Microbial Pathogenesis**, v.107, p.75-80, 2017.

PRADO, D.E. Seasonally dry forests of tropical South America: from forgotten ecosystems to a new phytogeographic unit. **Edinburgh J. Bot**, v.57, n.3, p.437-461, 2000.

PRASAD, E.R.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Purification and characterization of a Bowman-Birk proteinase inhibitor from the seeds of black gram (*Vigna mungo*). **Phytochemistry**, v.71, p.363-372, 2010.

PRASANNA, V.; VENKATESH, Y. Onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) promotes Th-1-type response in murine lymphocytes. **Immunology**, v.143, p.124-125, 2014.

PRAXEDES, P.G. et al. A novel antifungal protein from seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). **Brazilian Journal of Biology**, v.71, n.3, p.687-692, 2011.

PÚBLIO-JÚNIOR, E. **Qualidade de sementes e características agronômicas de genótipos de feijão-caupi cultivados em Vitória da Conquista-BA**. 2014. 82f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2014.

QI, R.F; SONG, Z.W; CHI, C.W. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.37, p.283-292, 2005.

QUIOCHO, F.A. Carbohydrate-binding proteins. Tertiary structures and protein-sugar interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v.55, p.287-315, 1986.

RAFIQ, S. et al. Purification and partial characterization of a fructose-binding lectin from the leaves of *Euphorbia helioscopia*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.27, n.6, p.1805-1810, 2014.

RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A.K. et al. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. **Food Chemistry**, v.161, p.254-260, 2014.

RAMOS, V.O. **Isolamento de inibidores de tripsina de sementes de mamona e sua ação sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2012. 59f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

RAO, M.S. et al. *Bacillus subtilis* IHR BS-2 enriched vermicompost controls root knot nematode and soft rot disease complex in carrot. **Scientia Horticulturae**, v.218, p.56-62, 2017.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of Food Engineering**, v.49, p.311-319, 2001.

RAY, S. et al. Purification, characterization, and carbohydrate specificity of the lectin of *Ficus cunia*. **Carbohydrate Research**, v.242, p.247-63, 1992.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.9-10, p.1231-1237, 1999.

REID, J.S.G. Cell wall storage carbohydrates in seeds: biochemistry of the seeds gums and hemicelluloses. **Advances in Botanical Research**, v.11, p.125-155, 1985.

RIBEIRO, N.D. et al. Composição de aminoácidos de cultivares de feijão e aplicação para o melhoramento genético. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.10, p.1393-1399, 2007.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitor. In: Methods in plants biochemistry, **New York, Academic Press**, v.5, p.259-305, 1991.

RIOS, A.O.; ABREU, C.M.P.; CORREA, A.D. Efeito da estocagem e das condições de colheita sobre algumas propriedades físicas. Químicas e nutricionais de três cultivares de

feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23 (Supl), p.39-45, 2003.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIEM, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia**: biotecnologia. São Paulo: Premier, 1997. p.157-160.

ROMANO, C.M. **Características físico-químicas e de cocção do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cv. guapo brilhante decorrentes de secagem estacionária e de tempo de armazenamento convencional**. 98f. 2006. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

RÜDIGER, H. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica**, v.161, p.130–152, 1998.

RYAN, C.A. Protease inhibitor in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.425-449, 1990.

SÁ, R.A. et al. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *International biodeterioration & biodegradation*, v.62, n.4, p.460-464, 2008.

SANTANA, M.A. **Isolamento, propriedades bioquímicas e estudos biológicos da lectina de sementes da *Macrotyloma axillare* (E. Meyer)**. 118f. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2004.

SANTOS, A.F.S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v.39, p.975–980, 2005.

SANTOS, F. Produtividade de cultivares de feijão-caupi no Agreste Paraibano. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.7, n.4, p.31-36, 2013.

SANTOS, P.O. et al. *In vitro* evaluation of antifungal activity of soybean (*Glycine max*) seed coat proteins. **Journal of Stored Products Research**, v.44, p.310-315, 2008.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. cap. 2. p.29-43.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.4, p.275-280, 2004.

SARTORI, C.J. Avaliação dos teores de compostos fenólicos nas cascas de *Anadenanthera peregrina* (angico-vermelho). 2012. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SASAKI, M. **Lipídeos, carboidratos e proteínas de sementes de leguminosas do cerrado**. 75f. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SCHAICH, K.M.; TIAN, X.; XIE, J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. **Journal of Functional Foods**, v.18, p.782-796, 2015.

SCHRIRE, B.D. et al. Phylogeny of the tribe *Indigofereae* (*Leguminosae-Papilionoideae*): geographically structured more in succulent-rich and temperate settings than in grass-rich environments. **American Journal of Botany**, v.96, n.4, p.816-852, 2009.

SCHRIRE, B.D.; LEWIS, G.P.; LAVIN, M. **Biogeography of the Leguminosae**. In: Lewis, G. et al. (eds.). Legumes of the world. Richmond, U.K.: Royal Botanic Gardens, Kew. 2005. p.21–54.

SCOPES, R.K. **Protein purification: principles and practices**. 3rd. Ed. New York: Springer Verlag, 1994, p. 380. (Spring advanced texts in chemistry).

SECTAL, R.; SHATKOVSKY, P.; MILO-GOLDZWEIG, I. On the mechanism of Saponin Hemolysis-I hydrolysis of the glycosidic bond. **Biochemical Pharmacology**, v.23, p.973-981, 1974.

SESSA, D.J.; WOLF, W.J. Bowman-Birk inhibitors in soybean seed coats. **Industrial Crops and Products**, v.14, p.73-83, 2001.

SHAHDORDIZADEH, M. et al. Aptamer based biosensors for detection of *Staphylococcus aureus*. **Sensors and Actuators, Part B – Chemical**, v. 241, p.619-635, 2017.

SHARMA, B.L. et al. Studies on some primary metabolite's extraction and quantification in different plant parts of selected cassia species. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.6, Suppl.2, p.309-314, 2013.

_____. Physical characteristics and nutritional composition of some new soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. **Journal of Food Science and Technology**, v.51, n.3, p.551-557, 2014.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **Joural Biological Chemistry**, v.282, n.5, p.2753-2764, 2007.

SHIMBATA, T. et al. Effects of homoeologous wheat *Starch Synthase IIa* genes on starch properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.60, p.12004-12010, 2012.

SILVA, A.G.; ROCHA, L.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.4, p.591-598, 2009.

SILVA, A.L.J.; NEVES, J. Produção de feijão-caupi semi-prostrado em cultivos de sequeiro e irrigado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.6, p.29-36, 2011.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 2. ed. Viçosa: Impr. Univ. da UFV, 1990. 165p.

SILVA, F.O. **Atividade moduladora da lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis***. 2012. 110 f. Tese (Doutorado em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

SILVA, J.G.; AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J. Colheita direta do feijoeiro com colhedora automotriz, p.11-14. In: COBUCCI, T. (Org.) **Avanços tecnológicos com a cultura do feijoeiro comum no sistema de plantio direto**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 36p.

SILVA, K.B. **Características químicas, físicas e biológicas de solos sob *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.** 124f. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SILVA, M.B.O. et al. Technological quality of grains of common beans selected genotypes from the carioca group. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.4, p.1721-1732, 2016.

SILVA, M.C. et al. Extraction of the lectin of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) and the effect of divalent cations on the hemagglutinating activity. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.103-107, 2010.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.

SINGH, J. et al. Purification and characterization of a tuber lectin from *Alocasia indica*. **Phytochemistry**, v.33, n.5, p.979-983, 1993.

SITOHY, M.; OSMAN, A. Antimicrobial activity of native and esterified legume proteins against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Food Chemistry**, v.120, p.66-73, 2010.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 5th ed. Thomson: Belmont, 2004.

SMITH, D. et al. Unexpected activity of a novel Kunitz-type inhibitor: inhibition of cysteine. **The Journal of Biological Chemistry**, v.291, n.37, p.19220-19234, 2016.

SOARES, G.S.F. et al. purification and biological activities of *Abelmoschus esculentus* seed lectin. *Protein Journal*, v.31, p.674-680, 2012.

SOUTHGATE, B.J. Biology of the *Bruchidae*. **Annual Review of Entomology**, v.24, p.449-473, 1979.

SOUZA, E.L. et al. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v.18, n.5, p.409-413, 2007.

SOUZA, J.D. et al. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.65, n.5, p.696-702, 2011.

SOUZA, V.C. Avaliação populacional de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Fabaceae Lindl.), nas margens do rio Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.6, n.2, p.314-320, 2011.

- SPEHN, E.M. et al. The role of legumes as a component of biodiversity in a cross-European study of grassland biomass nitrogen. **Oikos**, v.98, p.205-218, 2002.
- SRINIVASAN, D. et al. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.217-220, 2001.
- SRIVASTAVA, K. et al. Brassinosteroids stimulate seed germination parameters and chlorophyll content in moong bean. **Indian Journal of Scientific Research**, v.2, n.3, p.89-92, 2011.
- STANIMIROVA et al. Surface rheology of saponin adsorption layers. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v.27, n.20, p.12486-12498, 2011.
- SUMNER, J.B.; HOWELL, S.F. Identification of hemagglutinin of jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v.32, n.2, p.227-237, 1936.
- SYED, K.R.; REZA, M.A. Antibacterial activity of *Kaempferia rotunda* rhizome lectin and its induction of apoptosis in Ehrlich Ascites carcinoma cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, n.6, p.2866-2876, 2014.
- TAJNE, S. et al. Synthetic fusion-protein containing domains of BtCry1Ac and *Allium sativum* lectin (ASAL) conferred enhanced insecticidal activity against major lepidopteran pests. **Journal of Biotechnology**, v.171, p.71-75, 2014.
- TAN, N. et al. Influence of culture conditions for clinically isolated non-*albicans* *Candida* biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v.130, p.123-128, 2016.
- TEILLET, F. et al. Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents. **Medicinal Research Reviews**, v.28, p.715-745, 2008.
- THAPALIYA, D. et al. Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in commercially available meat over a one-year period in Iowa, USA. **Food Microbiology**, v.65, p.122-129, 2017.
- THARANATHAN, R.N.; MAHADEVAMMA, S.A. Review: grain legumes a boon to human nutrition. **Food Science and Technology**, v.14, p.507-518, 2003.
- TING, A.S.Y.; MAHA, S.W.; TEE, C.S. Evaluating the feasibility of induced host resistance by endophytic isolate *Penicillium citrinum* BTF08 as a control mechanism for *Fusarium* wilt in banana plantlets. **Biological Control**, v.61, p.155-159, 2012.
- TONG, Y.; TANG, J. *Candida albicans* infection and intestinal immunity. **Microbiological Research**, v.198, p.27-35, 2017.
- TONINI, P.P. **Conexão entre os processos de degradação das reservas de proteínas e o efeito dos hormônios e açúcares em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. 188f. 2008.** Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

TONINI, P.P.; PURGATTO, E.; BUCKERIDGE, M.S. Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Leguminosae). **Annals of Botany**, v.106, p.607-616, 2010.

TORRES, J. Characterization of the nutritive value of tropical legume grains as alternative ingredients for small-scale pork producers using in vitro enzymatic hydrolysis and fermentation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.97, p.1066-1074, 2013.

TORRES, L.L.G. et al. Efeito da umidade e da temperatura no processamento de farinha de banana verde (*Musa acuminata*, Grupo AAA) por extrusão termoplástica. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.273-290, 2005.

TRAMONTE, K.C. et al. Juice from king palm (*Archontophoenix alexandrae*) leaf sheathes: chemical characterization and use in soft drink formulation. **International Journal of Food Science and Technology**, v.46, p.1871-1877, 2011.

TREMOCOLDI, M.A. **Caracterização, isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de abacates das cultivares Hass e Fuerte**. 113f. 2015. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

TRINDADE, M.B. et al. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1764, p.146-152, 2006.

VALSARAJ, R. et al. Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.58, p.75-83, 1997.

VAN MEER, G.; VOELKER, D.R.; FEIGENSON, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Review: Molecular Biology**, v.9, p.112-124, 2008.

VASCONCELOS, A.B. **Purificação e caracterização parcial de inibidores de serino protease e sua influência sobre a viabilidade espermática eqüina nos processos de resfriamento e congelamento**. 2008. 106f. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

VEASEY, E.A. et al. Early growth and native nodulation of leguminous shrub and tree species in Brazil. **Tropical Grasslands**, v.31, p.40-48, 1997.
_____. Morphological and agronomical characterization and estimates of genetic parameters of *Sesbania Scop.* (Leguminosae) accessions. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, p.81-93, 1999.

VEGA-GÁLVEZ, A. et al. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, p.2541-2547, 2010.

VIEIRA, R.F. et al. Comportamento do feijão do tipo Jalo em Minas Gerais. **Revistas Ceres**, v.49, n.286, p.603-612, 2002.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B. **Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação**. São Paulo: Varela, 2006. 120p.

WALSH, G. **Proteins: biochemistry and biotechnology**. 2. ed. United States of America: John Wiley & Sons, 2014. 447p.

WANG, B. et al. Effects of nitrogen metabolism on growth and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. **Journal of Hazardous Materials**, v.324, p.691-700, 2017.

WANG, H.; NG, T.B. A lectin with some unique characteristics from the *Samta tomato*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p.181-185, 2006.

WANG, W.; BOSTIC, T.R.; GU, L. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. **Food Chemistry**, v.122, n.4, p.1193-1198, 2010.

WANG, Y.J. et al. Amylopectin and intermediate materials in starches from mutant genotypes of the inbred line. **Cereal Chemistry**, v.70, n.5, p. 521-525, 1993.

WATI, R.K. et al. Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds. **Process Biochemistry**, v.44, n.12, p.1307-1314, 2009.

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

WROLSTAD, R.E.; DURST, R.W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p.423-428, 2005.

WU, G. Dietary protein intake and human health. **Food & Function**, v.7, p.1251-1265, 2016.

WU, Y-Z. et al. Neuroprotective metabolites from the endophytic fungus *Penicillium citrinum* of the mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. **Phytochemistry Letters**, v.12, p.148-152, 2015.

XAVIER-FILHO, J et al. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.37, n.4, p.1139-1143, 1989.

YAHARA, T. et al. Global legume diversity assessment: concepts, key indicators, and strategies. **Taxon**, v.62, n.2, p.249-266, 2013.

YANG, H. et al. A new parameter to simultaneously assess antioxidant activity for multiple phenolic compounds present in food products. **Food Chemistry**, v.229, p.215-222, 2017.

YUE, H. et al. Label-free electrochemiluminescent biosensor for rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* using phage as highly specific recognition agent. **Biosensors and Bioelectronics**, v.94, p.429-432, 2017.

ZAPPI, D.C. et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v.66, n.4, p.1085-1113, 2015.

ZEEMAN, S.C.; KOSSMANN, J.; SMITH, A.M. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, p.209-234, 2010.

ZENG, M. et al. Sources of variation for starch gelatinization, pasting, and gelation properties in wheat. **Cereal Chemistry**, v.74, p.63-71, 1997.

ZHAO, Y. et al. *In vitro* antioxidant activity of extracts from common legumes. **Food Chemistry**, v.152, p.462-466, 2014.

ZHOU, X. et al. Assessment of leaf carotenoids content with a new carotenoid index: Development and validation on experimental and model data. **International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation**, v.57, p.24-35, 2017.

ZIDA, A. et al. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: a review. **Journal of Medical Mycology**, v.27, p.1-19, 2017.

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação pelo CEUA/UFPB para realização dos experimentos envolvendo hemácias de coelho



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Isolamento, caracterização bioquímica e atividades biológicas de lectinas de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Poir”,** protocolo nº **178/2015** sob a responsabilidade do pesquisador Dr. **Carlos Alberto de Almeida Gadelha** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2015 a 2017
Espécie/linhagem	Coelho albino (<i>Oryctolagus cuniculu</i>)
Número de animais	3 animais
Idade/peso	3 meses (5 Kg)
Sexo	Macho
Origem	Biotério Prof. Thomas George


Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB

Prof. Dra. Islania G.A. Gonçalves
Coordenadora CEUA/UFPB
SIAPE 336301