

**TOXINA DA SALSA (*Ipomoea asarifolia* R. et Schult.):
ASPECTOS BIOQUÍMICOS, ESTRUTURAIIS, FUNCIONAIS E
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

LÚCIA DE FÁTIMA LOPES DOS SANTOS

FORTALEZA-CEARÁ

2001

**TOXINA DA SALSA (*Ipomoea asarifolia* R. et Schult.):
ASPECTOS BIOQUÍMICOS, ESTRUTURAIS, FUNCIONAIS E
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

LÚCIA DE FÁTIMA LOPES DOS SANTOS

**TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA-CE

OUTUBRO/2001

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas de ética científica.

LÚCIA DE FÁTIMA LOPES DOS SANTOS

TESE APROVADA EM:

Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos
(Orientadora)

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Depto Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
Depto Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles
Depto de Medicina Veterinária
Universidade Estadual do Ceará

Dr. Genário Sobreira Santiago
Depto de Medicina Veterinária
Universidade Estadual do Ceará

A **Deus**,

Aos meus pais, **Batista e Valdenôra**,
que mesmo não estando mais
presentes entre nós, estarão sempre
em meu coração;

Às minhas irmãs, **Graça, Cláudia,
Carla e Antonieta**.

Dedico

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará uma máquina utilizável, mas não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente ético”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

MUITO OBRIGADA:

Profa. Dra. **Ilka Maria Vasconcelos**, pela sua incansável e criteriosa orientação, por sua paciência e incentivo nos momentos difíceis, por ter dedicado seu tempo e sua experiência para que durante este período fosse também um aprendizado de vida, minha eterna gratidão.

Prof. Dr. **José Tadeu Abreu de Oliveira**, exemplo de competência e seriedade, por suas valiosas sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Prof. Dr. **Benildo Sousa Cavada**, pelo incentivo, amizade, apoio e sugestões pertinentes apresentadas na elaboração deste trabalho.

Prof. Dr. **Manassés Claudino Fonteles**, pela sua disponibilidade em aceitar para participar da avaliação deste trabalho e por sua visão científica privilegiada em apoiar a pesquisa, valorizando a capacitação dos docentes da UECE.

Prof. Dr. **Genário Sobreira Santiago**, pela sua disponibilidade e sugestões na redação final deste trabalho.

De forma especial, aos pesquisadores citados a seguir, pela expressiva ajuda e dedicação de parte de seu tempo para elaboração, execução e discussão de alguns experimentos realizados nesta Tese. Dr. **Vicente de Paulo Teixeira Pinto** (Composição de Aminoácidos; determinação e análise de carboidratos); Dr. **Márcio Viana Ramos** (BIAcore); Dr. **Thalles Barbosa Granjeiro** e **Éder Almeida** (Atividade inseticida); Dra. **Olga Machado Tavares** (Sequência NH₂-terminal); Dra. **Ana de Fátima Fontenele Urano de Carvalho** (Intubação orogástrica) e Dra. **Diana Magalhães** (Análises histopatológicas).

Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela cooperação na realização deste trabalho, permitindo o livre acesso a seus laboratórios, em especial Prof. **Ana Lúcia Ponte Freitas** e **Norma Maria Barros Benevides**, pelo carinho que sempre mostraram por mim e conhecimentos transmitidos durante todo o curso.

Companheiros do Departamento de Medicina Veterinária, particularmente Prof. **Pedro Jorge Albano** (Chefe do Departamento) e Profa. **Josefa Lineuda Murta**, pela confiança e compreensão demonstradas.

Amigos do Laboratório de Toxinas Vegetais, em especial **Cláudio Cabral**, pela sua valiosa amizade, contribuição e dedicação na revisão deste trabalho. Demais integrantes, **Claudeane, Daniele, Elisângela, Fernanda, Isabel, Janne Keila, Ricristhi** e **Silvinha** pela colaboração, companheirismo e saudável convivência.

Amigos do Laboratório de Proteínas de Defesa, em especial a amiga **Gina Capistrano**, por sua amizade e dedicação na elaboração final deste trabalho. Demais componentes, **Ana Lúcia, Antoniella, Cléber, Djane, Fábio, Neilza, Simone, Waneska** e **Vânia**, pelo companheirismo e amizade.

Todos os bolsistas de Iniciação Científica, Mestrandos e Doutorandos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que amigos e prestativos contribuíram para o bom desenvolvimento deste trabalho.

Funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela amizade e os bons serviços prestados.

Meus Pais, que me deram a vida e ensinaram a vivê-la com dignidade; que se doaram por inteiro e, muitas vezes, renunciaram a seus sonhos para que pudessem realizar os meus. **As minhas irmãs**, que abriram mão de momentos de convívio, pela cumplicidade e eterno companheirismo.

Minha família, ***Dira Lopes, Valda Lopes, Aurélio Monteiro, Claristéia Andrade, Valdelúcia Lopes***, e amigos ***Piedade Carvalho, Tatiana Cysne e Joélia Carlota Amorim***, pela presença constante, verdadeira amizade e incentivo contínuo.

Deus, por conduzir na minha trajetória de vida.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) pela bolsa de pós-graduação concedida à autora desta tese.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por concessão de auxílio à pesquisa através do Projeto de Pesquisa: “Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Insetos: Uma Abordagem Entomológica e Molecular” (FINEP/PRONEX, Convênio nº 76.97.10.70.00).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por concessão de auxílio à pesquisa através do Projeto de Pesquisa: “Proteínas de Sementes: Aspectos Estruturais, Funcionais e Potencial Biotecnológico” (PROCAD, Convênio nº 0015/01-6).

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios foram desenvolvidos os experimentos necessários à realização deste trabalho.

Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, pela liberação concedida.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	xi
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xiii
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xiv
<u>RESUMO</u>	xv
<u>ABSTRACT</u>	xvii
1 – <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1 – <u>Plantas Tóxicas – Considerações Gerais</u>	2
1.2 – <u>Natureza Química dos Princípios Tóxicos</u>	8
1.3 – <u>Lectinas Vegetais - Uma Visão Geral</u>	9
1.3.1 – História	9
1.3.2 – Definições	11
1.3.3 – Ocorrência, Localização e Classificação	12
1.3.4 – Funções Extrínsecas	15
1.3.5 – Lectinas de Convolvulaceae	18
1.4 – <u>Gênero Ipomoea</u>	20
1.4.1 – <i>Ipomoea asarifolia</i>	22
2 – <u>OBJETIVOS</u>	26
2.1 – <u>Gerais</u>	27
2.2 – <u>Específicos</u>	27
3 – <u>MATERIAIS</u>	28
3.1 – <u>Material Vegetal</u>	29
3.2 – <u>Animais de Experimentação</u>	29

3.3 – <u>Hemácias</u>	29
3.4 – <u>Reagentes Químicos</u>	30
4 – <u>MÉTODOS</u>	31
4.1 – <u>Tratamento e Maceração das Folhas</u>	32
4.2 – <u>Composição Centesimal</u>	32
4.2.1 – Determinação de Umidade	32
4.2.2 – Determinação de Cinza	34
4.2.3 – Determinação da Proteína Total	34
4.2.4 – Determinação de Lipídio Total	35
4.2.5 – Determinação da Fibra Bruta	35
4.3 – <u>Composição em Aminoácidos</u>	36
4.4 – <u>Natureza Química do(s) Componente(s) Tóxico(s)</u>	37
4.4.1 – Extração de Proteínas	37
4.4.2 – Testes de Estabilidade do Princípio Tóxico	39
4.4.3 – Dosagem de Proteínas	39
4.5 – <u>Deteccção e Quantificação de Componentes Protéicos Bioativos</u>	39
4.5.1 – Lectina	39
4.5.2 – Toxina	41
4.5.3 – Inibidor de Tripsina	41
4.5.4 – Urease	42
4.6 – <u>Purificação da Toxina de Salsa</u>	43
4.6.1 – Fracionamento de Proteínas do Extrato Bruto com Sulfato de Amônio	43
4.6.2 – Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose	43
4.6.3 – Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sepharose 4B-Fetuína	45
4.7 – <u>Caracterização Físico-Química e Estrutural da Toxina de Salsa</u>	46
4.7.1 – Determinação da Massa Molecular por PAGE-SDS	46

4.7.2 – Determinação da Massa Molecular por Filtração em Gel	47
4.7.3 – Determinação da Massa Molecular por Espectrometria de Massa	47
4.7.4 – Determinação do Ponto Isoelétrico	48
4.7.5 – Análise da Composição de aminoácidos	48
4.7.6 – Determinação da Seqüência de Aminoácidos NH ₂ -Terminal	49
4.7.7 – Determinação do Espectro de Absorção	49
4.7.8 – Estabilidade Térmica	50
4.7.9 – Determinação da Especificidade da Lectina	51
4.7.10 – Análise de Carboidratos por Cromatografia de Fase Reversa em HPLC	51
4.7.11 – Cinética da Interação da Proteína Tóxica com Glicoproteínas Medida em Tempo Real por Ressonância Plasmônica de Superfície (BIAcore)	52
4.8 – <u>Atividades Biológicas da Toxina de Salsa</u>	53
4.8.1 – Avaliação dos Efeitos da F _{0-30%} , Rica em Toxina, quando Administrada por Via Oral	53
4.8.2 – Avaliação da Atividade Inseticida da F _{0-30%} , Rica em Toxina	56
4.10 – <u>Análise Estatística</u>	59
5 – <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	60
5.1 – <u>Composição Centesimal</u>	61
5.2 – <u>Composição em Aminoácidos</u>	63
5.3 – <u>Natureza Química do(s) Componente(s) Tóxico(s)</u>	65
5.4 – <u>Deteccção e Quantificação de Componentes Protéicos Bioativos</u>	66
5.4.1 – Lectina	66
5.4.2 – Toxina	69
5.4.3 – Inibidor de Tripsina	70
5.4.4 – Urease	71

5.5 – <u>Purificação da Toxina de Salsa</u>	71
5.5.1 – Fracionamento de Proteínas do Extrato Bruto com Sulfato de Amônio	72
5.5.2 – Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose	72
5.5.3 – Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sepharose 4B-Fetuína	75
5.6 – <u>Caracterização Físico-Química e Estrutural da Lectina Tóxica da Salsa</u>	79
5.6.1 – Massa Molecular	79
5.6.2 – Ponto Isoelétrico	85
5.6.3 – Composição em Aminoácidos	85
5.6.4 – Seqüência de Aminoácidos NH ₂ -terminal	87
5.6.5 – Espectro de Absorção	87
5.6.6 – Estabilidade Térmica	87
5.6.7 – Especificidade	90
5.6.8 – Teor de Carboidratos	94
5.6.9 – Análise de Carboidratos por Cromatografia de Fase Reversa em HPLC	95
5.6.10 – Cinética da Interação da Lectina Tóxica da Salsa com Glicoproteínas	95
5.7 – <u>Avaliação dos Efeitos da F_{0-30%}, Rica em LTS, quando Administrada por Via Oral</u>	97
5.8 – <u>Avaliação da Atividade Inseticida da F_{0-30%}, Rica em LTS</u>	109
6 – <u>CONCLUSÕES</u>	114
7 – <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	116
8 – <u>ANEXO</u>	135

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 - Modelo hipotético da evolução molecular das lectinas relacionadas a jacalina	21
2 - <i>Ipomoea asarifolia</i> (salsa)	23
3 - Distribuição de <i>Ipomoea asarifolia</i> no Brasil	24
4 - Tratamento e maceração das folhas de salsa	33
5 - Esquema de preparação do extrato bruto	38
6 - Fracionamento do extrato bruto com sulfato de amônio	44
7 - Avaliação da toxicidade oral da F _{0-30%} para camundongos	55
8 - Avaliação da atividade inseticida da F _{0-30%} para <i>Callosobruchus maculatus</i>	57
9 - Convulsão e morte de camundongos causada pela toxina da salsa	67
10 - Esquema de purificação da toxina da salsa	73
11 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose	74
12 - Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-Fetuína	76
13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS e β -mercaptoetanol)	80
14 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100 da lectina tóxica da salsa	82
15 - Espectrometria de massa da lectina tóxica da salsa	83
16 - Espectro de absorção da lectina tóxica da salsa	88
17 - Atividade hemaglutinante residual da lectina tóxica da salsa submetida a diferentes temperaturas e intervalos de tempo	89
18 - Curvas de crescimento dos camundongos lactantes intubados orogastricamente	99

19 -	Fotomicrografia de corte histológico do fígado da prole cuja mãe lactante foi intubada com NaCl 150 mM (Grupo controle)	102
20 -	Fotomicrografia de corte histológico do fígado da prole cuja mãe lactante foi intubada com F _{0-30%} (Grupo experimental)	103
21 -	Fotomicrografia de corte histológico do fígado da prole cuja mãe lactante foi intubada com F _{0-30%} (Grupo experimental)	104
22 -	Fotomicrografia de corte histológico do fígado da prole cuja mãe lactante foi intubada com F _{0-30%} (Grupo experimental)	105
23 -	Fotomicrografia de corte histológico do rim da prole cuja mãe lactante foi intubada com NaCl 150 mM (Grupo controle)	106
24 -	Fotomicrografia de corte histológico do rim da prole cuja mãe lactante foi intubada com F _{0-30%} (Grupo experimental)	107
25 -	Efeito do extrato bruto e da F _{0-30%} obtidos de folhas de salsa sobre a emergência de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i>	110
26 -	Efeito do extrato bruto e F _{0-30%} obtidos de folhas de salsa sobre o tempo médio de desenvolvimento de <i>Callosobruchus maculatus</i>	111
27 -	Efeito do extrato bruto e da F _{0-30%} obtidos de folhas de salsa sobre o peso médio de <i>Callosobruchus maculatus</i>	112

LISTA DE TABELAS

	Página
1 - Espécies, tecidos-alvos e princípios tóxicos de algumas plantas tóxicas da Região Nordeste	7
2 - Lectinas purificadas de folhas	14
3 - Composição química de folhas de salsa	62
4 - Composição em aminoácidos da farinha de folhas de salsa e do ovo de galinha (padrão)	64
5 - Componentes protéicos bioativos em extrato de folhas de salsa	68
6 - Purificação da lectina tóxica da salsa	78
7 - Massas moleculares da lectina tóxica da salsa por diferentes técnicas	84
8 - Composição em aminoácidos da lectina tóxica da salsa	86
9 - Atividade hemaglutinante ^a da lectina tóxica da salsa frente a suspensões (2%) de eritrócitos de diferentes espécies, tratados com tripsina	91
10 - Inibição da atividade aglutinante de eritrócitos de coelho, promovida pela lectina tóxica da salsa, por mono-, oligossacarídeos e glicoproteínas	92
11 - Composição de carboidratos da lectina tóxica da salsa	96
12 - Peso corpóreo obtido pela intubação orogástrica de fêmeas lactantes	98
13 - Peso corpóreo da prole de fêmeas lactantes intubadas orogastricamente	101

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

BAPNA	N- α -L-Benzoil-Arginina- <i>p</i> -Nitroanilida
DL ₅₀	Dose mínima capaz de matar 50% dos animais
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HBS	HEPES 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 3,4 mM; solução surfactante P20 0,005% v/v
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PVP	Polivinilpolipirrolidona
SBTI	Inibidor de tripsina de soja
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	N,N,N',N', tetrametiletenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) – aminometano

RESUMO

Ipomoea asarifolia (salsa) é uma espécie pertencente à família Convolvulaceae largamente distribuída no Nordeste do Brasil, representando uma fonte alternativa de alimento para os ruminantes, principalmente no período da seca. Todavia, alguns sintomas tóxicos foram observados em cabras após o consumo de folhas de salsa. Na busca da substância responsável pelos efeitos adversos, uma proteína com atividades tóxica e hemaglutinante foi purificada. Folhas recém coletadas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido, sendo a farinha obtida extraída com Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM e PVP 3% (w/v), por 2 h sob agitação, a 4 °C. A suspensão foi filtrada em pano de trama fina e centrifugada a 10.000 x g, por 30 min, a 4 °C. A lectina tóxica da salsa, denominada LTS, foi purificada do extrato bruto por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografias de troca iônica (DEAE-celulose) e de afinidade (Sephrose 4B-fetuína). A massa molecular aparente determinada por filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 foi 40,5 kDa, enquanto por PAGE-SDS a massa encontrada foi 44,0 kDa. Análise por espectroscopia de massa resolveu a LTS em dois picos, de 38,5 kDa e 19,3 kDa. LTS se mostrou como uma glicoproteína (4,4% carboidratos) composta de manose (29,2%), fucose (27,0%), N-acetil-D-glucosamina (23,6%) e xilose (20,2%). A composição de aminoácidos revelou ser a LTS uma proteína rica em Asp/Asn e Glu/Gln. O pI dessa proteína foi 5,7 e a seqüência NH₂-terminal encontrada foi NGXIATLSLIPY. A lectina tóxica foi relativamente termoestável, necessitando de uma energia livre em torno de 93,36 kJ/mol para iniciar o processo de desnaturação. O espectro de absorção mostrou uma leitura máxima em 280 nm, com coeficiente de extinção ($\epsilon^{1\%}_{1\text{ cm}}$) de 4,8. A lectina se mostrou uma potente aglutinina para eritrócitos de coelho, reagindo com células vermelhas de cavalo e ovelha, mas foi inativa frente a eritrócitos de boi, carneiro, cabra, cachorro e do homem. A aglutinação de eritrócitos de coelho foi inibida por fetuína (39,1 µg/ml), avidina (312,5 µg/ml) e ácido N-acetil-D-neuramínico (965,6 µg/ml). Essa lectina foi altamente tóxica para camundongos por via intravenosa (DL₅₀ 0,22 mgP/kg de peso corpóreo)

produzindo dispnéia, convulsões tônico-clônicas e paralisia flácida, precedendo a morte dos animais, sendo essa atividade dependente de grupos sulfidrila livres.

Experimentos nutricionais conduzidos em camundongo fêmeas intubadas com a fração (F_{0-30%}), obtida por fracionamento do extrato bruto com 0-30% de sulfato de amônio sólido, que é rica em LTS, induziu um retardamento no crescimento dos animais quando comparados com aqueles intubados com NaCl 150 mM (controle). Os filhotes lactentes foram similarmente afetados pelo consumo do leite, que aparentemente veicula o princípio tóxico.

A F_{0-30%} teve ação inseticida contra larvas do gorgulho (*Callosobruchus maculatus*), que ataca o feijão-de-corda ou caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], particularmente quando armazenado. Este resultado sugere para a LTS um papel fisiológico de defesa.

ABSTRACT

Ipomoea asarifolia (salsa) is a member of the family Convolvulaceae with wide distribution throughout Northern Brazil and represents an alternative food for ruminant animals during drought periods. However some toxic symptoms have been observed in goats after feeding the leaves of this plant. In a search for a substance that could be responsible for these adverse effects we have purified a toxic and hemagglutinating protein from salsa. Fresh leaves were ground to a fine powder in liquid nitrogen, extracted by treatment with 25 mM Tris HCl, pH 7.5, containing 5 mM DTT and 3% PVP (1:3, w/v) and stirred for 2 h, at 4 °C. The suspension was filtered through a nylon cloth and then centrifuged at 10,000 x g, for 30 min, at 4 °C. The toxic lectin, named LTS, was purified from the crude extract by ammonium sulfate fractionation, ion exchange (DEAE-cellulose) and affinity (fetuin Sepharose-4B) chromatographies. The apparent molecular mass determined by gel filtration in Sephadex G-100, at pH 7.5, was 40.5 kDa, whereas by SDS-PAGE it was 44.0 kDa. Mass spectroscopy analysis resolved LTS in two peaks of 38.5 kDa and 19.3 kDa. LTS is a glycoprotein (4.4% carbohydrates) composed of mannose (29.2%), fucose (27.0%), N-acetyl-D-glucosamine (23.6%), and xylose (20.2%). The amino acid composition revealed to be LTS rich in Asp/Asn and Glu/Gln. The pI found for LTS was 5.7, and NGXIATLSLIPY was its NH₂-terminal sequence. The toxic lectin was relatively heat stable, requiring about 93.36 kJ/mol of free energy for initiation of the denaturing process. The absorption spectrum showed maximum at 280 nm, with $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%}$ of 4.8. The lectin was a potent agglutinin for rabbit erythrocytes, reacted against horse and ovine red cells, but it was inactive against cow, sheep, goat, dog, and human erythrocytes. Hemagglutination of rabbit erythrocytes was inhibited by fetuin (39.1 µg/ml), avidin (312.5 µg/ml), and N-acetyl-D-neuraminic acid (965.6 µg/ml). This lectin was also highly toxic to mice upon intravenous injection (LD₅₀ 0.22 mgP/kg body weight) producing dyspnoea, tonic-clonic convulsions and flaccid paralysis prior to death, being this toxic activity dependent on free sulfydryl groups.

The feeding trials conducted with female mice intubated with the fraction (F_{0-30%}) obtained by fractionation of the leaf crude extract with 0-30% solid

ammonium sulfate, which is LTS rich, induced stunted growth of the animals compared to those intubated with 150 mM NaCl (control). The litter was similarly affected by drinking the milk, which apparently carries the toxic principle.

The F_{0-30%} had insecticidal action against the larvae of the bruchid beetle (*Callosobruchus maculatus*), which spoiled the storage cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], suggesting a defensive physiological role for LTS.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Plantas Tóxicas – Considerações Gerais

A história da toxicidade de certas plantas é conhecida há bastante tempo. Uma das primeiras publicações na área foi a tese de doutoramento de Georg Friedrich, “Experimenta Quaedam Pharmacologica de Oleis Ricini, Crotonis et *Euphorbie lathyrides*” sobre a toxicidade de óleos de *Ricinus communis*, *Croton tiglium* e *Euphorbia lathyrides* (KRICH, 1857). Poucos anos depois, foi relatado o isolamento de uma fração obtida por aquecimento e precipitação alcoólica de um extrato aquoso de *Ricinus communis*, porém esse material não apresentou toxicidade. Esse problema foi superado quando Emil Werner fez extração a frio, obtendo uma fração ativa. Porém, após ser injetada no mesmo animal várias vezes, essa fração perdia a toxicidade (WERNER, 1870). Mesmo não tendo atentado para o fato, Werner foi o primeiro a detectar imunização de um animal contra uma proteína.

Assim como o *Ricinus communis*, conhece-se hoje um grande número de espécies vegetais portadoras de princípios tóxicos (CARLINI & GUIMARÃES, 1991; VASCONCELOS *et al.*, 1994; SIEBRA, 1998). Plantas tóxicas são consideradas aquelas que prejudicam a saúde dos animais, podendo até mesmo causar a morte pela ingestão. Tendo em vista a disseminação de toxicidade nos vegetais, torna-se difícil definir o impacto econômico causado por tais plantas e quase impossível estabelecer as perdas monetárias, diretas e indiretas, provocadas por elas (MELO & OLIVEIRA, 2000). As perdas diretas incluem: 1) morte dos animais; 2) problemas reprodutivos (abortos, defeitos congênitos e distúrbios hormonais), com conseqüente aumento do intervalo entre partos, retenção de placenta e infertilidade e 3) perda de eficiência nos tecidos corporais (por exemplo, lesão do fígado). Já as perdas indiretas envolvem: 1) atraso no crescimento dos animais; 2) diminuição da resposta imunológica e 3) doenças subclínicas.

Considerando-se diretamente apenas a morte dos animais, os criadores norte-americanos calculam que os prejuízos econômicos nos rebanhos bovino e

ovino chegam a US\$ 339 milhões por ano (NIELSON & JAMES, 1990), valores esses computados em apenas 17 estados. No Brasil, admite-se que pelo menos cem mil bovinos morrem anualmente em decorrência do consumo de *Palicourea marcgarii* conhecida como erva de rato (TOKARNIA *et al.*, 1979). A Região Norte do Brasil sofre os maiores prejuízos em função da intoxicação por plantas. Nas Regiões Centro-Oeste e Nordeste, as plantas tóxicas também causam prejuízos consideráveis, em virtude da existência de várias espécies de plantas tóxicas bem difundidas.

Para provocarem efeitos nocivos, as plantas tóxicas têm de ser ingeridas em certas quantidades, relacionadas com o peso do animal, que são expressas em g/kg, ou em percentagem da planta, em relação ao peso animal. A maioria das plantas tóxicas brasileiras causa intoxicação quando ingerida uma única vez, enquanto outras somente se houver ingestão por dias seguidos. Em função da evolução do quadro clínico-patológico, podemos ter uma intoxicação aguda (superaguda, aguda e subaguda) ou crônica (TOKARNIA *et al.*, 2000).

O comportamento tóxico das plantas é bastante complexo, pois há vários fatores que influenciam na relação planta x animal x toxicidade. A seguir, será feita uma breve descrição sobre os fatores que estão ligados à planta ou ao animal. (MELO & OLIVEIRA, 2000; TOKARNIA *et al.* 1979, 2000).

Fatores ligados à planta

- Solo/clima. Fatores climáticos e de solo influenciam a distribuição das plantas no habitat e interferem na sua fisiologia. As características do solo influenciam na composição e na quantidade do princípio tóxico da planta. Esses aspectos também estão relacionados com o índice pluviométrico e a luminosidade da região, ou seja, com a variação climática.
- Estádio vegetativo da planta. Muitas plantas apresentam uma toxicidade maior quando estão brotando, como é o caso da *Mascagnia rígida*

(salsa-rosa, tingui) ou quando estão frutificando, como é o caso da *Palicourea marcgravii* (erva de rato). No entanto, outras espécies são mais tóxicas quando maduras, como verificado com *Baccharis coridifolia* (mio-mio).

- Parte da planta. Algumas plantas apresentam o princípio tóxico distribuído de forma generalizada. Porém, em geral, os componentes tóxicos predominam nas sementes.
- Armazenamento. A forma de armazenamento pode ter influência na conservação da toxidez. Por exemplo, *P. marcgravii*, quando guardada em sacos de pano, perde aos poucos a toxidez, porém, se conservada em vidros hermeticamente fechados, a conserva durante anos. Também, há relatos que algumas plantas perdem a toxidez pelo processo de dessecação.

Fatores ligados ao animal

- Espécie animal. Algumas plantas são tóxicas para determinadas espécies e não tóxicas para outras, como é o caso de *Cestrum axillare* (coerana), tóxica para ruminantes, mas não para eqüinos.
- Idade. Apesar de ser um fator de pouca importância, há espécies que parecem ser mais tóxicas para uma determinada idade. Exemplo é *Solanum malacoxylon* (espichadeira), que apresenta uma maior toxicidade para bovinos adultos.
- Pigmentação. Animais despigmentados são mais sensíveis a plantas que causam fotossensibilização.

- Exercício. É um fator importante em relação às plantas com princípios tóxicos que interferem no funcionamento do coração e/ou sistema nervoso central, especialmente quando se refere às plantas que causam “morte súbita”. Dependendo da quantidade de planta ingerida, o exercício pode ser o fator decisivo para levar o animal à morte.
- Ingestão de água. Muito se fala sobre a importância da ingestão da água como fator determinante na morte do animal, após este ingerir uma planta tóxica. Em teoria, isto poderia ter importância para as plantas cujo princípio tóxico fosse hidrossolúvel.
- Tolerância e Imunidade. Tolerância significa um aumento da resistência a uma determinada substância de natureza não-protéica. A tolerância pode ser observada em bovinos, por exemplo, quando ingerem quantidades cada vez maiores de *Manihot esculenta* (mandioca) sem se intoxicar. A imunidade, por sua vez, está ligada à produção de antitoxinas específicas (anticorpos) contra princípios tóxicos de natureza protéica. Por exemplo, as sementes de *Ricinus communis* (mamona) induzem imunidade.
- Resistência individual. Há evidências de que este fator pode ter importância para algumas plantas tóxicas, como ocorre na intoxicação por *Cestrum laevigatum* (baúna).

Além dos fatores citados há, ainda, condições que favorecem a intoxicação. Essas incluem:

- Sede/desconhecimento. Determinadas ocasiões, longas viagens, por exemplo, propiciam a intoxicação. Os animais quando viajam por longas distâncias, chegando ao destino, costumam beber grande quantidade de água, perdendo o paladar e a capacidade de seleção, ingerindo, dessa

forma, plantas tóxicas pouco palatáveis. Também, ocorre a ingestão de plantas tóxicas quando os animais as desconhecem, por terem sido recentemente transferidos para o local.

- Período de ingestão. Algumas plantas podem produzir intoxicação após uma única ingestão (plantas cianogênicas). Outras precisam ser ingeridas por períodos mais prolongados para produzirem um quadro de intoxicação.

- Condições adversas. Algumas situações marginais, tais como a seca, fome e superlotação de pastagens contribuem para o aumento da toxicidade, tendo em vista acarretarem redução na disponibilidade de forragem e, conseqüentemente, uma ingestão maior de plantas menos palatáveis e tóxicas.

Vários são os tecidos-alvos das plantas tóxicas. Segundo MELO (2000), o sistema gastrointestinal é, indubitavelmente, o afetado com maior freqüência. A sintomatologia decorrente do comprometimento desse sistema pode envolver salivação, náusea, dor abdominal, vômito, diarreia, gastroenterite e, em ruminantes, timpanismo e atonia ruminal. Um outro sistema passível de danos é o cardiovascular, incluindo dentre outras alterações, bradicardia e arritmia. O sistema nervoso, em alguns casos, é também afetado, cuja seqüência de eventos nos animais intoxicados culmina com convulsões e morte (CARLINI & GUIMARÃES, 1991; VASCONCELOS *et al.*, 1994, 1997, 2001). Há, ainda, relatos de danos mecânicos e reações alérgicas decorrentes do contato com plantas tóxicas (MELO, 2000). A TABELA 1 mostra algumas plantas tóxicas importantes da Região Nordeste, bem como seus respectivos tecidos-alvos e princípios tóxicos.

TABELA 1 – Espécies, tecidos-alvos e princípios tóxicos de algumas plantas tóxicas da Região Nordeste*

Espécie	Tecido-alvo	Princípio Tóxico
<i>Palicourea marcgravii</i> (erva de rato, cafezinho)	Coração	Ácido monofluoracético
<i>Manihot esculenta</i> (mandioca)	Generalizado (Pulmão)	Glicosídeo cianogênico
<i>Ricinus communis</i> - sementes (mamona, carrapateira)	Tubo digestivo	Toxalbumina (ricina)
<i>Stryphnodendrum coriaceum</i> (barbatimão)	Tubo digestivo	Sapogeninas triterpenoidais
<i>Cestrum laevigatum</i> (coerana, baúna)	Fígado	Saponina
<i>Lantana camara</i> (chumbinho)	Fígado (Fotosensibilização)	Triterpenos
<i>Ricinus communis</i> – folhas (mamona, carrapateira)	Tecido Nervoso	Alcalóide
<i>Ipomoea asarifolia</i> (salsa)	Tecido Nervoso	Desconhecido

Fonte: Adaptada de TOKARNIA *et al.* (2000).

1.2– Natureza Química dos Princípios Tóxicos

A toxicidade apresentada por *Ricinus communis* foi, primeiramente, creditada à contaminação de tecidos específicos de plantas por toxinas bacterianas. No entanto, estudos demonstraram a natureza protéica dos fatores tóxicos detectados em sementes de *Ricinus communis* (mamona), assim como em *Abrus precatorius* (jequiriti) (WARDEN & WADDEL, 1884; BRUYLANT & VANNEMAN, 1884; DIXSON, 1887).

Embora a toxicidade presente em várias plantas seja proveniente de substâncias cujas naturezas químicas são bastante diversificadas (TABELA 1), incluindo fatores não-protéicos e protéicos, conhece-se hoje uma família de proteínas com toxicidade a diferentes organismos. Entre os componentes de natureza protéica com comprovada ação tóxica encontram-se as lectinas (GATEHOUSE & GATEHOUSE, 1995; OKA *et al.*, 1997; LIS & SHARON, 1998; GERHARDT *et al.*, 1999), proteínas inativadoras de ribossomos ou RIPs (ALOUF & FREER, 1999), inibidores de tripsina (KOIWA *et al.*, 1997; SCHULER *et al.*, 1998), inibidores de amilases (CHRISPEELS *et al.*, 1998; GATEHOUSE & GATEHOUSE, 1998; VALENCIA *et al.*, 2000), arcelinas (OSBORN *et al.*, 1988; PAES *et al.*, 2000), canatoxina (CARLINI *et al.*, 1997; FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2000), soyatoxina e toxina da soja (VASCONCELOS *et al.*, 1994, 2001).

Um fato interessante e discutido por CARLINI *et al.* (1988) é a coexistência de proteínas tóxicas e lectinas no mesmo tecido vegetal. Além disso, as histórias das atividades tóxica e hemaglutinante de proteínas vegetais, desde os primórdios, têm ocorrido paralelamente e, muitas vezes, levantada a hipótese:

“A atividade tóxica apresentada por algumas espécies vegetais é devida à presença de lectinas ou não”?

1.3 – Lectinas Vegetais - Uma Visão Geral

1.3.1 – História

As lectinas, também chamadas aglutininas ou fitohemaglutininas, têm a mais longa história científica de todas as proteínas vegetais. No entanto, o marco inicial da história das lectinas data de 1888, quando Hermann Stillmarck publicou sua dissertação intitulada “Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiacean” (Ricina, Um Fermento Tóxico de Sementes de *Ricinus communis* L. e Algumas Outras Espécies de Euforbiáceas) (STILLMARK, 1888). Embora hoje já esteja elucidado que a “ricina”, denominada por Stillmark, encerrava uma mistura complexa de verdadeiras moléculas de ricina (toxinas) e de aglutininas não tóxicas, esse trabalho foi um marco na biologia, pelo fato de ser o primeiro a associar a toxicidade da ricina a um fator protéico hemaglutinante. Além disso, essa descoberta foi também importantíssima na bioquímica vegetal, porque a “ricina” foi a primeira proteína isolada de planta a apresentar uma atividade biológica bem definida permitindo, assim, uma descrição. Logo após a descoberta da ricina substâncias tóxicas similares foram identificadas em sementes de *Croton tiglium* (crotina) e de *Abrus precatorius* (abrina) e na casca de *Robinia pseudoacacia* (robinia).

Em 1898, ELFSTRAND introduziu o termo hemaglutinina como um nome comum para todas as proteínas vegetais capazes de aglutinar células. Esse termo foi inspirado na similaridade existente entre a atividade visível macroscopicamente das proteínas vegetais e aquela das aglutininas presentes no soro de animais e do homem.

A idéia de que a toxicidade era uma propriedade intrínseca das lectinas foi descartada alguns anos mais tarde, quando LANDSTEINER & RAUBITSCHER (1907) descreveram pela primeira vez a presença de lectinas não tóxicas em

Phaseolus vulgaris (feijão comum), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinaris* (lentilha) e *Vicia sativa* (fava).

Um outro acontecimento histórico foi a descoberta de que algumas lectinas exibiam uma preferência para determinadas hemácias humanas, quando analisados os diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO (RENKONEN, 1948; BOYD & REGUERA, 1949). Essa especificidade sanguínea foi a razão que motivou a introdução do termo "lectina" do latim "legere", que significa selecionar, escolher (BOYD & SHAPLEIGH, 1954). No entanto, embora o nome lectina tenha sido proposto para enfatizar a aglutinação seletiva apresentada por algumas lectinas, ele passou a ser usado para todas as proteínas com atividade hemaglutinante. Há discussões que mostram que o termo "hemaglutinina" é, certamente, mais apropriado do que "lectina" uma vez que ele se refere à propriedade que uma proteína possui de aglutinar hemácias. No entanto, há controvérsias desde que algumas proteínas são também capazes de aglutinar outras células além de hemácias. Dessa forma, o termo "aglutinina" seria o preferido. Na ausência de um consenso, o termo lectina é atualmente o mais usado, porém, aglutinina e fitohemaglutinina ainda persistem como sinônimos (VAN DAMME *et al.*, 1998). Acredita-se que essa confusão na terminologia para essa classe de proteínas advém do fato de que os diferentes nomes propostos surgiram antes do mecanismo envolvido na aglutinação ter sido entendido em termos moleculares. Como a aglutinação celular está relacionada com a capacidade de tais proteínas de interagir com açúcares específicos (WATKINS & MORGAN, 1952), recentemente as lectinas foram reconhecidas como "proteínas ligantes a carboidratos", sendo esse termo mais aceito do que (hem)aglutininas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

1.3.2 – Definições

A capacidade de interagir com carboidratos em preferência à atividade hem(aglutinante) como critério funcional das lectinas, acarreta profundas implicações na definição e denominação dessa classe de proteínas.

De acordo com GOLDSTEIN *et al.* (1980), que se basearam primariamente na especificidade por açúcar e inibição da reação de aglutinação, lectinas são proteínas ligantes a carboidratos (ou glicoproteínas), de origem não imune, que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. Embora esta definição tenha sido aprovada com algumas modificações pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica (DIXON, 1981), ela apresenta uma falha por estar confinada apenas às proteínas multivalentes ligantes a carboidratos.

Em seguida, KOCOUREK & HOREJSI (1981) enquadraram na definição de lectinas as toxinas com pequena atividade aglutinante, mas com subunidades capazes de interagir com carboidratos. No entanto, algumas lectinas contêm um segundo sítio de ligação que interage com ligantes que não são carboidratos, restringindo, assim, essa definição.

BARONDES (1988) redefiniu as lectinas as considerou como proteínas ligantes a carboidratos, excluindo os anticorpos e as enzimas.

Todavia, com as novas elucidações acerca da estrutura das lectinas, e de proteínas relacionadas com as lectinas, bem como de seus genes correspondentes, surgiram novas colocações. A presença de no mínimo um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a carboidratos específicos é considerada, no momento, como o único critério essencial para que uma proteína seja chamada de lectina. Assim, as lectinas foram definidas recentemente como qualquer proteína que possua pelo menos um domínio não catalítico, capaz de ligar-se reversivelmente a mono- ou oligossacarídeos específicos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). De acordo com esses autores, as lectinas podem ser classificadas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas As

merolectinas possuem um único domínio de ligação a carboidratos sendo, portanto, incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Exemplos dessa classe são as proteínas monoméricas que se ligam a manose. As hololectinas possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, sendo consideradas verdadeiras aglutininas. Essas compreendem a maioria das lectinas de plantas. As quimerolectinas possuem um ou mais domínios de ligação a carboidratos e, ainda, um outro domínio com atividade enzimática ou outra atividade biológica que atua independentemente. Nessa classe estão inclusas as quitinases e as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 2. As superlectinas podem ser consideradas um grupo especial de quimerolectinas. Elas são proteínas que contêm, no mínimo, dois domínios ligantes a carboidrato, os quais são estruturalmente distintos, reconhecendo carboidratos diferentes. Um exemplo da ocorrência de superlectina foi detectado no bulbo da tulipa TxLCI, consistindo de uma molécula com domínios distintos ligantes a manose e a N-acetil-galactose (VAN DAMME *et al.*, 1996).

1.3.3 – Ocorrência, Localização e Classificação

Apesar da ampla distribuição das lectinas em plantas, animais, bactérias, vírus e protozoários (<http://www.cermav.cnrs.fr/databank/lectin>), são nos vegetais onde os estudos estão mais centralizados. Atualmente, cerca de 500 lectinas de plantas já foram isoladas, sendo conhecidas estruturas tridimensionais de mais de 200 dessas proteínas (VIJAYAN & CHANDRA, 1999; PEUMANS *et al.*, 2000). Esse fato deve-se não apenas à importância econômica e nutricional das espécies onde são encontradas, mas, também à facilidade de seu isolamento.

Embora as lectinas tenham sido detectadas em várias espécies vegetais (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; SHARON & LIS, 1990), as mais estudadas são as das plantas superiores, notadamente as espécies pertencentes à divisão Angiospermae (Classes Monocotyledoneae e Dicotyledoneae).

Nas monocotiledôneas, a família Poaceae (gramíneas) agrupa o maior número de lectinas isoladas e caracterizadas. Dentre elas, destaca-se a lectina isolada de germe de trigo (*Triticum vulgare*), cevada (*Hordeum vulgare*) e arroz (*Oriza sativa*) (LEE *et al.*, 1991; POTTER *et al.*, 1993).

Nas dicotiledôneas, a família Leguminosae ocupa uma posição de destaque em relação às demais, englobando o maior número de lectinas já estudadas (SHARON & LIS, 1990). Tal fato deve-se ao elevado número de espécies pertencentes a essa família e à disponibilidade das sementes, sendo encontradas em muitas delas concentrações relativamente altas de lectinas. Como demonstração, pode-se citar que das 50 lectinas comercialmente disponíveis, a grande maioria, cerca de 31 delas, foram obtidas de leguminosas (RUDIGER, 1998).

A localização das lectinas em plantas superiores não se restringe apenas às sementes. Elas também foram encontradas em folhas (RATANAPO *et al.*, 1998; AKEV & CAN, 1999), cascas (BROEKART *et al.*, 1987), bulbos (VAN DAMME *et al.*, 2000; WRIGHT *et al.*, 2000), rizomas (PEUMANS *et al.*, 1997), tubérculos (ALLEN & NEUBERGER, 1973; IMANISH *et al.*, 1997) e caules (TALBOT & ETZLER, 1978). Entretanto, comparativamente às lectinas de sementes, ainda são escassos os relatos abordando proteínas aglutinantes em folhas. Alguns exemplos de lectinas purificadas do tecido foliar encontram-se na TABELA 2.

A especificidade por carboidratos é uma das características utilizadas para classificar as lectinas e, conforme a afinidade por açúcares simples, as lectinas vegetais foram classificadas em quatro grupos, dependendo da configuração relativa dos carbonos 3 e 4 do anel piranosídico: grupo I (L-fucose), grupo II (D-galactose, N-acetil-D-galactosamina), grupo III (D-glucose, D-manose) e grupo IV (D-idose, L-glucose e L-xilose) (MAKELA, 1957). Três novos grupos foram acrescentados por GOLDSTEIN & PORETZ (1986): N-acetil-D-glucosamina, ácido siálico e estruturas complexas. No entanto, é válido ressaltar que apesar da classificação baseada na especificidade por açúcares ter sido de grande valia, sabe-se, atualmente, que a maioria das lectinas apresenta especificidade por

TABELA 2 – Lectinas purificadas de folhas

Família	Espécie	Especificidade
Alliaceae	<i>Allium porrum</i> , <i>Allium sativum</i> ,	Manose
Araceae	<i>Dieffenbachia sequina</i>	Manose
Bromeliaceae	<i>Neoregelia flandria</i>	Manose
Caprifoliaceae	<i>Sambucus nigra</i>	Gal/GalNAc
	<i>Sambucus ebulus</i>	GalNAc
	<i>Sambucus peruviana</i>	Lactose>GalNAc
Gramineae	<i>Agropyrum repens</i> ,	GlcNAc
	<i>Phragmites australis</i>	
Leguminoseae	<i>Griffonia simplicifolia</i>	GalNAc, Gal, GlcNAc e Fucose
	<i>Sophora japonica</i>	GalNAc>Gal
Liliaceae	<i>Aloe arborescens</i>	Man
	<i>Aloe Vera</i>	GalNAc
Convolvulaceae	<i>Ipomoea asarifolia</i>	Fetuína

Fonte: Adaptada de VAN DAMME *et al.* (1998).

oligossacarídeos, com constantes de associação cerca de 1000 vezes maiores do que com monossacarídeos (WEIS & DRICKAMER, 1996; RUDIGER, 1998).

Segundo VAN DAMME *et al.* (1998) a subdivisão das lectinas em grupos feita por MAKELA (1957), e modificada por GOLDSTEIN & PORETZ (1986), apesar de sua validade para o uso de lectinas como ferramentas, foi irrelevante no que diz respeito às possíveis relações evolutivas entre as espécies. Assim, subdivisões baseadas nessas relações foram propostas considerando-se, principalmente, as similaridades nas sequências. Tais estudos revelaram a ocorrência de sete famílias de lectinas relacionadas estrutural e evolutivamente. Quatro dessas famílias, denominadas lectinas de leguminosas, lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose, lectinas ligantes a quitina e RIPs do tipo 2, compreendem o maior número de espécies. Em contraste, as outras três famílias, as lectinas relacionadas a jacalina, a amarantina e as lectinas do floema das curcubitáceas, representam pequenas famílias dessas proteínas.

1.3.4 – Funções Extrínsecas

As funções extrínsecas propostas para as lectinas vegetais incluem a participação na colonização e nodulação das raízes de leguminosas por bactérias *Rhizobium* (HIRSCH, 1999) e na defesa da planta contra fitopatógenos e a herbivoria em geral (CHRISPEELS & RAIKEL, 1991; PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Tendo em vista que a última função citada está mais relacionada com as atividades desenvolvidas neste trabalho, uma abordagem mais detalhada será feita a seguir.

Como ressaltado por PEUMANS & VAN DAMME (1995), há vários aspectos moleculares, bioquímicos, celulares, fisiológicos e evolucionários que corroboram com o papel de defesa das lectinas vegetais. Entre os diversos aspectos, ressaltam-se:

- O fato de serem as únicas proteínas vegetais capazes de reconhecer e interagir com glicoconjugados presentes na superfície de microorganismos, ou expostos ao longo do trato intestinal de insetos ou de mamíferos herbívoros, similarmemente ao verificado com as quitinases, glucanases e glicosidases;
- A maior afinidade por oligossacarídeos que não são comuns, ou que não ocorrem normalmente, em plantas. Exemplos são as lectinas que interagem com quitina, um polímero de N-acetil-glucosamina encontrado na parede celular de fungos e em algumas estruturas de invertebrados, e as lectinas que interagem com o ácido siálico, principal carboidrato encontrado em glicoproteínas animais;
- Resistência a temperaturas elevadas, a extremos de pH e a proteases de insetos e de outros animais;
- Ocorrência estratégica na planta, isto é, em órgãos ou tecidos que são mais suscetíveis ao ataque de predadores ou patógenos, podendo significar adaptações desenvolvidas ao longo da evolução para a função de defesa.

JANZEN *et al.* (1976) foram pioneiros ao sugerir que a lectina de *Phaseolus vulgaris* era tóxica para o bruquídeo (*Callosobruchus maculatus*) do caupi. Depois disso, vários outros trabalhos confirmaram a ação inseticida das lectinas (GATEHOUSE & GATEHOUSE, 1995; OKA *et al.*, 1997; LIS & SHARON, 1998). Esses estudos são realizados, principalmente, através de experimentos com lectinas purificadas contidas em dietas artificiais contra insetos predadores de plantas economicamente importantes (MURDOCK *et al.*, 1990). O modo de ação pelo qual as lectinas exercem esse efeito é desconhecido, mas pode envolver a sua ligação a glicoproteínas presentes sobre as células epiteliais do intestino, resultando no rompimento da função celular ou uma diminuição na absorção de

nutrientes (HARPER *et al.*, 1995). Assim, uma das aplicações em estudo para as lectinas vegetais é a de construção de plantas transgênicas que expressam essas proteínas como bioinseticidas. Várias plantas transgênicas expressando lectinas já estão em fase de testes em campo (www.aphis.usda.gov/bbep/pb), para análise de impacto ambiental, enquanto que no caso específico de vegetais comestíveis, estudos adicionais dos efeitos deletérios na saúde animal estão em andamento em muitos laboratórios mundo afora.

As lectinas também são consideradas fatores bioativos que podem modular e interferir em muitos aspectos do metabolismo corpóreo quando consumidas por animais. Elas resistem ao ataque proteolítico, chegando, de certa forma, intactas ao trato digestório onde são capazes de se ligar a glicoconjugados específicos localizados nas células da mucosa intestinal (PUSZTAI *et al.*, 1995). Esse processo pode ocasionar diferentes tipos de efeitos que se distinguem em agudos e/ou crônicos. Entre os agudos pode-se citar a presença de náuseas, vômitos e diarreia como consequência de danos na permeabilidade da mucosa intestinal. Já entre os efeitos crônicos estão a hiperplasia e a hipertrofia do intestino delgado (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; RIOS *et al.*, 1996; PUSZTAI *et al.*, 1996). Adicionalmente, várias lectinas quando se ligam à membrana da borda em escova induzem a liberação do hormônio colecistocinina (CCK) a partir das células neuroendócrinas, podendo, assim, causar a hipersecreção de enzimas pancreáticas e o crescimento do pâncreas. Além disso, elas podem modular a atividade secretória do pâncreas causando um distúrbio no balanço hormonal (PUSZTAI *et al.*, 1995).

Além dos exemplos citados, ressaltando as atividades tóxica e antinutricional de algumas lectinas, experimentos conduzidos em camundongos com a lectina de *Luetzelburgia auriculata* (LAL) mostraram que essa proteína, quando injetada pelas vias intraperitoneal ou intravenosa, apresentou toxicidade aguda para os animais em teste, induzindo morte súbita nos animais (MELO, 2001; Comunicação pessoal). A sintomatologia observada após a administração da LAL foi similar à descrita para um grupo de proteínas tóxicas vegetais purificadas da *Canavalia ensiformis* e *Glycine max*, cujas seqüências de

alterações culminam com convulsão e morte dos animais (CARLINI & GUIMARÃES, 1991; VASCONCELOS *et al.* 1994, 1997; FOLLMER, 2001)

Embora haja evidências de que a toxicidade apresentada por algumas lectinas representa muito mais uma exceção do que uma regra, atualmente há vários trabalhos ressaltando a toxicidade de lectinas frente a diferentes organismos. Diante desse contexto, e respondendo à pergunta originalmente feita nesse trabalho, em alguns casos a toxicidade apresentada por espécies vegetais está relacionada à presença de lectina(s).

1.3.5 – Lectinas de Convolvulaceae

A família Convolvulaceae é formada por aproximadamente 55 gêneros e 2000 espécies, sendo encontradas em regiões tropicais e temperadas (CRONQUIST, 1968). Segundo VAN DAMME *et al.* (1998), as lectinas dessa família, juntamente com as lectinas da família Moraceae, são consideradas como subgrupos pertencentes à família das lectinas relacionadas a jacalina.

Apenas em algumas espécies dos gêneros *Calystegia*, *Convolvulus* e *Ipomoea*, representantes da família Convolvulaceae, foram isoladas e caracterizadas lectinas. Exemplos são as lectinas isoladas de rizomas de *Calystegia sepium* e *Convolvulus arvensis*, denominadas de calsepa e conarva, representando cerca de 25% e 5%, respectivamente, da proteína solúvel total, sendo, assim, consideradas proteínas abundantes. Adicionalmente, uma lectina foi isolada de tubérculos de *Ipomoea batatas* (batata doce), nomeada de ipomoelina. Porém, em contraste com as lectinas dessa família anteriormente descritas, essa proteína representa menos de 0,1% da proteína solúvel (VAN DAMME *et al.*, 1998).

As estruturas moleculares das lectinas nativas calsepa e conarva aparentemente não são tão complexas, consistindo de dois protômeros idênticos de 153 resíduos, não glicosilados. As estruturas primárias dessas lectinas foram

deduzidas a partir de suas respectivas seqüências de cDNAs, revelando que ambos polipeptídeos correspondem à tradução completa de seus respectivos genes. A ausência aparente de um peptídeo sinal indicou que as lectinas de convolvuláceas foram sintetizadas no citoplasma, não sofrendo modificações pós-traducionais. A análise de múltiplos cDNAs demonstrou a ocorrência de duas isoformas de calsepa altamente similares, sugerindo que a lectina é codificada por uma família de genes. Adicionalmente, análise de fragmentos de DNA genômico amplificados por PCR revelou a presença de um único íntron no(s) gen(es) de calsepa (VAN DAMME *et al.*, 1996).

Em relação à estrutura tridimensional das lectinas da família Convolvulaceae, especula-se que como as subunidades da calsepa apresentam 30% e 49% de identidade com a seqüência da jacalina, é provável que essas lectinas tenham estruturas similares. Um protômero da jacalina consiste de um prisma- β simétrico, triplo, cada um constituído de 4 folhas- β paralelas. Onze das doze fitas (numeradas de 1 a 12) são formadas por uma cadeia- α , enquanto que uma cadeia- β está envolvida na formação da última fita. Quatro subunidades, 1, 1', 2 e 2', estão associadas não covalentemente numa estrutura tetramérica que, provavelmente, resulta da associação de dois dímeros 1-2 e 1'-2'. As cadeias- β , que ocupam a região central do tetrâmero, desempenham um papel crucial na associação das quatro subunidades. Cada subunidade possui um único sítio de ligação a monossacarídeos, envolvendo os resíduos de Gly¹, Tyr¹²², Trp¹²³ e Asp¹²⁵ da cadeia- α .

A especificidade por carboidratos das lectinas da família Convolvulaceae não foi estudada detalhadamente. Todavia, estudos preliminares indicaram que calsepa e conarva reconhecem tanto manose, como maltose (PEUMANS *et al.*, 1997; 2000), enquanto que a ipomelina se liga apenas em D-galactose (IMANISHI *et al.*, 1997).

Pelo fato de apenas poucas lectinas das famílias Moraceae e Convolvulaceae terem sido seqüenciadas e clonadas, não há ainda um dendograma definitivo. Porém, há evidências de que lectinas similares às das convolvuláceas também ocorrem em *Helianthus tuberosus* (alcachofra de

Jerusalém) e *Musa acuminata* (banana) (CLENDENNEN & MAY, 1997). A existência de lectinas manose-específicas em outras famílias demonstra não apenas que a família da jacalina está bastante difundida no reino vegetal, mas, também, sugere que as lectinas de moráceas, N-acetil-galactosamina-específicas, são muito provavelmente uma ramificação da linha principal de evolução (FIGURA 1).

Até o presente são poucas as informações disponíveis sobre o papel fisiológico das lectinas da família Convolvulaceae. Porém, mostrou-se que algumas lectinas dessa família são proteínas abundantes, específicas de rizomas, localizadas no citoplasma, e possuem atividade mitogênica. Embora os dados sugiram que tais lectinas sejam proteínas de reserva, com função de defesa contra potenciais predadores (vertebrados e invertebrados), estudos posteriores sobre as atividades tóxica e antinutricional dessas proteínas são necessários para apoiar essa hipótese. Todavia, é válido ressaltar que os rizomas de *Calystegia sepium* e *Convolvulus arvensis*, não são, ou raramente são, atacados por invertebrados do solo. Esta resistência aparente pode ser a razão da persistência dessas ervas, criando dificuldades na agricultura do mundo inteiro (PEUMANS *et al.*, 1997).

1.4 – Gênero *Ipomoea*

O gênero *Ipomoea* é composto de 63 espécies. Apesar desse gênero conter um número reduzido de espécies economicamente importantes e, também, pouco exploradas agronomicamente, sua importância deve-se ao fato de ser constituído por muitas espécies tóxicas para animais. Exemplos de espécies pertencentes a esse gênero são: *Ipomoea asarifolia*, *I. alba*, *I. fistulosa*, *I. carnea*, *I. batatas*, *I. purpurea* e *I. tricolor* (DOBEREINER *et al.*, 1960; TOKARNIA *et al.*, 1979; PINHEIRO & SANTA ROSA, 1991).

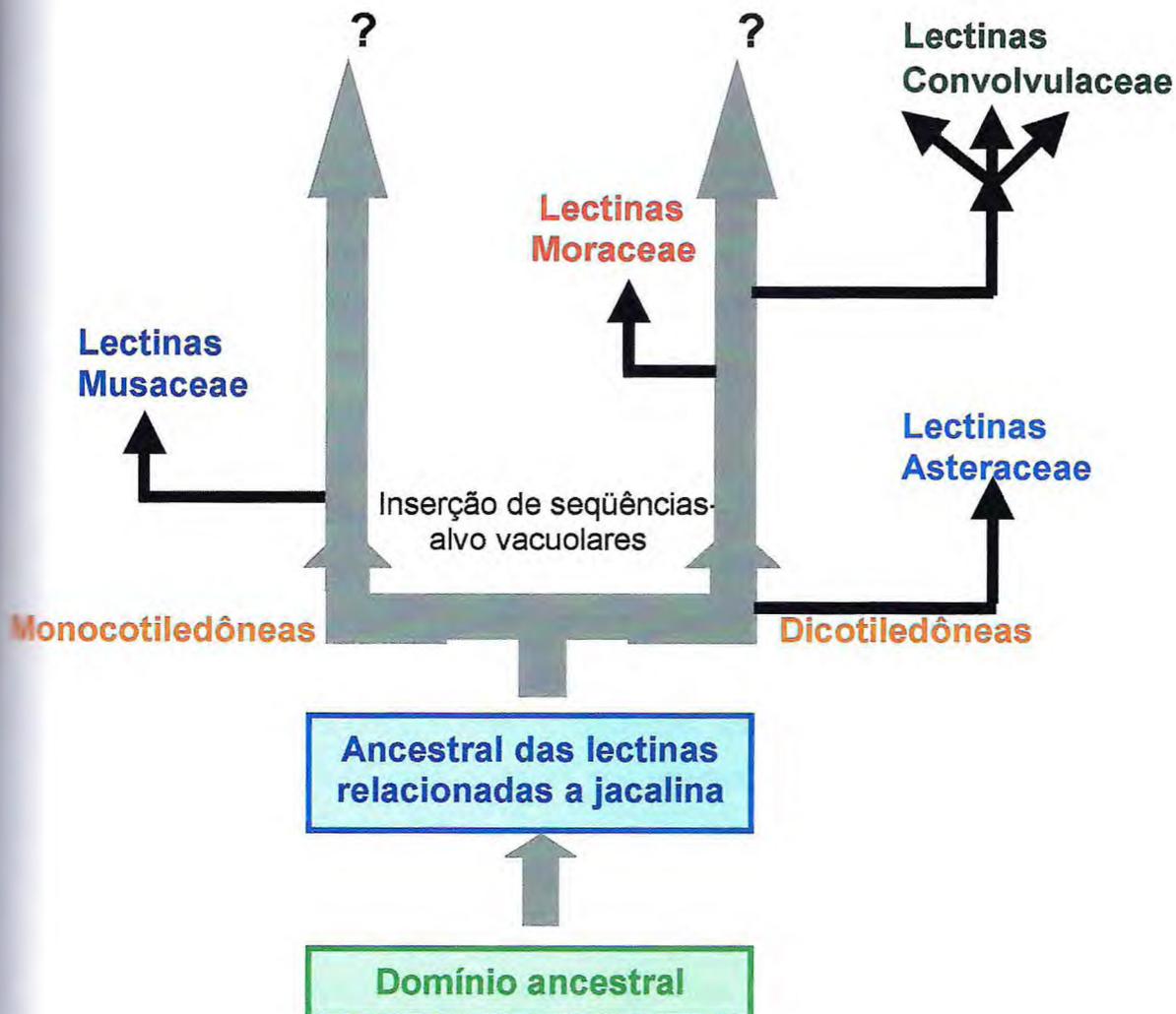


FIGURA 1 – Modelo hipotético da evolução molecular das lectinas relacionadas a jacalina. O ancestral das lectinas relacionadas a jacalina surgiu – antes da separação das monocotiledôneas e dicotiledôneas – por uma duplicação e inserção ao acaso de um domínio ancestral. Uma evolução posterior do ancestral originou as lectinas citoplasmáticas das famílias Musaceae, Asteraceae e Convolvulaceae (e, provavelmente, outras). As lectinas da família Moraceae surgiram a partir da inserção de seqüências-alvo vacuolares nas lectinas citoplasmáticas. É possível que este evento tenha surgido após a separação da família Moraceae de outras dicotiledôneas.

1.4.1 – *Ipomoea asarifolia*

Ipomoea asarifolia R. et Schult., planta herbácea prostrada ou trepadeira, da família Convolvulaceae, é conhecida pelos nomes populares “salsa” ou batatarana” (FIGURA 2). Quanto à sua distribuição e habitat, no Brasil ocorre nas Regiões Norte e Nordeste (FIGURA 3) podendo ser encontrada nas margens de rios e lagoas, nas praias marítimas, em terrenos abandonados e nas margens de estradas (DOBEREINER *et al.*, 1960).

A salsa provoca intoxicação nos bovinos, ovinos e caprinos. A intoxicação natural é favorecida pela fome, que induz os animais à ingestão dessa planta, que se mantém verde durante o ano todo. A maioria dos casos de intoxicação ocorre em animais jovens que se intoxicam comendo as partes aéreas da planta. No entanto, para que os animais mostrem sinais de intoxicação é necessário o consumo de salsa em grandes quantidades, quase como alimento exclusivo. Os bovinos, mesmo ingerindo a planta por apenas um dia, já mostram sintomas de intoxicação. Por outro lado, os ovinos e caprinos necessitam ingerir a salsa durante semanas para evidenciar sintomas (DOBEREINER *et al.*, 1960; TOKARNIA *et al.*, 2000).

Os sintomas de intoxicação da salsa são de ordem nervosa, porém diferentes nas três espécies citadas. Nos bovinos, observa-se balanço da cabeça, tremores musculares, desequilíbrio do trem posterior e queda do animal ao solo. Interrompida a ingestão da planta, os sintomas desaparecem em poucos dias, exceto quando as doses são bastante elevadas, ocorrendo morte. Os ovinos mostram tremores musculares e perturbações na locomoção. Interrompida a ingestão da planta, os sintomas perduram ainda por vários dias e somente morrem os animais que continuam a ingerir a planta após mostrarem sintomas. Os caprinos intoxicados por salsa apresentam sonolência, lerdeza e poucas vezes tremores musculares e opistótono. No entanto, uma vez que os caprinos apresentem sintomas, a morte é quase inevitável, mesmo suspendendo-se imediatamente a ingestão da planta (DOBEREINER *et al.*, 1960; PINHEIRO & SANTA ROSA, 1991; TOKARNIA *et al.*, 1979, 2000).

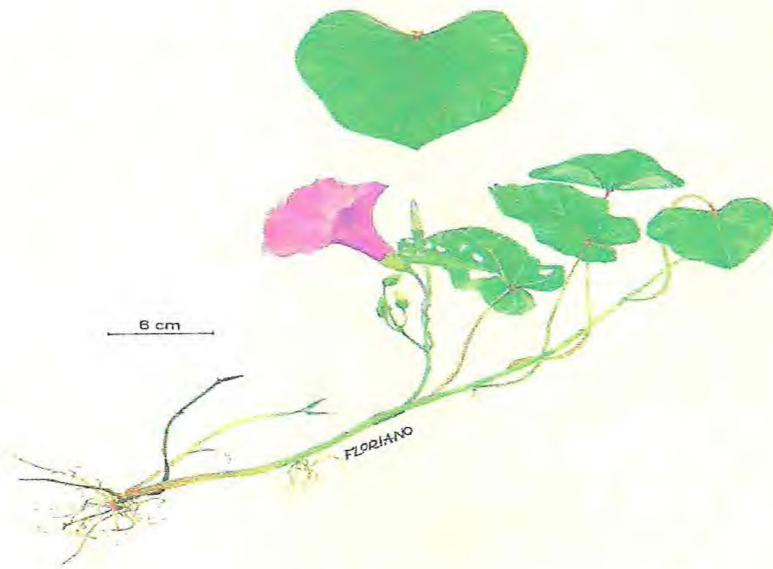


FIGURA 2 – *Ipomoea asarifolia* (salsa).

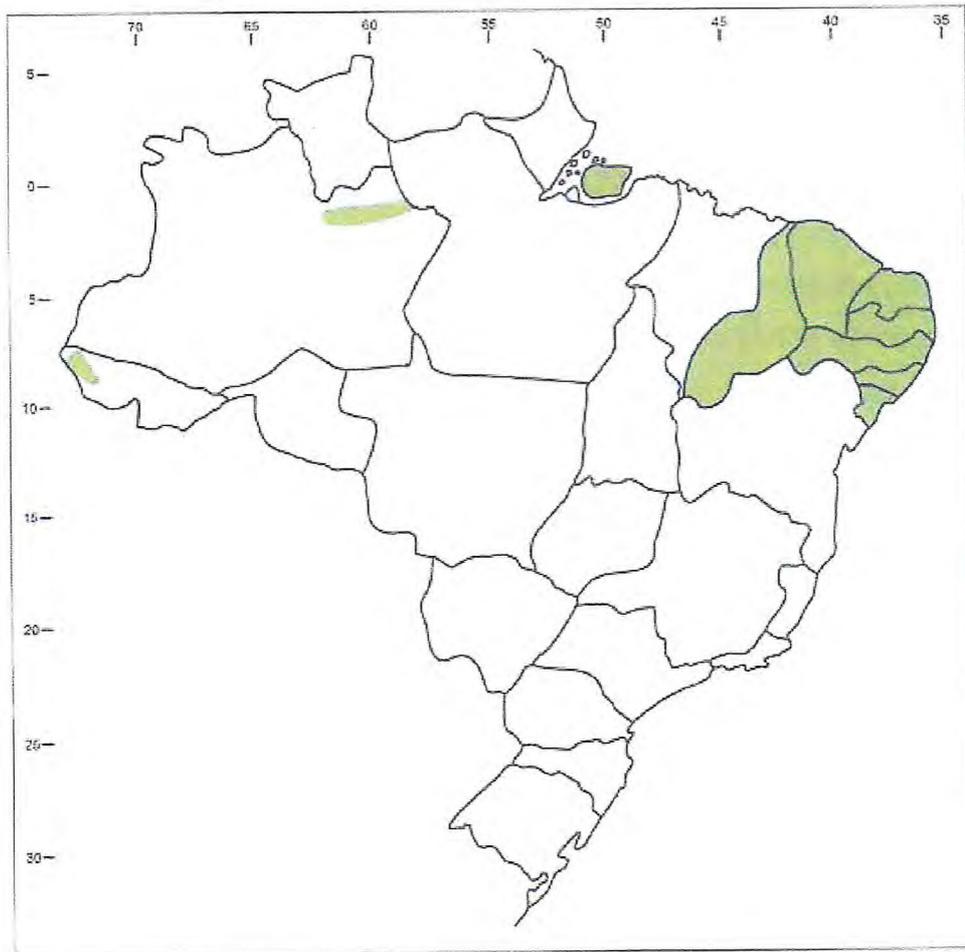


FIGURA 3 – Distribuição de *Ipomoea asarifolia* no Brasil.

A toxicidade da salsa para ruminantes, como já relatada, é conhecida desde a década de sessenta (DOBEREINER *et al.*, 1960). Também, está registrado que os efeitos adversos nos animais (bovinos, caprinos e ovinos) oriundos do consumo da salsa são decorrentes de perturbações nervosas (TOKARNIA *et al.*, 2000). No entanto, até o momento, não há trabalhos relatando a natureza do princípio tóxico. Tendo em vista o fato da salsa ser uma planta tóxica abundante no Nordeste do Brasil, causadora de uma grande perda do rebanho e, ainda, o não conhecimento do(s) componente(s) tóxico(s) envolvido(s) na morte dos animais, é que se justifica o interesse no estudo dessa espécie. O conhecimento da toxina apresenta muitas implicações tanto no aspecto pecuário, como também no biotecnológico. No entanto, convém ressaltar que qualquer que seja o direcionamento das pesquisas já iniciadas com a salsa conhecimentos prévios detalhados sobre as propriedades bioquímicas, estruturais e biológicas da(s) toxina(s) existente(s) são necessários.

2. OBJETIVOS

2.1 – Gerais

Investigar a natureza química do princípio tóxico da salsa (*Ipomoea asarifolia* R. et Schult) e avaliar seus aspectos bioquímicos, estruturais e funcionais, com vistas ao desenvolvimento de aplicações biotecnológicas do componente tóxico.

2.2 – Específicos

- Caracterizar quimicamente as proteínas das folhas de salsa através da determinação da composição centesimal e de aminoácidos.
- Investigar a natureza química do(s) componente(s) tóxico(s).
- Detectar e quantificar componentes bioativos em extratos obtidos de folhas de salsa.
- Purificar e caracterizar o(s) componente(s) protéico(s) tóxico(s) das folhas de salsa.
- Avaliar os efeitos do(s) componente(s) protéico(s) tóxico(s) quando administrado(s) a animais monogástricos.
- Avaliar a atividade inseticida do(s) componente(s) tóxico(s) com potencial de aplicações biotecnológicas.

3. MATERIAIS

3.1 – Material Vegetal

Folhas de *Ipomoea asarifolia* R. et Schult foram coletadas de plantas distribuídas no Campus do Itaperi, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará.

3.2 – Animais de Experimentação

Camundongos Swiss (*Mus musculus*) foram provenientes de colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

Gorgulhos (*Callosobruchus maculatus*) foram provenientes de colônias desenvolvidas no Laboratório de Citogenética, Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

3.3 – Hemácias

As hemácias usadas nos ensaios de aglutinação foram obtidas das seguintes fontes:

- Humanas (sistema ABO) - Doadores adultos e sadios do Hemocentro do Ceará (HEMOCE).

- Coelho - Animais adultos e albinos (linhagem Nova Zelândia) mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

- Boi e Porco - Animais sadios do Frigorífico Industrial de Fortaleza (FRIFOR).
- Cavalo, cabra, ovelha e cão - Animais sadios do Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Veterinária da UECE.

3.4 – Reagentes Químicos

Acrilamida, N,N-metileno bisacrilamida, albumina sérica bovina (BSA), N α -benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida, inibidor de tripsina da soja tipo Kunitz, tripsina, papaína, subtilisina, bromelaína, marcadores de massa molecular, N,N,N',N' tetrametiletanolamina, "Coomassie Brilliant Blue" G e R, urease, D-glucose, D-galactose, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, D-frutose, D-manose, ácido N-acetil-D-neuramínico, α -lactose, melibiose, rafinose, sacarose, avidina, fetuína, mucina, "egg white", quitina, acetonitrila, anidrido heptafluorbutírico foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.

DEAE-celulose, dodecil sulfato de sódio e β -mercaptoetanol foram obtidos da Merck, Darmstadt, Alemanha.

Os reagentes utilizados para análise automática dos aminoácidos e Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio foram adquiridos da Pharmacia, Uppsala, Suécia.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

4. MÉTODOS

4.1 – Tratamento e Maceração das Folhas

As folhas de salsa, logo após serem coletadas, foram lavadas em água corrente, submersas em solução de hipoclorito de sódio 2%, por 2 min e, a seguir, lavadas com água destilada. As folhas foram, então, picotadas e maceradas em presença de nitrogênio líquido (FIGURA 4). O macerado resultante, denominado de farinha, foi utilizado para determinação da composição centesimal, teor de aminoácidos e preparação do extrato total.

4.2 – Composição Centesimal

4.2.1 – Determinação de Umidade

Frascos secos a 100 °C e tarados, contendo cerca de 1 g de farinha das folhas, foram colocados em estufa a 100 °C. Após 24 h, os frascos contendo as amostras foram transferidos para um dessecador e mantidos até que atingissem a temperatura ambiente sendo, então, pesados. Em seguida, estes foram colocados novamente na estufa por mais 12 h, resfriados e pesados. Este procedimento foi repetido até a obtenção de pesos constantes. O teor de umidade foi determinado através da diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo este valor expresso em percentagem.

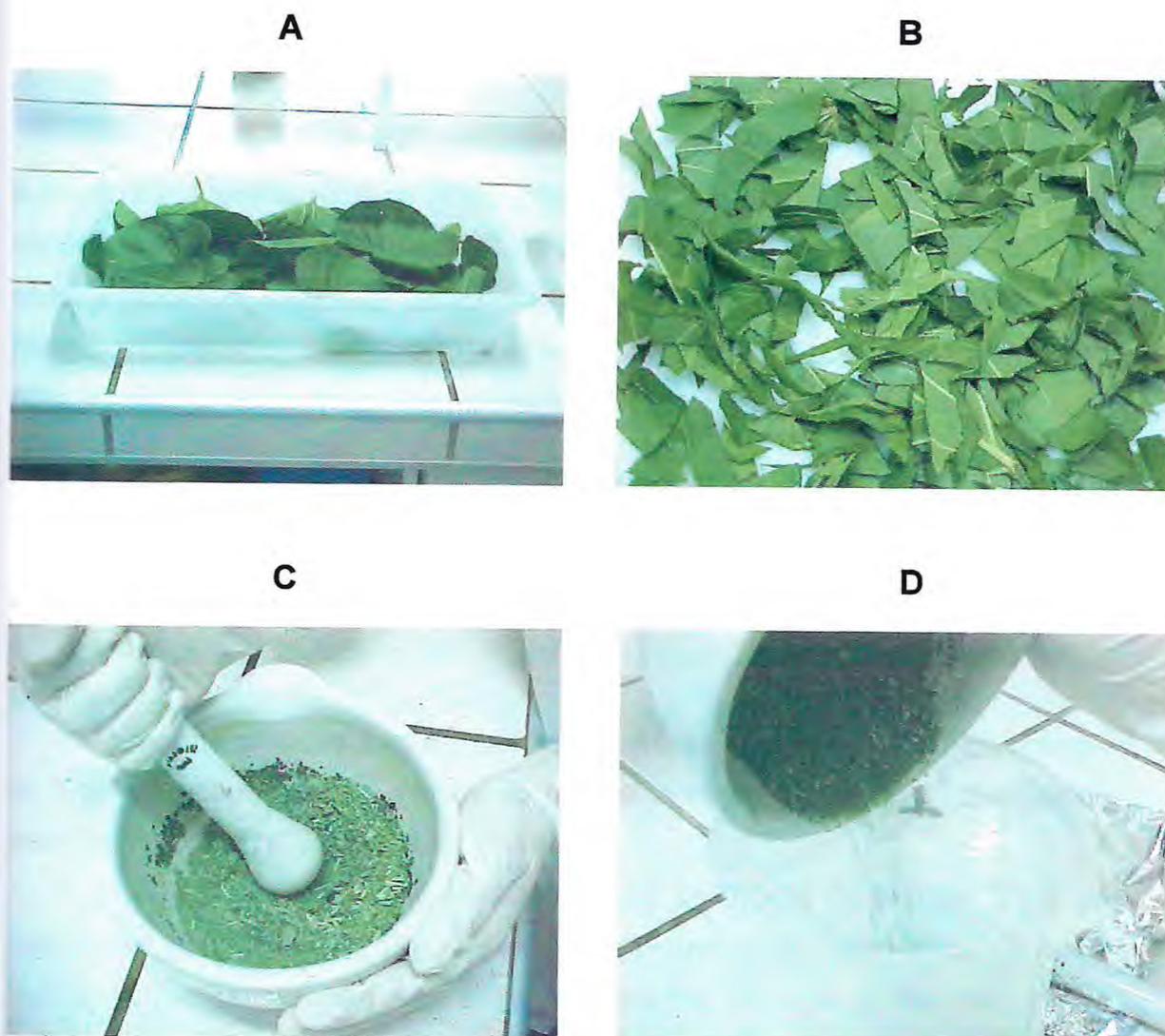


FIGURA 4 – Tratamento e maceração das folhas de salsa. A) Seleção e tratamento das folhas com água e hipoclorito de sódio 2%; B) Picotagem das folhas; C) Maceração das folhas picotadas na presença de nitrogênio líquido e D) Farinha das folhas.

4.2.2 – Determinação de Cinza

Cadinhos de porcelana previamente aquecidos a 600 °C, por 2 h, resfriados e tarados, contendo cerca de 500 mg da farinha das folhas, foram colocados em mufla à mesma temperatura, por 4 h, para incineração da matéria orgânica. Após esse tempo, os cadinhos foram transferidos para um dessecador até que atingissem a temperatura ambiente e pesados. O teor de cinzas foi determinado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo este valor expresso em percentagem.

4.2.3 – Determinação da Proteína Total

O teor de proteína total da farinha das folhas foi determinado pelo método de Kjeldahl, adaptado para medida do nitrogênio através do ensaio colorimétrico descrito por BAETHGEN & ALLEY (1989).

Balões de mineralização contendo cerca de 0,04 g da farinha, 1,1 g de catalisador (K_2SO_4 , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e selênio, na proporção de 100:10:1) e 1,5 ml de H_2SO_4 concentrado foram colocados no digestor por 2 h e 30 min, tempo suficiente para a completa digestão da amostra. O material digerido foi diluído para 10 ml com água grau milli-Q. Alíquotas desse material foram utilizadas no ensaio colorimétrico a 650 nm, para determinação do teor de nitrogênio, utilizando-se uma curva padrão obtida com sulfato de amônio. A proteína total foi determinada através da multiplicação do teor de nitrogênio pelo fator 6,25.

4.2.4 – Determinação de Lipídio Total

Os lipídios totais foram determinados conforme a técnica descrita por TRIEBOLD (1946), usando-se como solvente n-hexana.

Cartuchos de papel de filtro contendo cerca de 1 g da farinha foram envoltos com algodão e colocados em contato com n-hexana por 8 h, em extratores de Soxhlet acoplados a balões previamente desengordurados, secos e tarados. Em seguida, o solvente foi evaporado e os balões foram levados para uma estufa regulada a 105 °C, por 1 h, sendo resfriados até atingir a temperatura ambiente e pesados. Este procedimento foi repetido até obtenção de pesos constantes. Os lipídios totais foram determinados pela diferença dos pesos inicial e final dos balões, sendo este valor expresso em percentagem dos pesos secos das amostras.

4.2.5 – Determinação da Fibra Bruta

O teor de fibra bruta foi determinado de acordo com a metodologia estabelecida pela A.O.A.C. (1970).

Inicialmente, foi feita uma digestão ácida seguida de uma básica. Para isso, 3 g da farinha desidratada e delipidada foram colocadas em contato com 200 ml de H₂SO₄ 1,25%. A mistura foi colocada em um refrigerador com refluxo e fervida por 30 min. Após a digestão ácida, uma filtração em papel foi feita e o resíduo resultante lavado com água destilada a 100 °C até neutralização do material, que foi verificado com papel indicador tornassol azul. Ao material neutralizado, foram adicionados 200 ml de NaOH 1,25%, sendo a mistura submetida ao aquecimento, filtração e neutralização sob as mesmas condições anteriores. Após as digestões, o resíduo foi lavado seqüencialmente com 20 ml de álcool etílico concentrado e 10 ml de éter etílico 99%, com a finalidade de eliminar compostos indesejáveis

oriundos das digestões e, também, para facilitar a secagem do material. O resíduo seco foi transferido para um cadinho de porcelana, revestido com uma camada fina de amianto e levado à estufa a 105 °C por tempo necessário à obtenção de peso constante, para que assim fosse obtido o teor de fibras e minerais. Finalmente, esse mesmo material contido no cadinho foi levado a mufla a 600 °C, por 1 h, de modo que a calcinação resultasse na oxidação total das fibras. A diferença entre os pesos do cadinho seco e após a calcinação forneceu o teor de fibra bruta.

4.3 – Composição em Aminoácidos

A análise da composição de aminoácidos da farinha das folhas de salsa foi realizada em Sistema Biochrom 20 da Pharmacia-LKB. Amostras de farinha (20 mg) foram hidrolisadas com 1 ml de HCl 6 N, contendo fenol 1 % (p/v). A hidrólise foi realizada em ampolas de vidro, seladas sob atmosfera de nitrogênio, a 110 °C, em estufa, por 24 h. Após a hidrólise, as ampolas foram abertas e o HCl e fenol removidos sob pressão reduzida, em presença de NaOH. Em seguida, os resíduos foram lavados algumas vezes com água grau milli-Q e secos sob pressão reduzida em presença de pentóxido de fósforo. As amostras foram, então, redissolvidas em tampão citrato de sódio, pH 2,2, filtradas em membrana de 40 µm (Millipore) e submetidas à análise de aminoácidos. O conteúdo de aminoácidos foi determinado pelo método de SPACKMAN *et al.* (1958), que foi modificado e adaptado para o uso do sistema Biochrom 20 (Pharmacia).

O triptofano foi determinado segundo a metodologia descrita por PINTÉR-SZAKÁCS & MOLNÁR-PÉRL (1990). Amostras da farinha (60 mg) foram postas em contato com 2,5 ml do reagente Rn, composto por ninidrina 1% em HCl 37% + ácido fórmico 96%, na proporção de 2:3, por 2 h a 35 °C. Em paralelo, foram feitas as provas em branco para cada amostra usando-se o reagente citado, mas sem ninidrina (Ro). Após esse período, foram adicionados 2,5 ml de etanol absoluto,

sendo os materiais resultantes filtrados em lã de vidro. Dessa forma, alíquotas de 0,5 ml foram tomadas e a elas adicionados 2 ml do reagente Ro contendo etanol absoluto (E), na proporção de 1:4 (Ro/E). O teor de triptofano foi medido colorimetricamente a 380 nm, utilizando como referência uma curva padrão obtida com L-triptofano (Sigma).

4.4 – Natureza Química do(s) Componente(s) Tóxico(s)

A fim de avaliar se o(s) componente(s) tóxico(s) presente(s) nas folhas de salsa era(m) de natureza protéica, foi feita uma extração de proteínas como descrita a seguir.

4.4.1 – Extração de Proteínas

A extração das proteínas das folhas foi feita suspendendo-se a farinha, imediatamente após a maceração, em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo PVP 3%, DTT 5 mM e ácido ascórbico 5 mM, na proporção de 1:3 (p/v). A suspensão foi deixada sob agitação contínua por 2 h, 4 °C, sendo, em seguida, filtrada em pano de trama fina. O filtrado foi centrifugado a 10.000 x g, por 30 min, 4 °C e o sobrenadante obtido, denominado de extrato bruto, filtrado em papel de filtro (FIGURA 5).

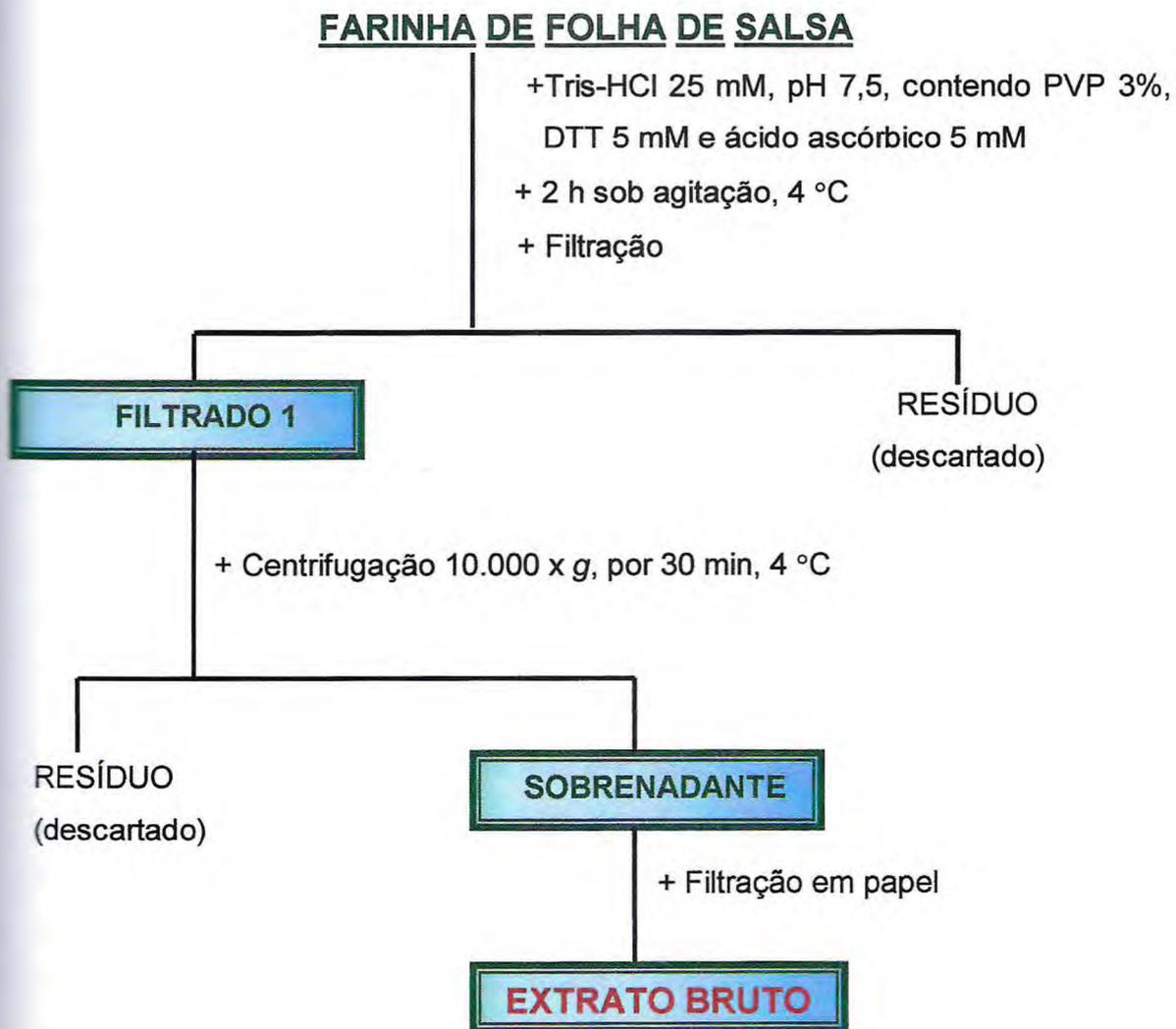


FIGURA 5 – Esquema de preparação do extrato bruto.

A detecção e dosagem de lectina foram realizadas através da atividade hemaglutinante seguindo a metodologia descrita por MOREIRA & PERRONE (1977), com algumas modificações (VASCONCELOS *et al.*, 1991). As amostras foram submetidas a diluições seriadas em tubos de ensaio (1/2, 1/4, 1/8...) em NaCl 150 mM. A 0,25 ml de cada diluição, foi adicionado igual volume da suspensão de hemácias, tratadas ou não com enzimas proteolíticas. Os tubos foram incubados a 37 °C, por 30 min, e deixados em repouso por aproximadamente 12 h à temperatura ambiente. Em seguida, estes foram centrifugados a 3.000 x g, por 30 segundos, e a visualização dos aglutinados foi observada a olho nu. Os resultados foram expressos em unidade de hemaglutinação (UH), a qual foi definida como sendo o recíproco da maior diluição ainda capaz de provocar aglutinação visível a olho nu.

A técnica para tratar enzimaticamente os eritrócitos foi estabelecida por LIS & SHARON (1972). Primeiramente, amostras de 1 ml de sangue foram lavadas três vezes com NaCl 150 mM e, em seguida, adicionada tripsina na relação de 0,1 mg de enzima para 10 ml da suspensão de eritrócitos. A suspensão foi deixada em repouso por 1 h, 4 °C, sob agitação ocasional, e centrifugada a 3.000 x g, por 5 min. Os eritrócitos foram novamente lavados (6 vezes) com NaCl 150 mM e o "pellet" de células resultante suspenso em um volume de NaCl 150 mM para obtenção de hemácias a 2%.

O ensaio de inibição da hemaglutinação foi realizado através da incubação das amostras com açúcares simples ou complexos ou, ainda, com soluções de glicoproteínas. Inicialmente as soluções de açúcares ou glicoproteínas foram diluídas seriadamente em tubos de ensaio em NaCl 150 mM. A 0,25 ml de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma solução de lectina encerrando 1,9 µg/ml, sendo, então, deixada em contato durante 30 min, a 37 °C. Em seguida, procedeu-se como descrito no ensaio de aglutinação. A inibição da aglutinação foi visualizada a olho nu.

4.5.2 – Toxina

A avaliação da toxicidade foi feita em camundongos swiss pesando entre 20–28 g, através da via intraperitoneal ou intravenosa. Neste ensaio foram usadas 6 doses, sendo que uma delas correspondia à menor quantidade de proteína ainda capaz de causar 100% de letalidade e uma outra que continha a maior quantidade de proteína incapaz de induzir toxicidade aguda. As outras quatro doses intermediárias encerravam teores que causavam a letalidade dos animais no intervalo entre 0 – 100%. Para cada dose, foram usados, no mínimo, 6 animais, relacionando a dose com o peso (LITCHFIELD & WILCOXON, 1949). A existência de atividade tóxica foi considerada quando se observou mortalidade em camundongos no período de 24 h, após injeção intraperitoneal, ou até 30 min, após injeção intravenosa, das amostras testadas. Uma unidade de DL₅₀ (VASCONCELOS *et al.*, 1994) foi definida como a quantidade de proteína (em g/kg de peso corpóreo) capaz de causar convulsão e morte em 50% dos animais testados.

4.5.3 – Inibidor de Tripsina

Para determinação do inibidor de tripsina foi empregada a técnica originalmente descrita por Kakade com algumas modificações (HAMERSTRAND *et al.*, 1981). Farinhas das folhas de salsa (0,02 g) foram suspensas em 1 ml de NaOH 0,01 N, deixadas sob agitação constante por 3 h à temperatura ambiente e, em seguida, em repouso por 30 min. Após esse tempo, foram retiradas alíquotas de 0,5 ml dos sobrenadantes, que foram misturadas com 0,5 ml de NaOH 0,01 N. As soluções resultantes foram centrifugadas a 14.000 x g, por 5 min. Após centrifugação, alíquotas de 0,1 ml dessas soluções foram retiradas e incubadas a 37 °C num meio de reação que consistia de 1,6 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,2,

contendo CaCl_2 20 mM, 0,1 ml de tripsina (solução estoque de 0,4 mg em 10 ml de HCl 0,001 N) e o substrato BAPNA. A reação foi interrompida com 0,2 ml de ácido acético 30% (v/v) e a leitura feita a 410 nm. Os resultados foram calculados considerando a curva obtida com SBTI (padrão) e expressos como a quantidade em mg de tripsina inibida (UI) por g de farinha.

Para dissolução de 10 mg do BAPNA foram usados, primeiramente, 0,5 ml de dimetilsulfóxido que, por sua vez, foi agitado vigorosamente em vortex até a completa dissolução do substrato. Em seguida, o volume foi completado para 1 ml com água milli-Q, sendo esta solução novamente agitada e usada imediatamente.

4.5.4 – Urease

A determinação da atividade ureásica foi feita como descrito por KAPLAN (1969), com algumas modificações (VASCONCELOS *et al.*, 1997). Alíquota de 0,1 ml de uma solução de uréia 500 mM foi misturada com 0,7 ml de EDTA 2%, tamponado com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 6,5. Após adição de 0,2 ml do extrato bruto (preparado com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, contendo NaCl 150 mM, sem DTT, usando o mesmo protocolo previamente descrito), a mistura foi incubada a 37 °C, por 15 min. A seguir, foram adicionados à mistura 1 ml da solução A (62 g de fenol + 0,25 g de nitroprussiato de sódio/l) e 1 ml da solução B (43 ml de hipoclorito de sódio 5,25 % + 20 g de hidróxido de sódio/l), sendo, então, deixada a 37 °C por mais 5 min. Passado esse tempo, foram adicionados 7 ml de água deionizada aos tubos, sendo estes cobertos com parafilme e agitados vigorosamente. As leituras das absorbâncias foram feitas a 625 nm e a atividade enzimática foi avaliada em relação a uma curva obtida com urease comercial (Sigma 41H7008 – 870.000 U/g).

4.6 – Purificação da Toxina de Salsa

4.6.1 – Fracionamento de Proteínas do Extrato Bruto com Sulfato de Amônio

Visando a obtenção de uma fração altamente tóxica, o extrato bruto foi fracionado com sulfato de amônio nos intervalos de 0-30%, 30-60% e 60-90% de saturação (FIGURA 6). As frações, $F_{0-30\%}$, $F_{30-60\%}$ e $F_{60-90\%}$, foram ressuspensas em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM. O excesso de sal de todas as frações obtidas, inclusive do sobrenadante final, foi removido através de diálise exaustiva contra Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. A distribuição das atividades biológicas nas frações, particularmente da tóxica, foi verificada. A atividade tóxica concentrou-se apenas na $F_{0-30\%}$. Essa fração também encerrou, praticamente, toda a atividade hemaglutinante.

4.6.2 – Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose

Alíquotas da $F_{0-30\%}$ (390 mgP) em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM foram aplicadas em coluna de DEAE-celulose (1,6 x 38 cm). A coluna foi previamente equilibrada com o mesmo tampão, porém sem DTT, uma vez que esse reagente apesar de ser fundamental para a manutenção da atividade tóxica, interfere na interação das proteínas com a resina, bem como com as leituras em 280 nm. A coluna foi percolada com esse mesmo tampão até a completa remoção das proteínas não retidas (DEAE-I). Em seguida, procedeu-se a eluição das proteínas retidas com a aplicação seqüencial do tampão de equilíbrio contendo NaCl nas seguintes concentrações: 0,6 M (DEAE-II); 0,8 M (DEAE-III) e 1 M (DEAE-IV). Todo procedimento cromatográfico foi realizado no coletor Pharmacia

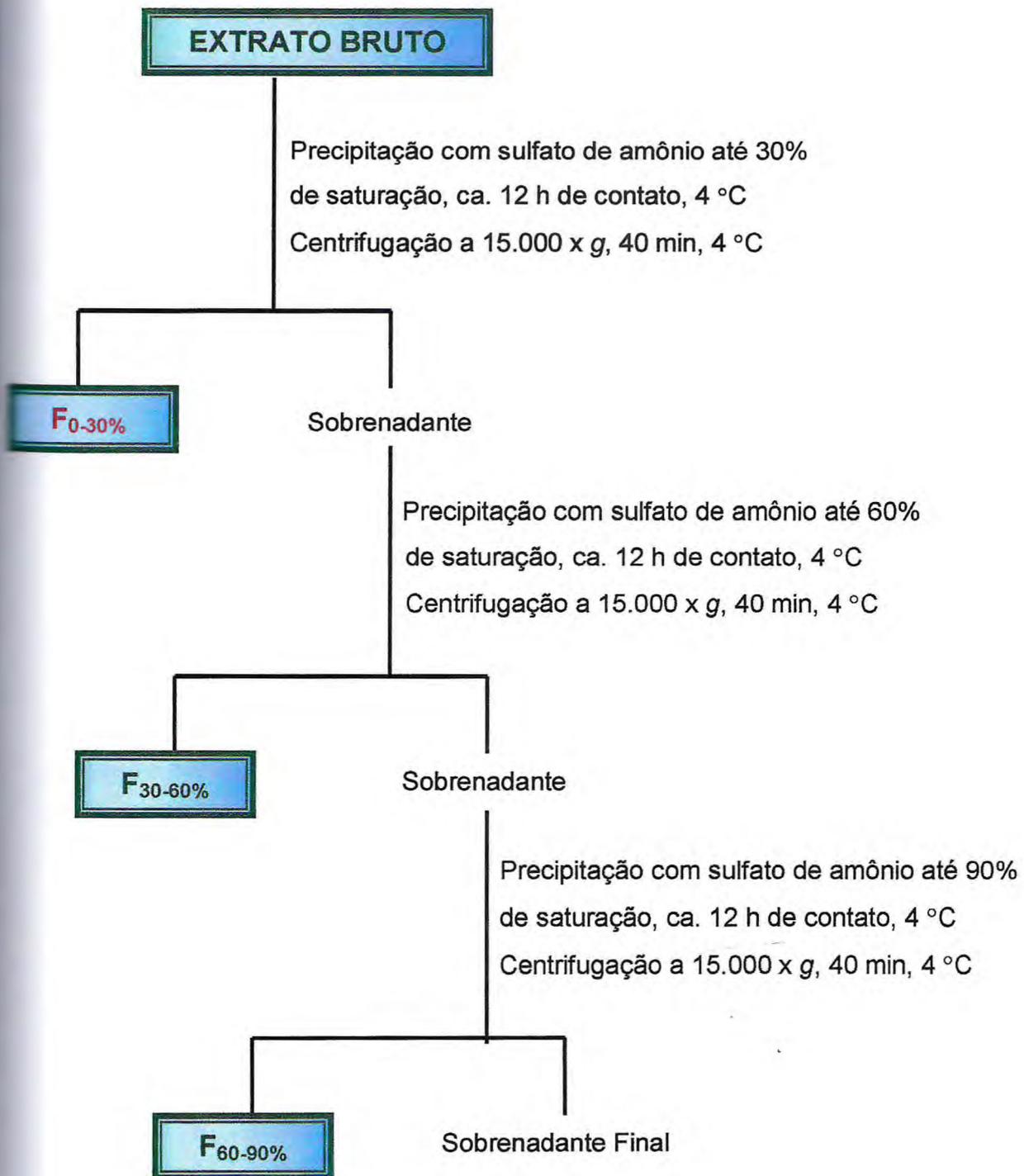


FIGURA 6 – Fracionamento do extrato bruto com sulfato de amônio.

LKB FRAC-100. Frações (6,6 ml) foram coletadas a um fluxo de 45 ml/h. Todo procedimento foi monitorado através de leituras das absorvâncias em 280 nm. Logo após as leituras das absorvâncias, DTT foi adicionado para uma concentração final de 5 mM. Posteriormente, foram feitos ensaios das frações coletadas, a cada 3 tubos, a fim de se detectar as atividades tóxica e hemaglutinante.

4.6.3 – Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sepharose 4B-Fetuína

Após cromatografia em coluna de DEAE-celulose, verificou-se que a fração protéica que encerrava toda a atividade tóxica concentrava, também, a atividade hemaglutinante. Diante disso, procedeu-se um ensaio de inibição da atividade hemaglutinante utilizando-se diferentes açúcares e glicoproteínas, no intuito de utilizar a cromatografia de afinidade para separar as atividades tóxica e hemaglutinante. Sendo a atividade hemaglutinante inibida por fetuína e avidina, optou-se por usar uma matriz de Sepharose 4B acoplada à fetuína.

A fração protéica eluída com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,6 M (DEAE-II) foi dialisada contra água destilada, concentrada por liofilização parcial, centrifugada a 14.000 x g (centrífuga "Eppendorf" 541 7R), 10 min, 4 °C e filtrada em papel de filtro. O sobrenadante (60 mgP) foi, então, aplicado à coluna de Sepharose 4B-fetuína (3 x 13 cm), previamente equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Logo após a entrada da amostra no gel, o fluxo da coluna foi interrompido por 1 h. Transcorrido o tempo de contato da amostra com o gel, o fluxo foi reiniciado e frações foram, então, coletadas. O primeiro pico (fetuína-I), concentrando as proteínas que não se ligaram à matriz, foi eluído com o próprio tampão de equilíbrio até não haver mais leitura de absorvância em 280 nm. Em seguida, foi aplicada uma solução tamponada de glicina-HCl 50 mM, contendo NaCl 150 mM, pH 2,6, para eluição do material retido (fetuína-II). A cromatografia foi realizada a um fluxo constante de 15 ml/h, sendo coletados 1,7 ml por tubo. Os

eluatos foram monitorados através de medidas da absorbância em 280 nm. Os tubos correspondentes às frações denominadas fetuína I e II foram reunidos, dialisados, concentrados por liofilização parcial e submetidos à determinação de proteínas e ensaios das atividades tóxica e hemaglutinante.

4.7 – Caracterização Físico-Química e Estrutural da Toxina de Salsa (Fetuína-II)

4.7.1 – Determinação da Massa Molecular por PAGE-SDS

A massa molecular da lectina foi estimada por eletroforese em gel de poli(acrilamida), na presença de SDS, seguindo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970), adaptada para o uso de placas. Os géis de aplicação e separação encerravam 3,5% e 12,5% de acrilamida, respectivamente. A proteína tóxica (1 mg/ml) foi dissolvida em Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, contendo 1% de SDS, na presença e ausência de 1% de β -mercaptoetanol, aquecida a 100 °C, durante 10 min, e centrifugada a 10.000 x g (centrifuga "Eppendorf" 541 7R), durante 5 min, 10 °C. O sobrenadante, antes de ser aplicado no poço, recebeu alguns cristais de sacarose e azul de bromofenol, para aumentar a densidade da amostra e permitir a visualização da corrida, respectivamente. Em seguida, foram aplicados 20 μ l por poço e a corrida conduzida a corrente constante de 20 mA por placa, durante 1 h. As bandas protéicas foram visualizadas revelando-se o gel com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987). A massa molecular aparente da toxina foi estimada a partir da curva construída com os Rfs dos seguintes marcadores de massa molecular: albumina sérica bovina (67,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), gliceraldeído-3-P-desidrogenase (36,0 kDa), anidrase carbônica (29,0 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,2 kDa).

4.7.2 – Determinação da Massa Molecular por Filtração em Gel

A massa molecular da toxina nativa foi determinada por filtração em gel de Sephadex G-100, em uma coluna (1,5 x 90 cm) previamente calibrada com os seguintes marcadores de massa molecular: albumina sérica bovina (67,0 kDa); anidrase carbônica (29,0 kDa) e citocromo C (12 kDa). A proteína tóxica (2 mg/0,5 ml) foi dissolvida em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo NaCl 150 mM, centrifugada a 10.000 x *g* (centrífuga “Eppendorf”), durante 5 min, a 4 °C, filtrada em membrana de 0,45 µm (Millipore), e o sobrenadante aplicado à coluna previamente equilibrada com o mesmo tampão. O fluxo da cromatografia foi regulado para 24 ml/h, sendo coletados 1,5 ml por tubo. A cromatografia foi monitorada através de leituras de absorbância a 280 nm.

4.7.3 – Determinação da Massa Molecular por Espectrometria de Massa

A massa molecular da toxina de salsa foi determinada pelo método de MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) em um aparelho BRUKER REFLEX™ TOF (Shimadzu), usando ácido α -cano-cinâmico saturado como matriz. A amostra (1 µl), encerrando 5-25 pmol de proteína, foi misturada com igual volume de ácido 2,5-diidroxibenzóico 10 mg/ml (em etanol 10%), seca à temperatura ambiente e analisada por espectrometria de massa. O espectro de massa foi determinado sob uma voltagem de 20 kV.

4.7.4 – Determinação do Ponto Isoelétrico

Os experimentos de eletrofocalização foram desenvolvidos em um aparelho “Phast System” (Pharmacia-LKB Biotechnology), utilizando-se um gel pré-fabricado de poliacrilamida (*Phast gel*, Pharmacia), enriquecido com anfólitos formando um gradiente de pH com valores de 3,0 a 9,0. Foram aplicados cerca de 25 µg da proteína tóxica solubilizada em NaCl 150 mM. A focalização isoelétrica foi realizada a 2000 V, 2,5 mA, a 20 °C, por 30 min. O gel foi corado com “Coomassie Brilliant Blue” R-250. O ponto isoelétrico (pI) da proteína tóxica foi determinado a partir de uma curva padrão obtida com os Rfs de marcadores de pI conhecidos.

4.7.5 – Análise da Composição de Aminoácidos

A análise da composição de aminoácidos da proteína tóxica foi conduzida em um analisador automático Alpha Plus (Pharmacia-LKB). A amostra (20 mg) foi hidrolisada com HCl 6 N, em ampolas de vidro seladas, sob atmosfera de nitrogênio, a 100 °C, em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 h). O conteúdo de aminoácidos foi determinado de acordo com o método de BIDLINGMEYER *et al.*, 1984.

O teor de triptofano foi determinado seguindo a metodologia descrita por GOODWIN & MORTON (1946). Uma amostra de proteína tóxica (1 mg) foi dissolvida em NaOH 0,1 N (1 ml) e as absorvâncias a 280 e 294 nm (Spectronic Genesys 8) determinadas. Para o cálculo do teor de triptofano aplicou-se a equação a seguir, usando-se o valor da tirosina obtido pela análise de aminoácidos.

$$\frac{M_Y \text{ (massa da tirosina)}}{M_W \text{ (massa do triptofano)}} = \frac{(0,592 \times A_{294} - 0,263 \times A_{280})}{(0,263 \times A_{280} - 0,170 \times A_{294})}$$

4.7.6 – Determinação da Seqüência de Aminoácidos NH₂-Terminal

A seqüência de aminoácidos NH₂-terminal da proteína tóxica foi determinada num seqüenciador automático de proteínas (Shimadzu PPSQ-10). Para tanto, uma amostra da proteína (1 mg/ml) foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (LAEMMLI, 1970) e, em seguida, eletrotransferida, através de um sistema "Trans blot" semi-seco (Multiphor II, Pharmacia-LKB) para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF, Sigma). A eletrotransferência foi conduzida a 0,8 V/cm² de gel durante 1,5 h. Ao término, a membrana foi corada com vermelho de Ponceau, para verificar a eficiência da transferência, lavada com água grau milli-Q e seca. As tiras da membrana contendo as subunidades da proteína tóxica foram recortadas e submetidas ao seqüenciamento. Os derivados feniltioidantoína dos aminoácidos (PTH-aminoácidos) foram detectados a 269 nm, após separação em uma coluna de fase reversa C₁₈ (4,6 x 2,5 mm), conduzida sob condições isocráticas de acordo com as instruções do fabricante. As seqüências selecionadas foram submetidas a alinhamento automático através do sistema NCBI-BLAST.

4.7.7 – Determinação do Espectro de Absorção

O espectro de absorção da proteína tóxica foi determinado em um espectrofotômetro Ultrospec III (Pharmacia-LKB), usando uma cubeta de quartz de 1 cm de caminho óptico. A proteína tóxica (1 mg) foi dissolvida em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e a absorção verificada na região de 220 a 340 nm O

espectrofotômetro foi zerado, nos diferentes comprimentos de onda analisados com o referido tampão.

4.7.8 – Estabilidade Térmica

Para avaliar a estabilidade térmica da proteína tóxica e calcular a energia livre de ativação necessária para iniciar o processo de desnaturação, amostras da proteína tóxica foram incubadas em banho-maria a 50, 60, 70, 80 e 90 °C. Alíquotas das amostras incubadas foram retiradas com 5, 10, 15, 30, 45 e 60 min que, após serem imediatamente resfriadas, foram centrifugadas a 10.000 x g (centrífuga “Eppendorf”), por 5 min, e os sobrenadantes utilizados em ensaios de hemaglutinação. A cada ensaio, uma amostra da proteína não aquecida foi usada como controle. Os resultados foram expressos como percentagem residual de aglutinação em relação ao controle.

A energia de ativação do processo de desnaturação foi calculada usando a equação de Arrhenius (DAWES, 1972):

$$\Delta G' = RT \ln (kT/k_1h)$$

Sendo:

$\Delta G'$ = energia livre padrão

R = constante dos gases (8,315 J/mol/K)

T = temperatura absoluta (K)

k = constante de Boltzman ($1,381 \times 10^{-23}$ J/K)

k_1 = velocidade da reação, dada por $k_1 = (\ln A/A_0)/s$

h = constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s)

A_0 = atividade hemaglutinante inicial

A = atividade hemaglutinante residual

4.7.9 – Determinação da Especificidade da Lectina

A reatividade da lectina purificada frente a açúcares simples e complexo, bem como a glicoproteínas, foi investigada por ensaios de inibição da atividade hemaglutinante. O protocolo utilizado foi o mesmo já descrito no item 4.5.1.

4.7.10 – Análise de Carboidratos por Cromatografia de Fase Reversa em HPLC

A análise de carboidratos da proteína tóxica foi realizada segundo a metodologia descrita por ZANETTA *et al.* (1999). A proteína tóxica (100 µgP/20 µl de H₂O) foi misturada com 1 ml de uma solução de lisina (1 µg/ml H₂O), agitada rapidamente, congelada e liofilizada. Ao material liofilizado foram adicionados 500 µl de uma solução contendo metanol 100% e HCl 0,5 N (1:1; v/v). Em seguida, essa mistura foi submetida ao aquecimento a 80 °C, por 24 h, e o solvente evaporado com o auxílio de nitrogênio. O material foi, então, ressuspenso em 200 µl de acetonitrila pura e 25 µl de anidrido heptafluorbutírico, aquecido em estufa a 128 °C, por 15 min e, novamente, secado com o auxílio de nitrogênio. Após essa etapa, 200 µl de acetonitrila foram adicionados, procedendo-se a retirada de alíquotas de 2 µl para uso na cromatografia gasosa (cromatógrafo Shimadzu GC 14^A, acoplado a uma coluna capilar 25QC3/BP1, filme 0,5 µm, fase SGE-France SARL). Nesse sistema, a amostra foi aplicada a um tubo capilar, onde o solvente foi evaporado sob pressão e a amostra impulsionada através da coluna seguindo um programa pré-estabelecido: 100 °C por 10 min, gradiente de 100 °C a 240 °C em 60 min e, finalmente 240 °C por 10 min, sob pressão constante de 12 psi (0,8 k/cm²). Como padrão foi utilizada uma mistura de diferentes açúcares simples (xilose, fucose, manose, galactose, ácido neuramínico etc.), cujo tempo de eluição foi previamente estabelecido. O percentual de cada carboidrato presente na

amostra foi determinado de acordo com a superfície de cada pico correspondente aos padrões utilizados.

4.7.11 – Cinética da Interação da Proteína Tóxica com Glicoproteínas Medida em Tempo Real por Ressonância Plasmônica de Superfície (BIAcore)

A avaliação da cinética de interação entre a proteína tóxica e diferentes glicoproteínas imobilizadas foi medida por ressonância plasmônica de superfície, em um biosensor BIAcore 3000™ (Biological Interaction Analysis Core) (Pharmacia Biosensor). Este aparelho utiliza “sensor chips” em camada de ouro contendo uma matriz específica capaz de fixar diferentes ligantes irreversivelmente. Nesse caso, várias glicoproteínas foram fixadas utilizando-se um kit reativo fornecido pelo fabricante. Nesse trabalho foi utilizado o sensor CM-5, designando a matriz de carboximetil para a fixação. Sobre esse sensor, as glicoproteínas foram fixadas seguindo o procedimento recomendado pelo fabricante, quatro por “sensor chip”. As proteínas e/ou glicoproteínas fixadas foram: lactotransferrina bovina (LTB), sorotransferrina humana (STF), mucina de estômago de porco (PSM), asialofetúina (ASIALO), glicolectina de jaca (jacalina), lectina de soja (SBA) e lectina de *Cratylia floribunda* (CFL).

Todos os ensaios de cinética foram conduzidos utilizando-se a proteína tóxica em duas diferentes concentrações, 100 µg/ml e 500 µg/ml, em tampão HBS-P. Os volumes de injeção foram de 25 µl e os experimentos monitorados a 5 µl/min. A primeira fase dos sensorgramas corresponde à fase de contato da proteína tóxica e o ligante durante 300 s, enquanto que a segunda fase, igualmente de 300 s, corresponde à fase de dissociação, quando o sistema foi lavado com HBS-P. Entre cada análise, o sistema foi automaticamente regenerado com 10 µl de HCl 100 mM, seguido de 10 µl de NaOH 100 mM e, posteriormente, HBS-P. Após esse procedimento, uma nova medida de afinidade foi efetuada.

4.8 – Atividades Biológicas da Toxina de Salsa

4.8.1 – Avaliação dos Efeitos da F_{0-30%}, Rica em Toxina, quando Administrada por Via Oral

No estudo de plantas tóxicas um fator relevante a ser considerado é o risco potencial para a saúde humana, uma vez que muitas toxinas podem ser veiculadas através de produtos de origem animal, principalmente o leite. Investigações dessa natureza são importantes não somente por estarem diretamente relacionadas à saúde do homem, mas também pelas perdas na criação animal devido aos prováveis efeitos tóxicos nos lactentes, uma vez que esses possuem uma menor capacidade de detoxificação (PANTER & JAMES, 1990).

Para avaliação dos efeitos da toxina por via oral foi utilizada a F_{0-30%}, em vez da toxina pura. A escolha dessa fração foi feita pelas seguintes razões: 1) Pelo baixo percentual da toxina (0,42%) em relação à proteína total e elevados custos envolvidos em seu processo de purificação, dificultando o acúmulo dessa proteína para uma avaliação nutricional e 2) Exigüidade de tempo para obtenção de quantidade de toxina adequada para o ensaio. A partir da seleção do material a ser avaliado foi feito o seguinte procedimento experimental: –

ETAPA 1: Acasalamento dos camundongos

Durante o período de acasalamento, camundongos swiss (machos e fêmeas; 1:5) foram alojados em gaiolas de plástico. Após constatação da prenhez,

as fêmeas foram separadas e mantidas individualmente em gaiolas, até o nascimento dos filhotes.

ETAPA 2: Formação dos grupos experimentais (FIGURA 7)

Logo após o nascimento dos filhotes, os animais foram divididos de modo a compor três grupos experimentais: um controle e dois tratamentos. Cada grupo foi constituído por 5 fêmeas lactantes com seus respectivos filhotes. A prole de cada fêmea foi mantida, o que acarretou uma relação mãe/filhote diferenciada. O grupo I foi intubado com NaCl 150 mM, enquanto os grupos II e III receberam a F_{0-30%}.

ETAPA 3: Intubação dos animais (FIGURA 7)

As fêmeas lactantes, juntamente com seus filhotes, foram alimentadas durante todo período experimental com ração comercial peletizada e água *ad libitum*. As amostras analisadas foram administradas a cada fêmea em duas doses, uma pela manhã e outra à noite. A ração foi retirada das gaiolas aproximadamente 6 h antes de cada intubação, mantendo-se a água. O grupo I, tido como controle, recebeu 3 ml de NaCl 150 mM, enquanto os grupos II e III foram intubados com 3 e 4 ml, respectivamente, da F_{0-30%} (8 mgP/ml). Os animais, após a intubação, foram mantidos 1 h sem ração e água.

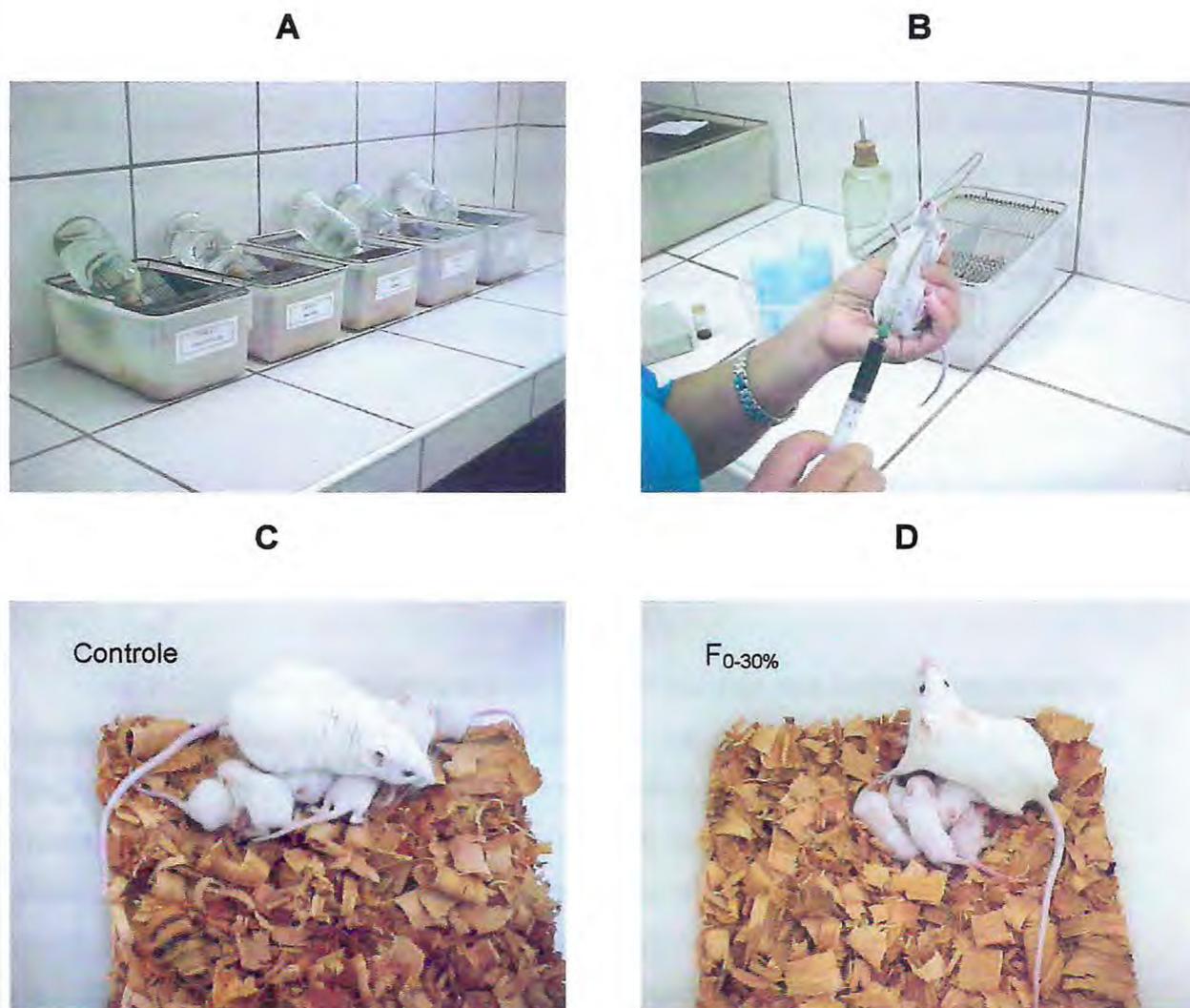


FIGURA 7 – Avaliação da toxicidade oral da F_{0-30%} para camundongos. A) Formação dos grupos experimentais; B) Intubação dos animais com a F_{0-30%}; C) Grupo I (controle – NaCl 150 mM) e D) Grupo III (Experimental – F_{0-30%}).

ETAPA 4: Parâmetros analisados

Cada fêmea lactante foi pesada a partir do 1° dia, a cada dois dias, até o 15° dia do experimento. Acompanhamento do peso dos animais das proles também foi feito durante o período experimental, sendo a pesagem feita por ninhada. Após o 15° dia de experimento, as fêmeas lactantes dos grupos controle e experimental foram sacrificadas com éter, procedendo-se à necropsia e coleta de alguns órgãos internos (fígado, rins, intestinos e estômago) para estudos histopatológicos.

4.8.2 – Avaliação da Atividade Inseticida da F_{0-30%}, Rica em Toxina

As informações concernentes ao papel fisiológico das lectinas presentes na família Convolvulaceae são raras. No entanto, as sugestões apontam para uma função de defesa dessas proteínas contra potenciais predadores (vertebrados e invertebrados). A exemplo do que ocorre com rizomas de *Calystegia sepium* e *Convolvulus arvensis*, a resistência da salsa ao ataque de invertebrados do solo corrobora com esse papel fisiológico. Essa resistência aparente pode ser a razão da persistência dessas ervas, criando dificuldades na agricultura do mundo inteiro (PEUMANS *et al.*, 1997). Assim sendo, nesse trabalho a atividade inseticida da salsa contra gorgulho (*Callosobruchus maculatus*) foi avaliada. Os experimentos foram conduzidos usando-se o extrato bruto e a F_{0-30%}. Na avaliação da toxicidade das frações a este bruquídeo, foi feito o seguinte procedimento experimental:

ETAPA 1: Obtenção e produção dos insetos

Os insetos foram obtidos em variedades comerciais de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] adquiridas em Fortaleza-CE, sendo identificados como *Callosobruchus maculatus*. No laboratório, os insetos foram mantidos em sementes suscetíveis de feijão-de-corda, sendo conservadas em recipientes de vidro vedados com um tecido poroso, acondicionados em câmara de crescimento do tipo BOD, a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro e umidade relativa do ar em torno de 70-80% (FIGURA 8).

ETAPA 2: Preparação da farinha

Sementes de feijão-de-corda (EPACE 10) foram selecionadas de modo que apresentassem tegumentos íntegros, fossem livres de injúria física ou mecânica e não mostrassem vestígios visíveis de contato prévio com insetos ou microorganismos (ovos, orifícios ou outros sinais típicos). Para obtenção da farinha, as sementes foram destegumentadas, trituradas em um processador e pulverizadas com auxílio de um pistilo.

ETAPA 3: Ensaio biológico

Para o ensaio de avaliação da toxicidade, sementes artificiais foram preparadas contendo farinha de feijão-de-corda (dieta padrão), ou o extrato bruto ou a $F_{0-30\%}$ de salsa liofilizados (dietas experimentais). As frações a serem testadas foram homogeneizadas na dieta padrão nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5 e 1,0%. Para o grupo controle, bem como para os grupos experimentais,

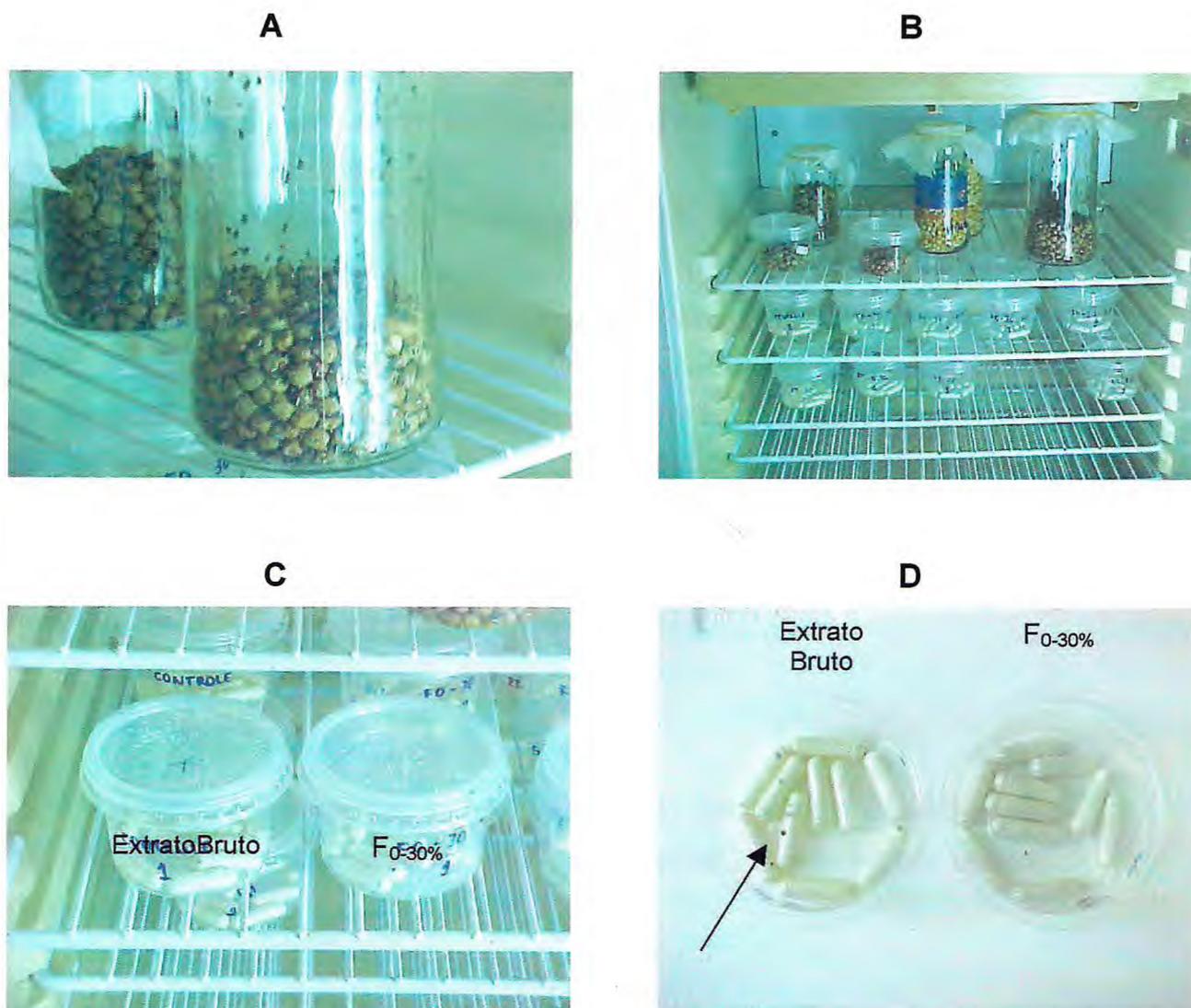


FIGURA 8 – Avaliação da atividade inseticida da $F_{0-30\%}$ para *Callosobruchus maculatus* (gorgulho). A) Manutenção dos insetos em sementes de feijão-de-corda; B) Acondicionamento das sementes e insetos em câmara de crescimento; C) Infestação das sementes artificiais com gorgulho e D) Sementes artificiais contendo as amostras testadas e ovoposição particularmente naquelas contendo o extrato bruto.

foram utilizadas 3 repetições, cada uma com 10 sementes artificiais. Após pesagem, as sementes foram colocadas em recipientes de plástico com tampas perfuradas e acondicionadas em câmara de crescimento (FIGURA 8). As condições de ensaio em relação ao fotoperíodo, à temperatura e umidade relativa do ar foram as mesmas já descritas.

Dois a três dias após a emergência dos insetos, as fêmeas foram separadas dos machos por um período de 24 h e postas para infestar as sementes artificiais (2 fêmeas para cada 10 sementes). Para cada tratamento foram comparados os seguintes parâmetros: percentagem de emergência das larvas; peso médio dos adultos recém-emergidos e tempo médio do ciclo (ovo a adulto). Os insetos que eclodiram das sementes foram contados e pesados diariamente.

4.10 – Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e a significância das diferenças entre as médias determinadas pelo teste de Tukey ($p > 0,05$), usando o programa MSTATC.

5. *RESULTADOS* *e DISCUSSÃO*

5.1 – Composição Centesimal

Os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídios, fibra bruta e carboidratos de folhas de salsa estão mostrados na TABELA 3. A análise da composição centesimal revelou que as folhas são ricas em proteínas e carboidratos não estruturais apresentando valores de $28,4 \pm 1,0$ e $42,9 \pm 1,2$ g/100 g de matéria seca, respectivamente. Os valores relativos à fibra bruta e cinzas foram $9,6 \pm 0,1$ e $10,6 \pm 0,1$ g/100 g de matéria seca, respectivamente. Já o conteúdo de lipídios foi apenas $2,9 \pm 0,2$ g/100 g de matéria seca.

Os valores referentes aos teores de proteína e de carboidratos foram superiores aos obtidos por EKPA (1996), quando analisou a composição química de folhas de salsa, encontrando $21,0 \pm 0,04$ g de proteína/100 g de matéria seca e $41,5 \pm 0,30$ g de carboidrato/100 g de matéria seca. Por outro lado, o conteúdo lipídico detectado nesse trabalho foi bastante inferior ao determinado por esse mesmo autor, cujo valor referido por ele foi de $8,00 \pm 0,21$ g/100 g de matéria seca. Baixos teores de lipídios em comparação às outras macromoléculas já eram esperados, tratando-se de órgãos vegetativos como as folhas. Tendo em vista que a espécie utilizada nesse trabalho foi a mesma estudada por EKPA, é possível que as diferenças entre os valores dos constituintes analisados sejam devidas à interferência de fatores genéticos e ambientais, tais como fertilidade e pH do solo, nutrição de nitrogênio, temperatura e estresse hídrico, como já sugerido por VASCONCELOS *et al.* (1997), quando encontraram variações no teor de proteínas para uma mesma espécie. Essa justificativa encontra respaldo na observação feita durante a execução desse trabalho, em que diferentes conteúdos protéicos foram detectados na salsa dependendo do período anual de coleta.

Dada a carência de dados disponíveis sobre a salsa, os resultados foram também comparados com informações relativas a outras espécies do mesmo gênero. Confrontando-se com os dados apresentados por WALLACE *et al.* (1998), verificou-se que o teor lipídico da salsa assemelha-se ao determinado em folhas de *Ipomoea involucrata* ($2,7$ g/100 g de matéria seca).

TABELA 3 – Composição química de folhas de salsa expressa em percentual do peso seco*

Constituinte	Salsa
Umidade	82,0 ± 0,0
Cinzas	10,6 ± 0,1
Proteína Bruta**	28,4 ± 1,0
Lipídio Total	2,9 ± 0,2
Fibra Bruta	9,6 ± 0,1
Carboidratos [#]	42,9 ± 1,2

* Os valores foram calculados considerando-se uma umidade final de 5,75%, por representar a água de estrutura/constituição não removível pela secagem a 105 ± 5 °C (SILVA, 1990).

** N x 6,25.

[#] Carboidratos não estruturais determinados por diferença.

No entanto, essa espécie apresentou conteúdo protéico (16,9 g/100 g de matéria seca) inferior ao da salsa. Em adição, verificou-se que o conteúdo de fibra bruta detectada em folhas de *Ipomoea involucrata* (17,1 g/100 g de matéria seca) corresponde quase ao dobro do determinado em folhas de salsa.

Quando se comparou o conteúdo protéico obtido nesse trabalho com os valores obtidos por ISHIDA *et al.* (2000), num estudo feito com *Ipomoea batatas* (batata doce), variedades beniazuma (BA) e koganesengan (KS), verificou-se que o teor de proteína bruta da salsa encontrava-se numa faixa intermediária em relação a dessas variedades, desde que os teores determinados corresponderam a 24,5 e 29,5 g/100 g de matéria seca para BA e KS, respectivamente. O conteúdo protéico observado para a salsa foi ainda superior ao da *Ipomoea eriocarpa*, cujos valores encontrados situaram-se na faixa de 15,0–20,8 g/100 g de matéria seca (KALLAH *et al.*, 2000).

Considerando-se que as folhas e ramos de salsa são consumidos por ruminantes durante a época de escassez de forragem, os resultados aqui apresentados permitem classificar a espécie, sob o ponto de vista quantitativo, como uma boa fonte de proteína. O teor protéico da salsa foi bastante superior ao de gramíneas (VIEIRA *et al.*, 1997) e assemelhou-se aos conteúdos protéicos de algumas dicotiledôneas empregadas no arraçamento de ruminantes (FARIAMARMOL *et al.*, 1996; MERO & UDÉN, 1998; DANA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2000).

5.2 – Composição em Aminoácidos

A composição em aminoácidos da farinha de folhas de salsa está mostrada na TABELA 4. Os resultados obtidos indicaram teores elevados de ácido glutâmico/glutamina (15,11 g/100 gP) e ácido aspártico/asparagina (9,43 g/100 gP) e baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados, cisteína + metionina, (0,70 g/100 gP).

TABELA 4 – Composição em aminoácidos da farinha de folhas de salsa e do ovo de galinha (padrão)

Aminoácido (g/100 gP)	Folhas de Salsa	Padrão Ovo
<i>Não-essenciais</i>		
Asx	9,43	
Glx	15,11	
Ser	4,24	
Gly	5,48	
Ala	7,16	
His	2,30	2,20
Arg	7,20	
Pro	5,27	
<i>Essenciais</i>		
Thr	5,21	4,70
Val	5,76	6,60
Ile	4,51	5,40
Leu	8,16	8,60
Lys	5,86	7,00
Tyr	5,62	9,30*
Phe	6,85	
Met	0,17	5,70**
Cys	0,53	
Trp	1,12	1,70
Total	99,98	

* Phe + Tyr.

** Met + Cys.

A análise qualitativa da proteína total de folhas de salsa revelou que apesar do teor protéico ser bastante elevado, como já discutido anteriormente, os conteúdos de quase todos os aminoácidos essenciais foram inferiores àqueles da proteína do ovo, considerada como padrão (FAO/WHO/UNU, 1985). Dentre os aminoácidos essenciais, apenas treonina e fenilalanina + tirosina se mostraram presentes em maiores quantidades quando comparados ao padrão. Embora o conteúdo de leucina (8,16 g/100 gP) tenha se destacado, predominando em relação a quase todos os outros aminoácidos, é importante salientar que o valor detectado ainda foi inferior ao da proteína padrão. No entanto, o que é mais intrigante é o baixo conteúdo de metionina e cisteína, 0,17 e 0,53 g/100 gP, respectivamente, valores esse inferiores ao de muitas leguminosas, que são consideradas fontes pobres de aminoácidos sulfurados (VASCONCELOS *et al.*, 1997, 2001; MAIA *et al.*, 2000). Resultados semelhantes foram encontrados por ISHIDA e colaboradores (2000) na análise de aminoácidos de *Ipomoea batatas*.

5.3 – Natureza Química do(s) Componente(s) Tóxico(s)

Embora tenha sido verificado que a salsa apresenta um conteúdo protéico satisfatório podendo representar uma alternativa para uso forrageiro, principalmente em épocas de escassez alimentar, têm sido observados sintomas de intoxicação em animais alimentados com folhas desta planta (DOBEREINER *et al.*, 1960; TOKARNIA *et al.*, 1979; PINHEIRO & SANTA ROSA, 1991; TOKARNIA *et al.*, 2000).

Apesar da toxicidade da salsa para ruminantes estar bem estabelecida, nesse trabalho utilizamos como modelo experimental camundongos, tendo em vista a facilidade de obtenção de animais e praticidade na elaboração e execução dos experimentos. Assim, o extrato bruto obtido de folhas de salsa quando injetado em camundongos, por via intraperitoneal ou intravenosa, foi capaz de exercer vários efeitos típicos. Dentre outros, observou-se dispnéia, convulsões tônico-clônicas e morte dos animais, dependendo da dose

utilizada (FIGURA 9). A sintomatologia apresentada pelo animal indicou comprometimento do sistema nervoso central, assim como foi observado com caprinos (MONTEIRO *et al.*, 1999). A atividade tóxica foi mantida mesmo após diálise do extrato bruto. No entanto, ocorreu perda de atividade quando o extrato foi submetido a 92 °C, sendo necessários apenas 2 min para abolir completamente a toxicidade anteriormente observada. Similarmente, o(s) componente(s) responsável(is) pela toxicidade mostrou(aram)-se instável(is) em pHs abaixo de 6,0 e acima de 8,0. Os resultados indicaram que a toxicidade das folhas de salsa foi oriunda, pelo menos em parte, de componente(s) de natureza protéica.

5.4 – Detecção e Quantificação de Componentes Protéicos Bioativos

No intuito de investigar a existência de componentes de natureza protéica envolvidos com a toxicidade, ensaios envolvendo a detecção de atividades tóxica e/ou antinutricional foram realizados como descritos na seção “MÉTODOS”. As atividades pesquisadas foram relacionadas à presença de lectina, toxina, inibidores de tripsina e urease.

5.4.1– Lectina

Ensaio de atividade hemaglutinante foram realizados com eritrócitos humanos (sistema ABO) e de diferentes espécies animais. Resultados positivos somente foram obtidos com eritrócitos tripsinizados de coelho (TABELA 5) e, ainda mais, após 12 h de contato. Por outro lado, a lectina não foi capaz de aglutinar eritrócitos provenientes de boi, cabra, ovelha, cavalo e cão, mesmo quando tratados com tripsina e outras enzimas proteolíticas, tais como papaína, bromelaína e subtilisina, sendo a leitura do ensaio feita após um tempo maior. Segundo LIS & SHARON (1986), o emprego de enzimas proteolíticas no tratamento de células sanguíneas promove a remoção de



FIGURA 9 – Convulsão e morte de camundongos causada pela toxina da salsa.

TABELA 5 – Componentes protéicos bioativos em extrato de folhas de salsa^a

Componentes	Atividade
Lectina*	93,9 ± 1,63 UH/mgP
Toxina**	0,45 ± 0,22 mg/10 g de peso corpóreo
Inibidores de Tripsina [#]	11,65 ± 1,03 UI/gF
Urease [§]	16,80 ± 1,18 U/gF

^a Cada valor representa a média de três determinações.

* A atividade lectínica foi expressa como unidades de hemaglutinação (UH) por miligrama de proteína (mgP). Uma UH é definida como o recíproco da maior diluição que é capaz de provocar aglutinação visível a olho nu.

** A atividade tóxica foi expressa como DL₅₀. Uma DL₅₀ representa a quantidade de proteínas em mg/kg de peso corpóreo que causa convulsões e morte em 50% dos animais quando injetados intraperitonealmente.

[#] A atividade inibidora de tripsina foi expressa em unidades de inibição (UI) por grama de farinha (gF). Uma UI refere-se à quantidade (mg) de tripsina inibida.

[§] A atividade ureásica foi expressa como unidades de urease (U) por grama de farinha (gF). 1 g de urease pura contém 870.000 unidades (Sigma).

polipeptídios associados à membrana celular. Essa ação das enzimas proteolíticas produz uma maior exposição de novos grupos de carboidratos e glicoconjugados presentes na superfície externa da membrana plasmática e reduz impedimentos estéricos, facilitando, assim, o reconhecimento da lectina e, por conseguinte, melhorando sua eficiência de aglutinação. A atividade hemaglutinante parece ter sido exclusivamente devido à presença de lectina e não promovida por polifenóis, taninos e lipídios, desde que ela foi completamente abolida pelo tratamento térmico (92 °C, 2 min) do extrato bruto.

É importante mencionar a inconsistência de aglutinação nos primeiros tubos do ensaio (1 ao 3). Algumas vezes, não se conseguiu visualizar aglutinados nesses tubos, ou se conseguiu, eles não se apresentaram bem definidos, se mostrando dispersos em vários grânulos. No entanto, a partir do quarto tubo, a aglutinação das células se mostrou com uma forma mais definida, consistindo num forte coágulo. É possível que os resultados verificados nos primeiros tubos se deva à possível interferência de inibidores endógenos de baixa massa molecular presentes no extrato bruto das folhas de salsa, estando diluídos no restante dos tubos. Além disso, é inegável a existência de uma hemolisina no extrato das folhas de salsa, dada a forte coloração vermelha nos primeiros tubos. Resultados semelhantes foram obtidos por MAIA (1996) e MATOS (1997) nos estudos realizados com extratos de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*). A presença de uma hemolisina já foi reportada também em sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (CASTRO-FARIA-NETO *et al.*, 1991).

5.4.2 – Toxina

O extrato bruto dialisado mostrou-se tóxico para camundongos quando injetado por via intraperitoneal ou intravenosa. O intervalo de tempo requerido para o surgimento dos primeiros sinais de intoxicação nos animais variou de 30 min a 12 h, dependendo da via de administração e da dose usada. Como era de se esperar, a aplicação por via intravenosa provocou o aparecimento de respostas mais rápidas. Os sintomas observados após a aplicação foram

piloereção, ataxia locomotora, dispnéia, convulsões tônico-clônicas, seguidas da morte dos animais. A DL_{50} para o extrato bruto foi $0,45 \pm 0,22$ mgP/10 g de peso corpóreo (TABELA 5). O desvio padrão calculado para essa dose foi considerado relativamente alto. No entanto, é provável que a presença de inibidores da toxina e, até mesmo, o alto conteúdo de carboidratos, presentes no extrato, tenham contribuído para a heterogeneidade dos valores referentes às doses capazes de matar 50% dos animais testados. Apesar disso, a DL_{50} encontrada para o extrato bruto de folhas de salsa pode ser considerada baixa, quando comparada com as DL_{50} de extratos brutos de sementes de vários cultivares de soja, cujos valores de DL_{50} alcançaram em média 880 mgP/kg de peso corpóreo (VASCONCELOS *et al.*, 1997; SOUSA, 2001).

5.4.3– Inibidor de Tripsina

O extrato alcalino de folhas de salsa foi capaz de inibir a tripsina (TABELA 5). A atividade inibidora de tripsina detectada em folhas de salsa foi $11,65 \pm 1,03$ UI/gF. Essa atividade foi decorrente da presença de $3,55 \pm 0,31$ mg de inibidor de tripsina/g de farinha. A ocorrência de inibidores de proteases em convolvuláceas do gênero *Ipomoea* já havia sido constatada. OBIDAIRO & AKPOCHAFU (1984) isolaram e caracterizaram dez inibidores de tripsina em tubérculos de *Ipomoea batatas*, dentre os quais três foram considerados mais ativos, cujas massas moleculares foram 12, 10 e 9,3 kDa, detectadas por cromatografia de filtração em gel de Sephadex G-100. Esses inibidores foram denominados de A₂, B₃ e C₁ e nas concentrações de 3,3 µg/ml, 2,4 µg/ml e 0,3 µg/ml, respectivamente, foram capazes de reduzir 35% da atividade original da tripsina (4 mg). Recentemente, SCOTT & SYMES (1996) também purificaram um inibidor altamente específico para tripsina, mas não tão efetivo para quimotripsina, em tubérculos de *Ipomoea batatas* cuja massa molecular foi 22 kDa.

5.4.4 – Urease

A farinha de folhas mostrou uma atividade ureásica correspondente a $16,80 \pm 1,18$ U/g de farinha, equivalentes a $0,02 \pm 0,00$ mg de urease/gF (TABELA 5). O estudo de ureases vegetais como possíveis fatores antinutricionais e/ou tóxicos vem sendo feito desde que POLLACO & HOLLAND (1993) verificaram haver alta homologia entre estas enzimas e as ureases microbianas. CUSSAC *et al.* (1992) sugeriram que as ureases vegetais poderiam mimetizar o efeito de ureases de bactérias, como promotoras de ulcerações gástricas.

5.5 – Purificação da Toxina de Salsa

Durante a purificação da toxina da salsa deparou-se, principalmente, com três grandes problemas. Um deles foi a forte pigmentação do extrato de folhas; o segundo foi a alta viscosidade apresentada pelo extrato e o terceiro a perda espontânea da atividade tóxica com poucos dias após a preparação do extrato. Na tentativa de contornar tais dificuldades, várias condições de preparação e acondicionamento do extrato, incluindo diferentes reagentes, foram testadas. Depois de muitas tentativas, verificou-se que a adição de PVP 3% foi crucial para diminuir a viscosidade e precipitar parte dos pigmentos e o ácido ascórbico 5 mM se mostrou eficaz na diminuição da oxidação do extrato, proporcionando a obtenção de um extrato mais límpido. Já o DTT, na concentração de 5 mM, foi fundamental para estabilizar a atividade tóxica, mantendo-a por vários meses. Provavelmente, pelo fato de tratar-se de um agente redutor, impediu a formação de pontes dissulfeto e, conseqüentemente, a formação de agregados multimoleculares. Assim, o tampão selecionado para a preparação do extrato foi Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo PVP 3%, ácido ascórbico 5 mM e DTT 5 mM. Nesse aspecto, a toxina da salsa comportou-se de maneira similar a soyatoxina e a toxina da soja, cujas atividades tóxicas

foram protegidas também pelo uso de DTT (VASCONCELOS *et al.*, 1994; SIEBRA, 1998).

A toxicidade por via intraperitoneal e intravenosa foi avaliada em cada etapa de purificação. Em paralelo, nas frações que se apresentaram tóxicas, foram testadas as atividades hemaglutinante, inibidora de tripsina e ureásica. A seguir, seguem todos os passos utilizados para purificação da toxina da salsa (FIGURA 10).

5.5.1 – Fracionamento de Proteínas do Extrato Bruto com Sulfato de Amônio

Durante o fracionamento com sulfato de amônio, quatro frações protéicas foram obtidas: F_{0-30%}, F_{30-60%}, F_{60-90%} e o sobrenadante final. O material protéico precipitado na faixa de 0-30% concentrou toda a toxicidade, ao mesmo tempo que promoveu aglutinação do eritrócitos tripsinizados de coelho. Dessa forma, a F_{030%} foi utilizada para dar continuidade à purificação da proteína tóxica.

5.5.2 – Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose

O perfil cromatográfico obtido em coluna de DEAE-celulose mostrou a existência de quatro frações protéicas distintas. Uma delas não interagiu com a resina nas condições de equilíbrio (DEAE-I), enquanto as outras, DEAE-II, DEAE-III e DEAE-IV foram eluídas com o tampão de equilíbrio contendo 0,6, 0,8 e 1,0 M de NaCl, respectivamente (FIGURA 11). Ensaio de atividade tóxica mostraram que a fração DEAE-II concentrou toda a atividade tóxica. Em paralelo, observou-se que os mesmos tubos que encerravam o material tóxico, também apresentavam atividade hemaglutinante. Assim é que, apesar dessa cromatografia ter sido de grande valia na separação da fração tóxica de outros componentes protéicos, essa etapa, no entanto, não conseguiu separar as atividades tóxica e hemaglutinante.

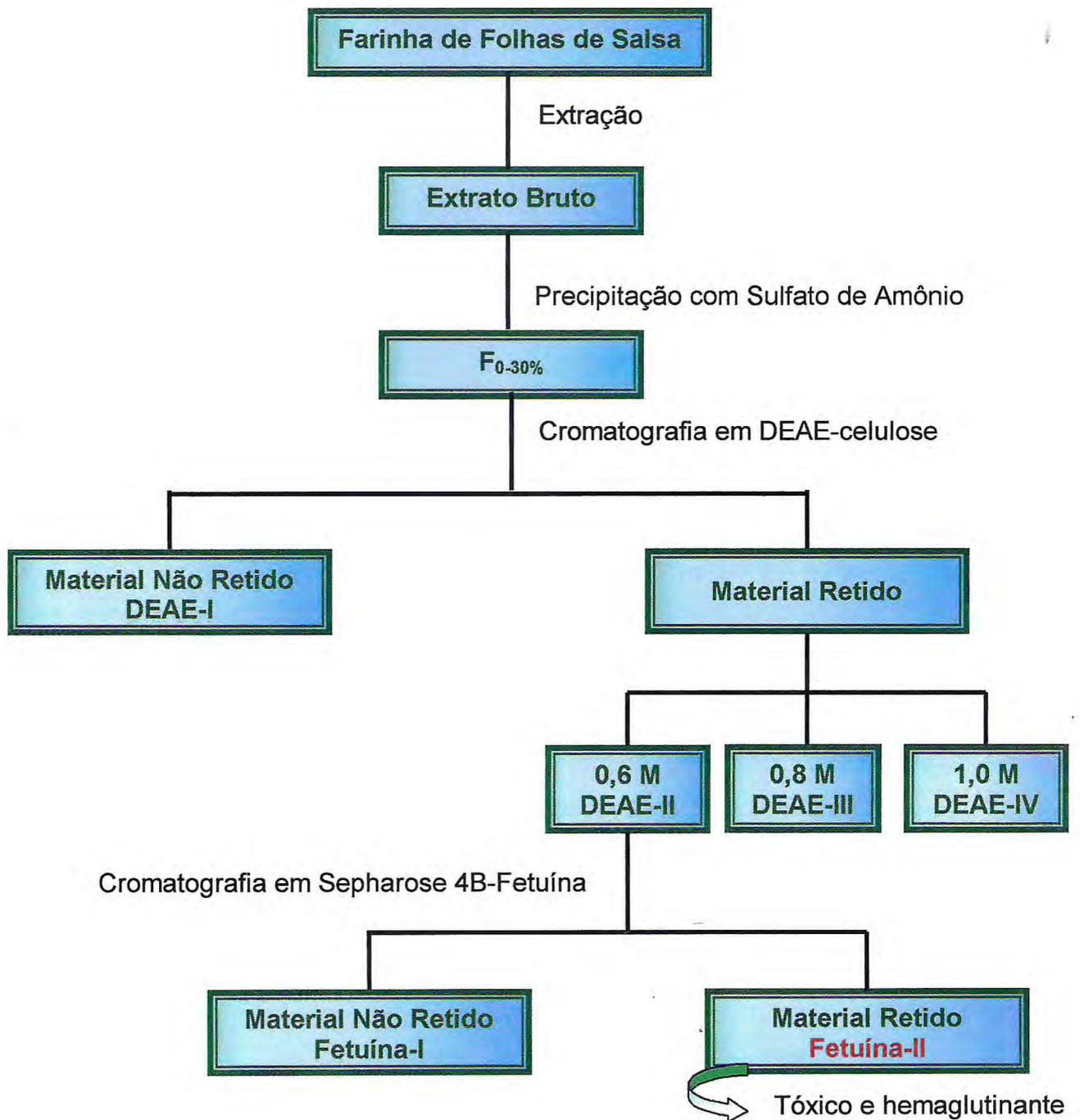


FIGURA 10 – Esquema de purificação da toxina da salsa.

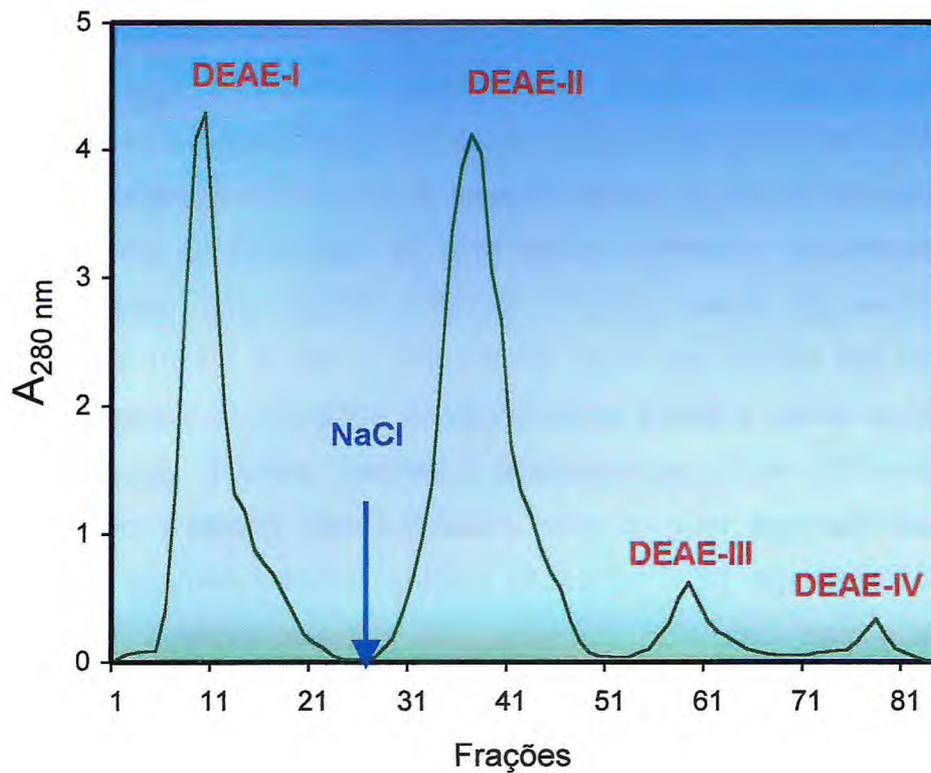


FIGURA 11 – Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. Amostra da F_{0-30%} (390 mgP), obtida por precipitação com sulfato de amônio (0-30%) foi aplicada numa coluna de DEAE-celulose (1,6 x 38 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. As proteínas retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio contendo diferentes concentrações de NaCl (0,6, 0,8 e 1,0 M). Fluxo: 45 ml/h; Fração: 6,6 ml.

5.5.3 – Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sepharose 4B-Fetuína

Uma vez que o material denominado DEAE-II encerrou ambas atividades, tóxica e hemaglutinante, optou-se pela cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-fetuína. A escolha dessa matriz foi baseada no fato da fetuína, uma glicoproteína, ter sido capaz de inibir a aglutinação de eritrócitos promovida pela fração DEAE-II. Porém, antes de relatar os resultados obtidos nessa etapa, é importante dizer que tendo em vista a dificuldade de inibição da atividade hemaglutinante frente a vários açúcares simples e complexos, diversas resinas cromatográficas foram utilizadas na tentativa de prender a lectina. Essas incluem: goma de guar, agarose-N-acetil-D-galactosamina, agarose-manose, quitina, sephadex G-50, agarose-N-acetil-D-glucosamina e agarose-manana. No entanto, nenhuma das matrizes testadas serviu como suporte de afinidade para a lectina, ou mesmo foi capaz de separar as frações com diferentes atividades (tóxica e hemaglutinante).

Quando a fração DEAE-II foi aplicada na coluna de Sepharose 4B-fetuína, duas frações protéicas foram obtidas (FIGURA 12). A primeira delas, denominada fetuína-I, não apresentou toxicidade para camundongos, nem promoveu a aglutinação de eritrócitos. Por outro lado, o material retido na coluna, e recuperado após aplicação do tampão glicina-HCl 50 mM, contendo NaCl 150 mM, pH 2,6, denominado de fetuína-II, foi altamente tóxico para camundongos, ao mesmo tempo que apresentou uma potente capacidade de indução da aglutinação de eritrócitos.

Uma vez que a atividade presente na fração DEAE-II foi também inibida por avidina, alternativamente utilizou-se uma coluna de agarose-avidina a fim de purificar a lectina. No entanto, embora essa coluna tenha sido capaz de prender a lectina, o rendimento e índice de purificação da proteína aglutinante foram inferiores aos obtidos na coluna de Sepharose 4B-fetuína. Assim sendo, optou-se, definitivamente, pela coluna de Sepharose 4B-fetuína.

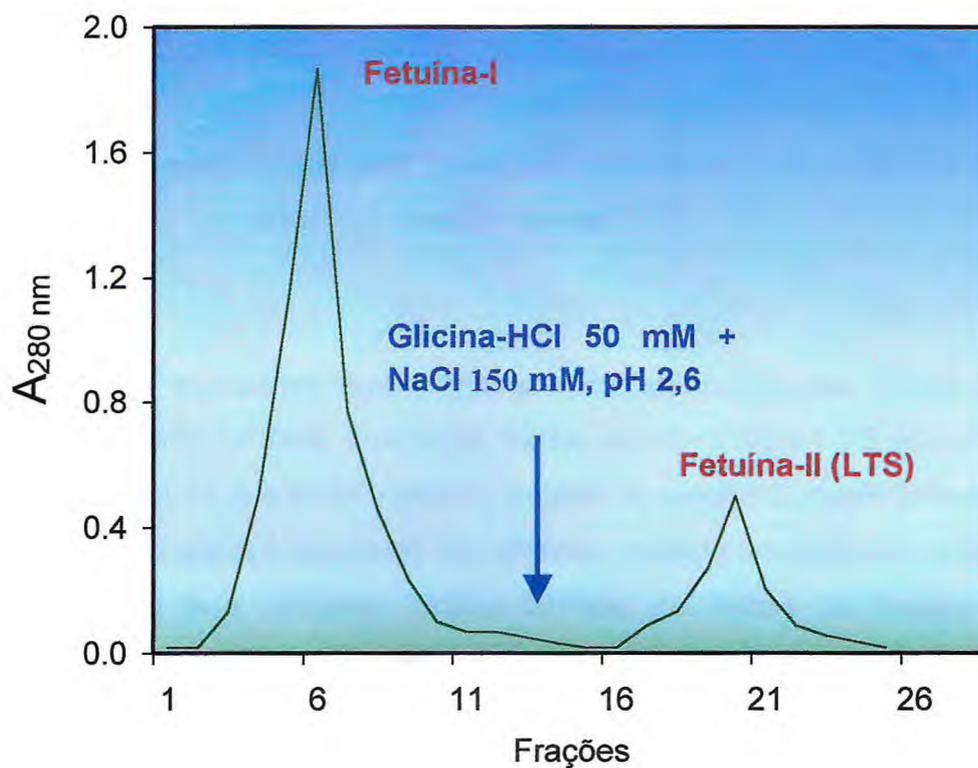


FIGURA 12 – Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-fetuína. A fração DEAE-II (60 mg de proteína), obtida por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, foi aplicada numa coluna de Sepharose 4B-fetuína (3 x 13 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. As proteínas retidas foram eluídas com tampão glicina-HCl, pH 2,6, contendo NaCl 150 mM. Fluxo: 15 ml/h; Fração: 1,7 ml.

Esses dados, juntamente com outros que complementarão este trabalho, mostram que a proteína responsável pela toxicidade das folhas da salsa é a mesma que induz aglutinação dos eritrócitos. Assim, o conjunto dos dados aqui apresentados comprovam a hipótese guia desta Tese:

“A atividade tóxica apresentada pela salsa, pelo menos em parte, é devida à presença de uma lectina”.

Dessa forma, a proteína aglutinante e tóxica purificada das folhas de salsa foi referida como Lectina Tóxica da Salsa, sendo a sigla LTS adotada como referência. A LTS é a quarta lectina isolada da família Convolvulaceae, sendo a segunda do gênero *Ipomoea*. No entanto, quando considerada a sua localização, a LTS é a primeira lectina isolada de folhas de espécies pertencentes à família Convolvulaceae.

Até recentemente, pouca atenção era dada a purificação de lectinas de folhas, presumivelmente pelo fato desses tecidos conterem baixas quantidades de lectina. O isolamento de uma lectina de folhas foi descrito pela primeira vez por TALBOT & ETZLER (1978), que trabalharam com *Dolichos biflorus*. Mais recentemente, foram isoladas lectinas de folhas em *Aloe vera* (alocatinas I e II) por AKEV & CAN (1999) e em *Bauhinia monandra*, por COELHO *et al.* (2000).

A quantidade recuperada de LTS por extração, fracionamento e purificação foi, aproximadamente, 1 mgP por 100 g de farinha de folha (TABELA 6). Esse conteúdo representa em torno de 0,42% da proteína total extraída. O rendimento da proteína total do extrato bruto usando-se sulfato de amônio foi em torno de 50%, sendo cerca de 40% e 30% das atividades hemaglutinante e tóxica, respectivamente, perdidas. É bastante provável que as perdas verificadas sejam reflexo da qualidade duvidosa do sal que foi utilizado, pois os grandes volumes de extrato não permitiram o uso de um reagente com maior grau de pureza. Assim mesmo, essa etapa foi mantida no protocolo de purificação, por ser fundamental na eliminação de boa parte dos pigmentos.

TABELA 6 – Purificação^a da lectina tóxica da salsa

Fração	mgP/100 gF*	Atividade Hemaglutinante			Atividade Tóxica		
		UH/mgP [†]	Índice de Purificação ^δ	Rendimento [®]	DL ₅₀ [§]	Índice de Purificação ^δ	Rendimento [®]
Extrato Bruto	240,45 ± 10,78	31,37	1,0	100	30,81 ± 1,70	1,0	100
F _{0-30%}	130,13 ± 11,87	33,51	1,1	60,8	23,41 ± 0,41	1,3	71
DEAE-II	32,09 ± 1,87	170,09	5,4	47,5	6,21 ± 0,90	5,0	66
Fetúina-II (LTS)	1,00 ± 0,01	24.094,12	768,1	36,2	0,22 ± 0,0	140,0	58

^a Os resultados representam a média e o desvio padrão de seis experimentos similares.

* Representa a quantidade total de proteína (mg) recuperada, em cada etapa de purificação, a partir de 100 g de farinha.

[†] Unidade de hemaglutinação por mg de proteína.

^δ Razão da UH/mgP, ou da DL₅₀, de cada fração em relação àquela do extrato bruto considerada como 1,0.

[®] Recuperação da atividade hemaglutinante total, ou da atividade tóxica, em cada etapa de purificação. As atividades hemaglutinante e tóxica no extrato total foram consideradas 100%.

[§] Uma DL₅₀ representa a quantidade de proteína em mg/kg de peso corpóreo de camundongo, capaz de produzir convulsão e morte em 50% dos animais testados, quando injetada por via intravenosa.

Em relação à toxicidade da LTS, pode-se dizer que essa proteína se apresenta como uma potente toxina para camundongos (0,22 mg/kg de peso corpóreo), desde que a sua DL_{50} foi bastante inferior a de outras toxinas vegetais, tais como a soyatoxina (7,4 mg/kg de peso corpóreo) e a toxina da soja (6,0 mg/kg de peso corpóreo), ambas purificadas da *Glycine max*, e a canatoxina (2,0 mg/kg de peso corpóreo), isolada de sementes de *Canavalia ensiformis*.

5.6 – Caracterização Físico-Química e Estrutural da Lectina Tóxica da Salsa

5.6.1 – Massa Molecular

A FIGURA 13 mostra o perfil eletroforético da LTS obtido em gel de poliacrilamida, na presença de SDS e β -mercaptoetanol. A LTS mostrou uma única banda protéica com massa molecular aparente de 44,0 kDa. Por PAGE-SDS, na ausência de β -mercaptoetanol, a LTS também apresentou uma única banda com migração semelhante. A visualização dessa banda protéica somente foi possível através da revelação por prata. A explicação para esse fato, provavelmente, encontra-se nas diferenças de capacidade de fixação do “Coomassie” a proteínas distintas, para a formação do complexo colorido (DELOBETTE *et al.*, 1991). De fato, uma das principais desvantagens do uso do “Coomassie” é a variabilidade da coloração do produto formado, primariamente, devido às diferenças no número de resíduos de arginina e lisina de um polipeptídeo para outro, como mostrado por CONGDON *et al.* (1993).

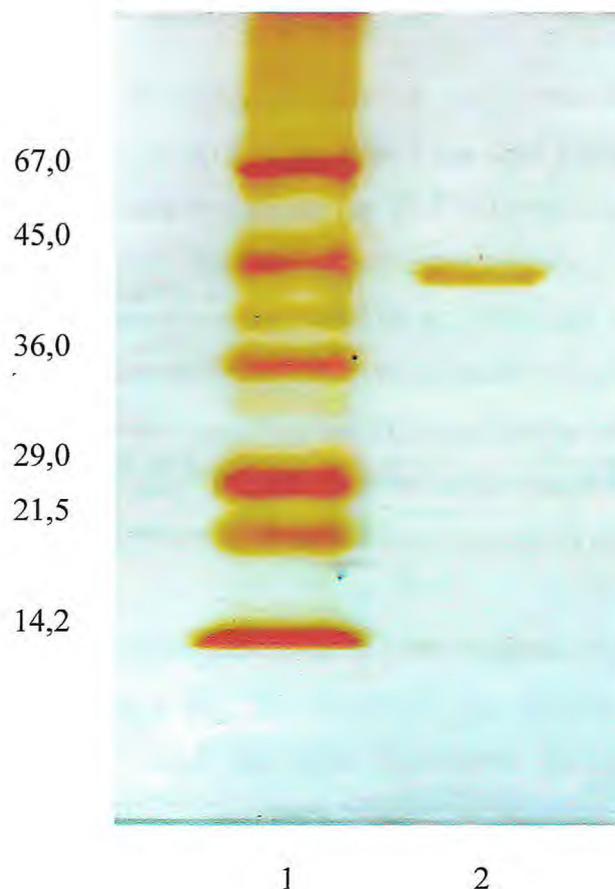


FIGURA 13 – Eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS e β -mercaptoetanol), revelada com prata. Linha 1 - Marcadores de massa molecular (α -lactoalbumina - 14,2 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz - 20,1 kDa; anidrase carbônica - 29,0 kDa; gliceraldeído-3-P-desidrogenase - 36,0 kDa; ovoalbumina - 45,0 kDa e albumina sérica bovina - 67,0 kDa). Linha 2 - Lectina tóxica de folhas de *Ipomoea asarifolia* (LTS).

Por cromatografia de exclusão molecular em gel de Sephadex G-100, a pH 7,5, a LTS foi resolvida num único pico, bem definido, com massa molecular de 40,5 kDa (FIGURA 14). Esse valor é muito próximo à massa molecular encontrada por PAGE-SDS.

Uma estimativa mais acurada da massa molecular foi obtida por espectrometria de massa, que revelou a presença de dois picos protéicos. O pico majoritário apresentou massa molecular de 38,5 kDa, enquanto o outro foi de apenas 19,3 kDa (FIGURA 15). Analisando as massas moleculares obtidas, observa-se que um valor corresponde exatamente ao dobro do outro. Assim, é possível que o material correspondente ao pico minoritário seja apenas um produto de degradação, ou mesmo um fragmento, da proteína relacionada com a massa molecular de 38,5 kDa, desde que as determinações de massa molecular para a LTS, empregando outras metodologias, mostraram valores nessa faixa.

Diferenças nas massas moleculares para uma mesma proteína têm sido relatadas, como verificada para a LTS (TABELA 7), quando empregadas metodologias diferentes. A lectina da alga *Gracilaria bursa-pastoris*, por exemplo, apresentou por PAGE-SDS massa molecular aparente de 30,0 kDa, enquanto que por filtração em gel foi encontrada uma massa molecular de 15,5 kDa (OKAMOTO *et al.*, 1990). Esses autores sugeriram que tais diferenças nas massas moleculares poderiam ser devido à natureza acídica ou glicoprotéica das proteínas, que por PAGE-SDS tendem a migrar mais vagarosamente, apresentando-se maiores do que realmente são. Resultados similares foram encontrados por BENEVIDES *et al.* (1996) nos estudos realizados com a lectina da alga *Solieria filiformis*.

Quando as massas moleculares da LTS foram comparadas com aquelas calculadas para lectinas purificadas e caracterizadas de membros das convolvuláceas, observou-se uma grande discrepância nos valores determinados. Essas lectinas apresentaram massas moleculares aparentes bem menores, variando de 14 a 18 kDa, quando estimadas por PAGE-SDS (IMANISHI *et al.*, 1997; PEUMANS *et al.*, 1997, 2000).

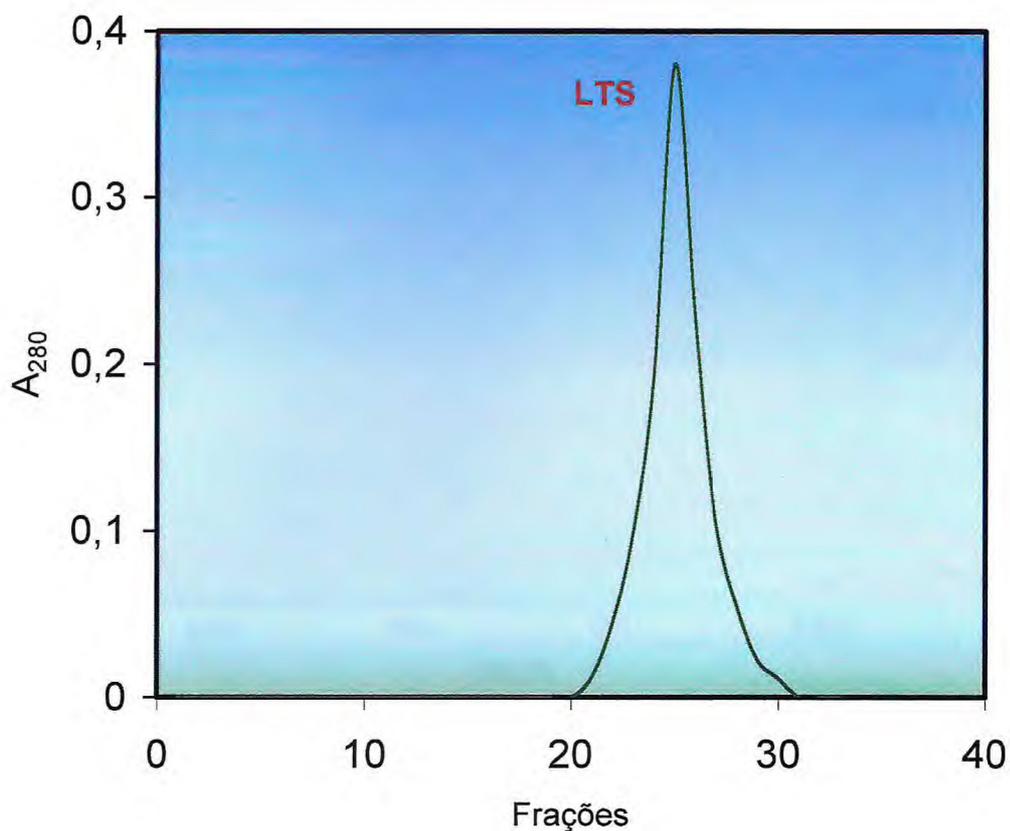


FIGURA 14 – Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100 (1,5 x 90 cm) da lectina tóxica da salsa. A coluna foi calibrada com os seguintes marcadores de massa molecular: albumina sérica bovina (66,0 kDa); anidrase carbônica (29,0 kDa) e citocromo C (12 kDa). A lectina tóxica (2 mg/0,5 ml) foi dissolvida em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo NaCl 150 mM, e aplicada à coluna previamente equilibrada com o mesmo tampão. Fluxo: 24 ml/h; Fração: 1,5 ml.

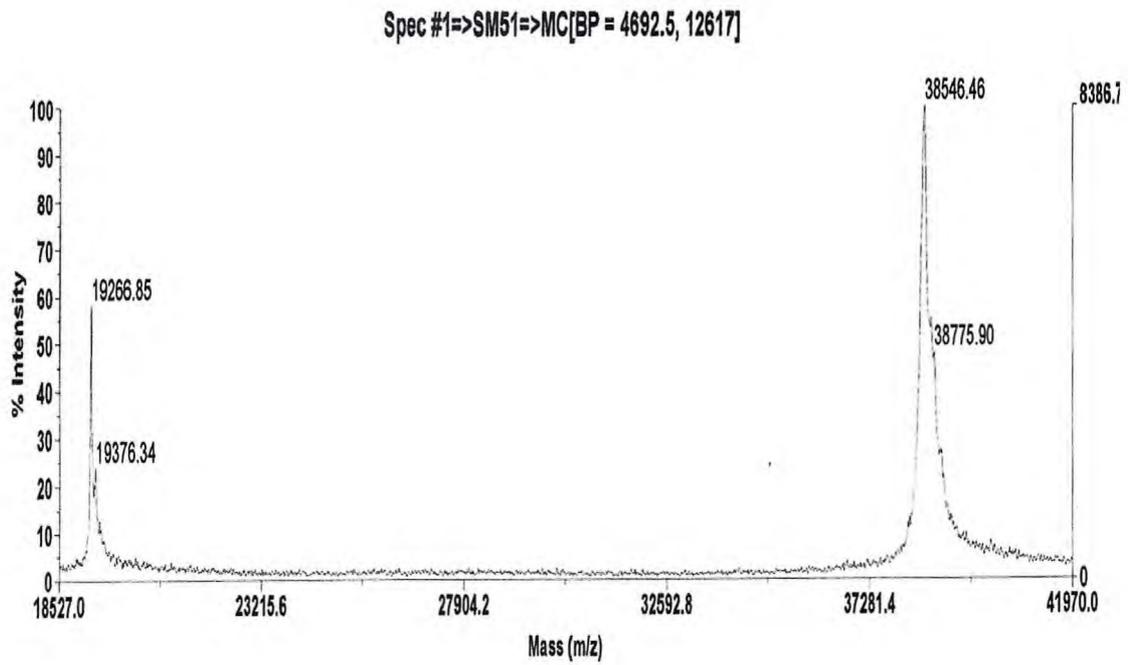


FIGURA 15 – Espectrometria de massa da lectina tóxica da salsa.

TABELA 7 – Massas moleculares da lectina tóxica da salsa por diferentes técnicas

Técnica	Massa Molecular
PAGE-SDS	44,0 kDa
Cromatografia de Exclusão Molecular	40,5 kDa
Espectrometria de Massa	38,5 kDa e 19,3 kDa

5.6.2 – Ponto Isoelétrico

O ponto isoelétrico (pI) da LTS foi 5,7. Esse pI ácido está de acordo com o alto teor de resíduos ácidos na estrutura protéica, particularmente de aspártico/asparagina, confirmando a natureza ácida da proteína. Um outro fato que comprova esse valor de pI, é a interação da LTS com a resina de DEAE-celulose a pH 7,5. A comparação do pI da LTS com o de uma outra lectina isolada de uma espécie da mesma família da salsa, *Calystegia sepium*, cujo valor de pI calculado foi 6,07, mostra similaridade nos valores determinados (VAN DAMME *et al.*, 1998). Valores ácidos de pI foram encontrados para várias outras lectinas, tais como aquelas isoladas de *Maclura pomifera*, *Sophora japonica* (GODSTEIN & PORETZ, 1986), *Erythrina velutina* (MORAES *et al.*, 1996), *Vatairea macrocarpa* (CAVADA *et al.*, 1998) e *Luetzelburgia auriculata* (MELO, 2001).

5.6.3 – Composição em Aminoácidos

A composição em aminoácidos da LTS está mostrada na TABELA 8. A LTS mostrou elevados teores dos aminoácidos alanina (13,38%), glicina (11,95%), ácido aspártico/asparagina (10,70%) e ácido glutâmico/glutamina (7,98%) e baixos conteúdos de metionina (0,41%) e cisteína (0,11%). Esses dados assemelham-se à composição de aminoácidos de outras lectinas isoladas de plantas pertencentes à mesma família, caracterizadas por um alto conteúdo de aminoácidos ácidos. Similarmente ao verificado com a LTS, os teores de aminoácidos básicos e sulfurados são baixos nas lectinas de convulváceas estudadas até então (IMANISHI *et al.*, 1997; PEUMANS *et al.*, 1997). Esse perfil de aminoácidos sulfurados da LTS é também encontrado em muitas lectinas vegetais, particularmente naquelas isoladas de representantes das leguminosas (SINGH & SINGH, 1992).

TABELA 8 – Composição em aminoácidos da lectina tóxica da salsa

Aminoácido (g/100 gP)	LTS
<i>Não-essenciais</i>	
Asx	10,70
Glx	7,98
Ser	7,26
Gly	11,95
Ala	13,38
His	1,17
Arg	2,97
Pro	6,27
<i>Essenciais</i>	
Thr	6,41
Val	6,88
Ile	4,06
Leu	6,62
Lys	5,19
Tyr	2,04
Phe	4,16
Met	0,41
Cys	0,11
Trp	2,45
Total	100,01

5.6.4 – Seqüência de Aminoácidos NH₂-Terminal

A seqüência dos onze primeiros resíduos da extremidade NH₂-terminal da LTS foi NGXIATLSLIPY. Essa seqüência não apresenta homologia com estruturas primárias de outras proteínas depositadas no banco de dados do NCBI (National Center of Biotechnology Information). Por outro lado, quando a consulta foi feita no “PDB protein database” foi encontrada uma identidade de 87% entre a LTS e uma convertase, uma metaloendopeptidase envolvida no processo de espermatogênese.

5.6.5 – Espectro de Absorção

O espectro de absorção de uma solução de LTS, encerrando 1 mg/ml, revelou uma absorção máxima a 280 nm (FIGURA 16). O coeficiente de extinção, $\epsilon^{1\%}_{1\text{ cm}}$, apresentado pela LTS foi 4,8. Esse valor foi muito próximo ao encontrado para a lectina de *Luetzelburgia auriculata*, cujo $\epsilon^{1\%}_{1\text{ cm}} = 5,2$ (MELO, 2001).

5.6.6 – Estabilidade Térmica

LTS foi relativamente estável ao calor, preservando sua atividade mesmo quando aquecida a 70°C, por 60 min. No entanto, a 80 °C a atividade hemaglutinante foi praticamente abolida dentro de 10 min (FIGURA 17). Quando considerada a atividade tóxica, comportamento similar ao da atividade aglutinante foi observado. A energia de ativação do processo de desnaturação ($\Delta G'$) para a LTS foi estimada em 93,36 kJ/mol, valor esse bastante próximo ao encontrado para *Artocarpus incisa* (99,81 kJ/mol) (MONTEIRO, 1998). Esse dado subsidia a

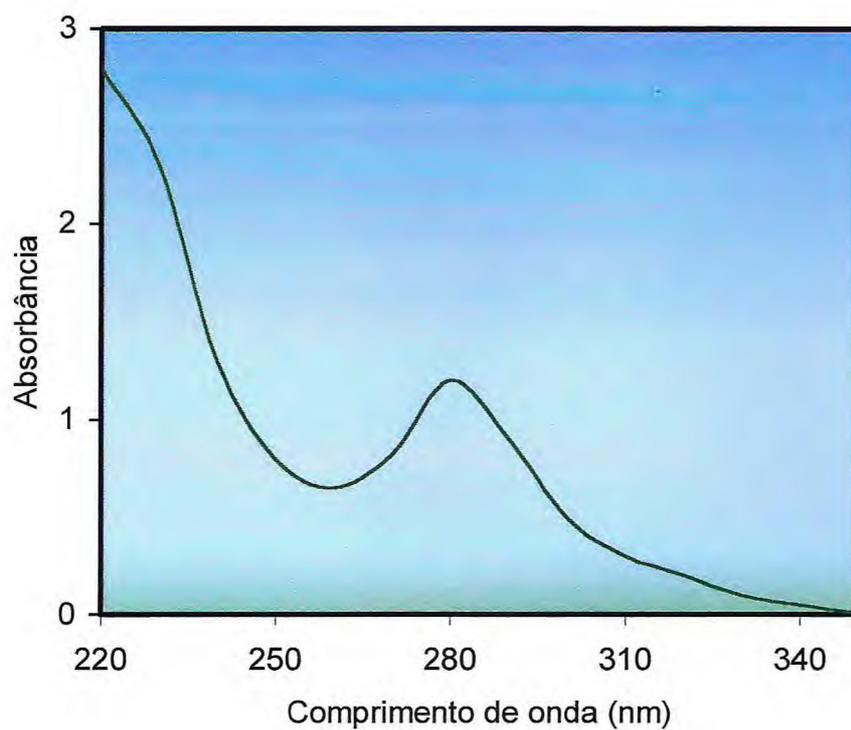


FIGURA 16 – Espectro de absorção da lectina tóxica da salsa. As absorbâncias da proteína (1 mg/ml) foram registradas na faixa 220 a 340 nm.

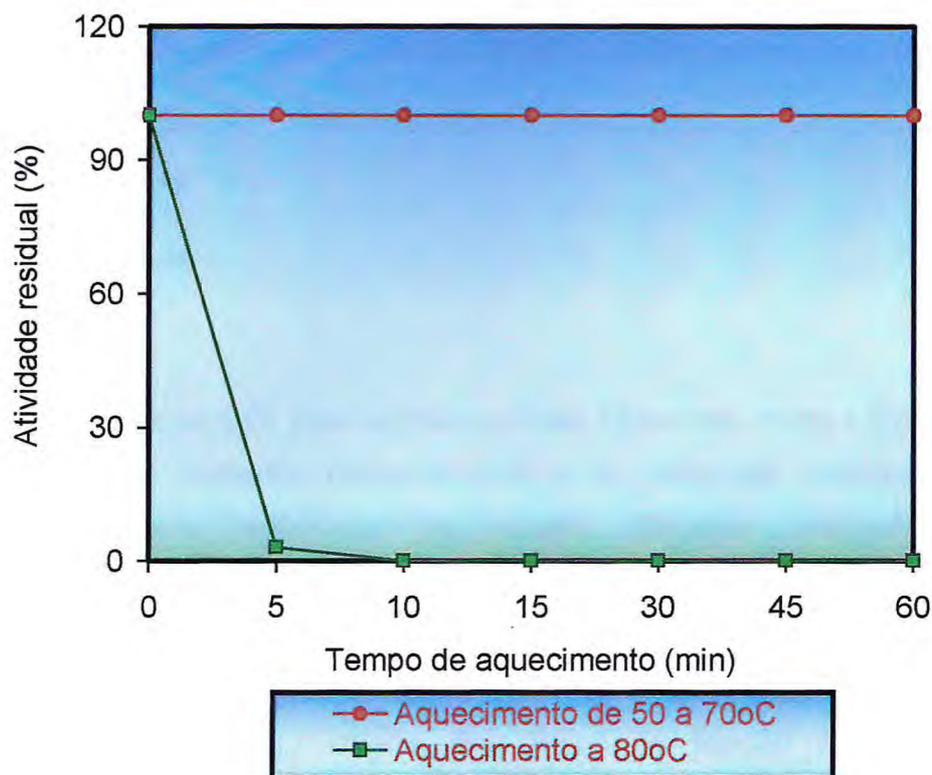


FIGURA 17 - Atividade hemaglutinante residual (%) da lectina tóxica da salsa submetida a diferentes temperaturas e intervalos de tempo.

colocação feita por VAN DAMME *et al.* (1998) de que as lectinas de convolvuláceas são consideradas como subgrupos pertencentes à família das lectinas relacionadas a jacalina. Moderada resistência ao calor foi verificada também para algumas lectinas de leguminosas, apresentando atividade hemaglutinante residual mesmo após exposição a altas temperaturas (GRANT *et al.*, 1999).

5.6.7 – Especificidade

A capacidade da LTS para aglutinar células foi testada frente a suspensões (2%) de eritrócitos humanos (sistema ABO) e de diferentes animais. A LTS aglutinou fortemente eritrócitos de coelho tratados enzimaticamente, particularmente com tripsina (TABELA 9). Entretanto, essa proteína foi capaz de induzir apenas uma fraca aglutinação de células de cavalo e ovelha. Dessa maneira, de acordo com PEUMANS & VAN DAMME (1995), a LTS é uma hololectina, possuindo, pelo menos, dois sítios de ligação a carboidratos. Diferentemente do que ocorreu com o extrato bruto de salsa, a atividade hemaglutinante foi observada em menor tempo, comprovando a colocação feita anteriormente da existência de um inibidor da lectina no próprio extrato. Adicionalmente, não se observou hemólise no ensaio de aglutinação.

Quando eritrócitos de boi, cabra, cão e do homem foram utilizados, não se verificou qualquer traço de aglutinação (TABELA 9). Essa diferença na atividade hemaglutinante pode ser devida à natureza das glicoproteínas presentes na superfície dessas células, que não são reconhecidas pela LTS ou o são apenas fracamente.

A especificidade da LTS foi determinada através da inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos simples, complexos e glicoproteínas (TABELA 10). Dentre os diferentes mono-, oligossacarídeos e glicoproteínas testados, a hemaglutinação de eritrócitos de coelho por uma solução encerrando 1,9 µg/ml de

TABELA 9 – Atividade hemaglutinante^a da lectina tóxica da salsa frente a suspensões (2%) de eritrócitos de diferentes espécies, tratados com tripsina

Eritrócitos	Atividade Hemaglutinante (U.H./ml)
<i>Humano</i>	
A ⁺	ND*
B ⁺	ND
O ⁺	ND
<i>Animal</i>	
Coelho	4096
Cavalo	16
Ovelha	8
Cabra	ND
Carneiro	ND
Boi	ND
Cão	ND

^a UH unidade de hemaglutinação que corresponde o inverso da maior diluição capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos a 2%.

* Aglutinação não detectada na concentração de 1 mg de lectina.

TABELA 10 – Inibição da atividade aglutinante de eritrócitos de coelho, promovida pela lectina tóxica da salsa, por mono-, oligossacarídeos e glicoproteínas

Carboidrato	Concentração Mínima ($\mu\text{g/ml}$)*
D-glucose	NI**
D-galactose	NI
D-manose	NI
L-frutose	NI
D-xilose	NI
N-acetil-D-galactosamina	NI
N-acetil-D-glucosamina	NI
N-acetil-D-neuramínico	965,6
D-arabinose	NI
D-rafinose	NI
α -lactose	NI
Maltose	NI
Sacarose	NI
Clara de ovo	NI
Albumina	NI
Mucina	NI
Avidina	312,5
Fetuína	39,1

* Concentração mínima de açúcar ou glicoproteína requerida para inibir uma solução de lectina.

** Não inibiu.

LTS foi inibida por fetuína (39,1 µg/ml), avidina (312,5 µg/ml) e ácido N-acetil-D-neuramínico (965,6 µg/ml). Assim, é possível concluir que a LTS possui uma afinidade maior por fetuína, uma sialoglicoproteína presente no soro fetal bovino.

A fetuína contém dois tipos de oligossacarídeos em sua estrutura, sendo um ligado *N*-glicosidicamente a um resíduo de asparagina, e o outro ligado *O*-glicosidicamente a resíduos de serina ou treonina, não possuindo qualquer tipo de oligomanosídeo em sua estrutura. Uma de suas principais características é a carga fortemente negativa associada à presença de resíduos de ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico) nas extremidades não redutoras das *O*- e *N*-glicanas (ASHIDA *et al.*, 2000). Entretanto, SIKDAR & CHATTERJEE (1991) verificaram que estes resíduos de ácido siálico não afetaram a atividade hemaglutinante da crotalarina, lectina de *Crotalaria striata*, uma vez que fetuína e asialofetuína foram igualmente ativas na inibição da aglutinação de hemácias induzida por essa proteína. Similarmente, WRIGHT *et al.* (2000) chegaram a mesma conclusão com a lectina de *Scilla campanulata*. Outros carboidratos presentes na fetuína têm sido ressaltados como potenciais sítios de ligação à lectina. Esses incluem os resíduos de *O*-*N*-acetilglucosamina e *O*-manose presentes em *N*-glicanas, resíduos de *O*-*N*-acetilgalactosamina presentes em *O*-glicanas e resíduos de *O*-*D*-galactose presentes em ambas, *O*- e *N*-glicanas (BERMAN, 1986).

O ácido *N*-acetilneuramínico, que está presente na estrutura da fetuína, foi também capaz de inibir a atividade hemaglutinante. Ele é um monossacarídeo formado por nove átomos de carbono derivado da *N*-acetilmanosamina, que não ocorre no reino das plantas, mas é ubíquo em glicoconjugados animais, constituindo os gangliosídeos, os mais complexos esfingolipídios encontrados em altas concentrações no sistema nervoso central, particularmente na massa cinzenta, onde constituem 6% dos lipídios. Dentre as várias funções propostas para os gangliosídeos, uma delas é a sua participação na condução dos impulsos nervosos (LENHINGER *et al.*, 1993). A inibição da atividade hemaglutinante pelo ácido *N*-acetilneuramínico é um dado interessante, pois a sintomatologia decorrente da intoxicação pela salsa, assim como pela LTS, sugere

comprometimento do sistema nervoso. Várias lectinas vegetais demonstram afinidade por esse monossacarídeo, como por exemplo, as lectinas isoladas de germe de trigo (WGA) (ZENG & GABIUS, 1992), *Vatairea macrocarpa* (RAMOS *et al.*, 1999), *Maackia amurensis* (KNIBBS *et al.*, 1991) e *Luetzelburgia auriculata* (MELO, 2001).

Os resultados de inibição da atividade hemaglutinante inerente a LTS diferem dos encontrados para as lectinas isoladas de outras espécies pertencentes à família *Convolvulaceae*. Os principais exemplos são as lectinas de *Calystegia sepium* e *Convolvulus arvensis*, ambas com afinidade específica por manose/maltose (PEUMANS & VAN DAMME, 1997; PEUMANS *et al.*, 2000) e a lectina de *Ipomoea batatas*, galactose-ligante (IMANISHI *et al.*, 1997).

5.6.8 – Teor de Carboidratos

A LTS contém cerca de 4,4% de carboidratos em sua estrutura, demonstrando ser uma glicoproteína. Muitas lectinas já isoladas apresentam cadeias glicídicas ligadas covalentemente a resíduos de aminoácidos, cujo conteúdo de carboidratos pode atingir até mais de 50% das suas massas moleculares, como é o caso da lectina de batata, *Solanum tuberosum* (SHARON, 1993). Nesse aspecto, a LTS e a lectina de batata diferem daquelas isoladas de *Calystegia sepium* (PEUMANS *et al.*, 1997), *Helianthus tuberosus* (VAN DAMME *et al.*, 1999) e *Dioclea guianensis* (VASCONCELOS *et al.*, 1991), que não apresentaram carboidratos em suas estruturas.

5.6.9 – Análise de Carboidratos por Cromatografia de Fase Reversa em HPLC

As cadeias glicídicas da LTS são compostas por manose (29,2%), fucose (27,0%), N-acetil-glucosamina (23,6%) e xilose (20,2%) (TABELA 11). Esses carboidratos têm sido freqüentemente encontrados em lectinas glicoprotéicas vegetais, particularmente naquelas de leguminosas (CAVADA *et al.*, 1998; SHARON & LIS, 1989). Por outro lado, as lectinas isoladas da família das solanáceas apresentam predominantemente arabinose e galactose como constituintes da porção glicídica (LIS & SHARON, 1991).

5.6.10 – Cinética da Interação da LTS com Glicoproteínas

A análise de interações específicas em tempo real usando o sistema BIAcore™, com o objetivo de determinar a especificidade fina da lectina por estruturas glicanas complexas, revelou que dentre as proteínas e/ou glicoproteínas testadas, lactotransferrina bovina, sorotransferrina humana, mucina de estômago de porco e asialofetuína, nenhuma mostrou resposta expressiva, nem mesmo quando testadas a uma concentração de 500 µg/ml. Similarmente não houve interação entre a LTS e as lectinas de *Glycine max* (SBA), *Cratylia floribunda* (CFL) e *Artocarpus integrifolia* (jacalina) (Anexo I). No entanto, a interação de lectinas com glicoproteínas já se encontra bem documentada (BROEKAERT *et al.*, 1987; RATANAPO *et al.*, 1998; VAN DAMME *et al.*, 1999).

Particularmente os resultados obtidos com a asialofetuína merecem destaque, sugerindo que o ácido siálico presente na estrutura da fetuína participa ativamente na interação da LTS com essa glicoproteína, como observado na cromatografia de afinidade usando a resina de Sepharose 4B-fetuína e no ensaio de inibição da atividade hemaglutinante. Corroborando com essa hipótese é

TABELA 11 – Composição de carboidratos da lectina tóxica da salsa

Monossacarídeos/Açúcares derivados	Massa Molecular	Massa (μg)
Fucose	164	0,24
Galactose	180	0,00
Manose	180	0,26
Glucose	180	0,00
N-Acetilgalactosamina	221	0,00
N-Acetilglucosamina	221	0,21
Ácido N-acetil-neuramínico	309	0,00
Xilose	150	0,18
Ramnose	150	0,00
Arabinose	150	0,00
Ribose	150	0,00
Ácido Glucurônico	194	0,00
Ácido Galacturônico	194	0,00

o fato do ácido N-acetil-D-neuramínico, que é um ácido siálico, ter sido também capaz de inibir a aglutinação de eritrócitos promovida pela LTS. No entanto, os resultados sugerem, ainda, que apesar do ácido siálico ser importante, ele não é o único ligante da LTS, uma vez que a quantidade desse ácido requerida para inibir a atividade aglutinante da lectina em estudo foi bem maior do que àquela de fetuína, indicando a participação de outros componentes no processo de reconhecimento e ligação celular.

5.7 – Avaliação dos Efeitos da F_{0-30%}, Rica em LTS, quando Administrada por Via Oral

A TABELA 12 e FIGURA 18 mostram o peso corpóreo das fêmeas lactantes submetidas a intubação orogástrica com a F_{0-30%}, obtida do extrato bruto de folhas de salsa, durante 15 dias. Quando os valores correspondentes aos animais dos grupos experimentais II e III, intubados com 3 e 4 ml da F_{0-30%}, respectivamente, foram comparados aos do grupo I (controle), verificou-se que as médias de ganho de peso das fêmeas lactantes dos grupos II e III foram significativamente inferiores às dos animais do grupo I. Em termos percentuais, as fêmeas do grupo II apresentaram uma redução no ganho de peso em torno de 44,3%. Quando as fêmeas do grupo III, que receberam uma maior dose da F_{0-30%}, foram comparadas com as fêmeas do grupo controle, verificou-se uma diminuição no ganho de peso equivalente a 87,3%, praticamente o dobro da verificada no grupo II. Esses resultados evidenciam a participação de componentes tóxicos presentes na F_{0-30%} e, ainda, mostram que os efeitos são dose-dependentes.

A grande variação no ganho de peso dentro de cada grupo pode ser devida às diferenças de idade e condições físicas das fêmeas, que foram escolhidas aleatoriamente dentro da população disponível no biotério, não tendo sido feita qualquer padronização antes do experimento, além do peso corpóreo. Ademais, as fêmeas intubadas com a F_{0-30%} apresentaram sinais clínicos de intoxicação, tais

TABELA 12 – Peso corpóreo (g) obtido pela intubação orogástrica de fêmeas lactantes

	Grupo I*	Grupo II**	Grupo III §
Peso Inicial	30,4 ± 1,4 ^a	31,0 ± 2,8 ^a	32,7 ± 1,4 ^a
Peso Final	38,3 ± 2,1 ^a	35,4 ± 1,4 ^b	33,7 ± 1,0 ^c
Variação no Peso	7,9 ± 2,1 ^a	4,4 ± 1,8 ^b	1,0 ± 1,5 ^c

Letras iguais na horizontal referem-se a valores não significativamente diferentes ($p < 0,05$), teste de Tukey, programa MSTATC.

* Grupo I – controle (NaCl 150 mM)

** Grupo II – F_{0-30%} (3 ml)

§ Grupo III – F_{0-30%} (4 ml).

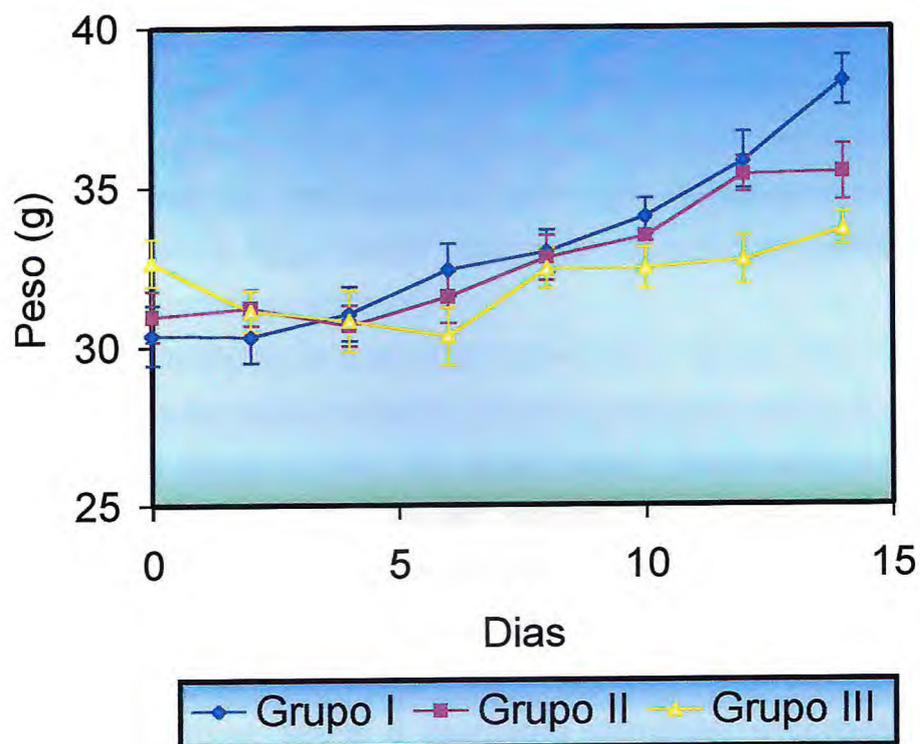


FIGURA 18 – Curvas de crescimento dos camundongos lactantes (n = 5) intubados orogasticamente. Grupo I – controle (NaCl 150 mM); Grupo II – F_{0-30%} (3 ml) e Grupo III – F_{0-30%} (4 ml).

como comportamento apático, diarreia, tremores musculares e dispnéia. As fêmeas do grupo controle apresentaram comportamento normal.

Quando avaliado o peso total das proles dos diferentes grupos, observou-se que os filhotes do grupo I apresentaram um maior ganho de peso, do que aqueles cujas mães foram intubadas com a $F_{0-30\%}$. No entanto, as médias de ganho de peso das proles dos grupos II e III não apresentaram diferenças significativas (TABELA 13). É provável que uma queda na quantidade de leite produzido pelas fêmeas intoxicadas com a $F_{0-30\%}$, tenha sido capaz de provocar alterações no desempenho dos camundongos aleitados.

O exame histopatológico de tecidos provenientes do fígado, rins, estômago e intestinos das fêmeas lactantes intubadas orogastricamente com a $F_{0-30\%}$ revelou alterações apenas no fígado e rins. Em geral, houve preservação parcial da arquitetura lobular do fígado. As lesões encontradas nesse órgão foram predominantemente focais e caracterizadas pela ocorrência de necrose média zonal, megalocitose e presença de grupos de hepatócitos com degeneração vacuolar e picnose dos núcleos. No parênquima renal as lesões foram necrose liquefativa tubular multifocal, atrofia e destruição glomerular e congestão dos vasos da camada medular.

Da mesma forma que foi verificado com as fêmeas lactantes, a análise histopatológica de tecidos provenientes do fígado, rins, estômago e intestino das proles revelou um quadro semelhante ao descrito para as mães correspondentes. Entretanto, as lesões encontradas nas proles foram de menor intensidade. No fígado dos filhotes cujas mães lactantes foram intubadas com a $F_{0-30\%}$, diferentemente daqueles do grupo controle (FIGURA 19), ocorreu degeneração hidrópica vacuolar moderada, picnose no núcleo dos hepatócitos e necrose média zonal leve (FIGURAS 20, 21 e 22). Porém, a exemplo do que ocorreu com as fêmeas lactantes, a arquitetura lobular hepática dos filhotes foi preservada. Nos rins, ao contrário do observado no grupo controle (FIGURA 23) houve necrose liquefativa tubular multifocal, atrofia glomerular e congestão dos vasos da camada medular, semelhantemente ao que ocorreu nas fêmeas lactantes (FIGURA 24). As proles do grupo controle não mostraram alterações.

TABELA 13 – Peso corpóreo (g) da prole de fêmeas lactantes intubadas orogastricamente

	Grupo I*	Grupo II**	Grupo III §
Peso Total	24,8 ± 2,2 ^a	18,3 ± 2,8 ^b	17,8 ± 2,7 ^b
Peso Individual	4,1 ± 0,4 ^a	3,1 ± 0,5 ^b	3,0 ± 0,5 ^b
Ganho Diário [¶]	3,6 ± 0,9 ^a	2,5 ± 1,2 ^b	2,6 ± 1,5 ^b

Letras iguais na horizontal referem-se a valores não significativamente diferentes ($p < 0,05$), teste de Tukey, programa MSTATC.

* Grupo I – controle (NaCl 150 mM)

** Grupo II – F_{0-30%} (3 ml)

§ Grupo III – F_{0-30%} (4 ml).

¶ Ganho de peso diário (g/dia/prole).

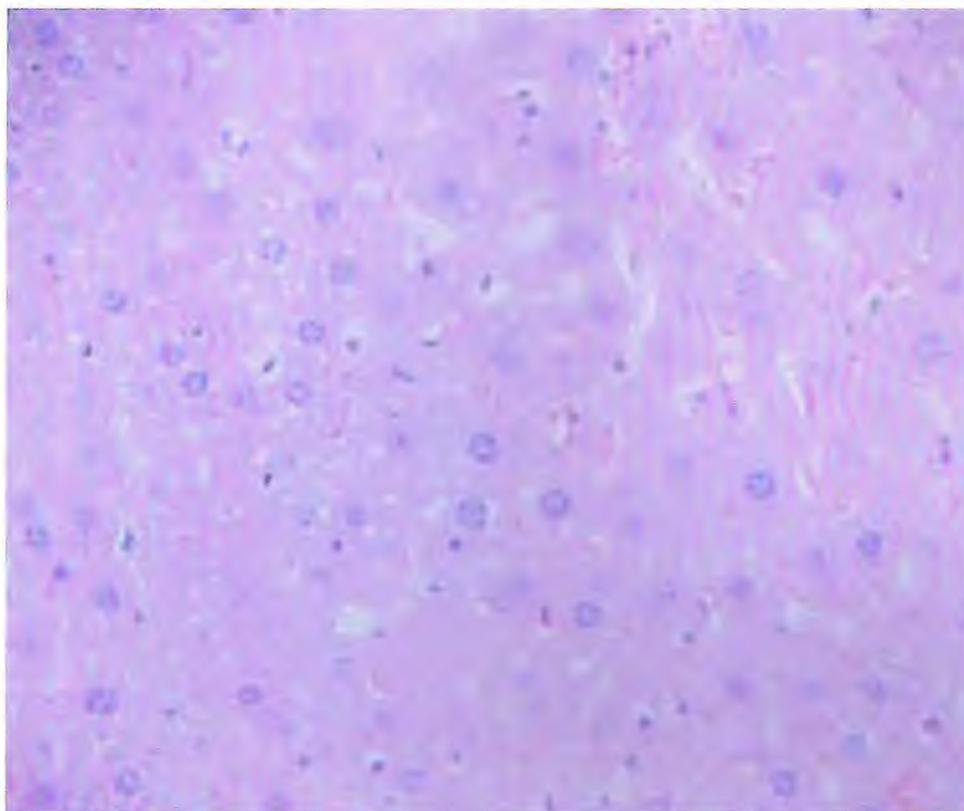


FIGURA 19 – Fotomicrografia de corte histológico do fígado da prole cuja mãe lactante foi intubada com NaCl 150 mM (Grupo controle).

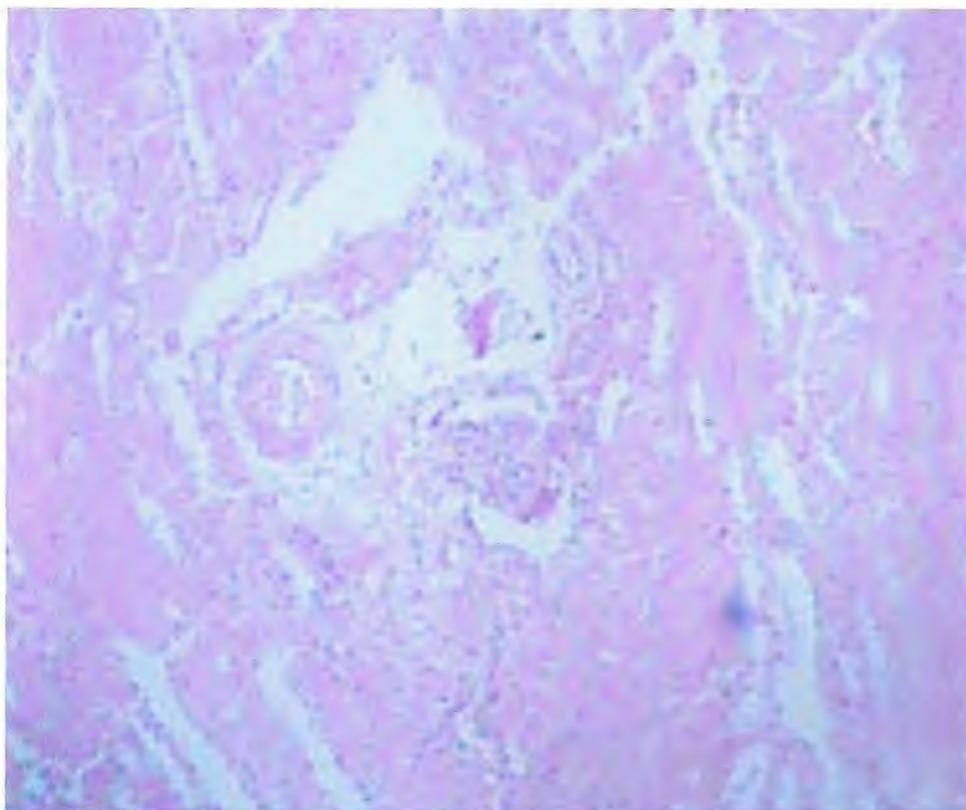


FIGURA 20 – Fotomicrografia de corte histológico do fígado da prole cuja mãe lactante foi intubada com F_{0-30%} (Grupo experimental). Lesão perivascular indicativa de porta de entrada de substâncias tóxicas; necrose; congestão.

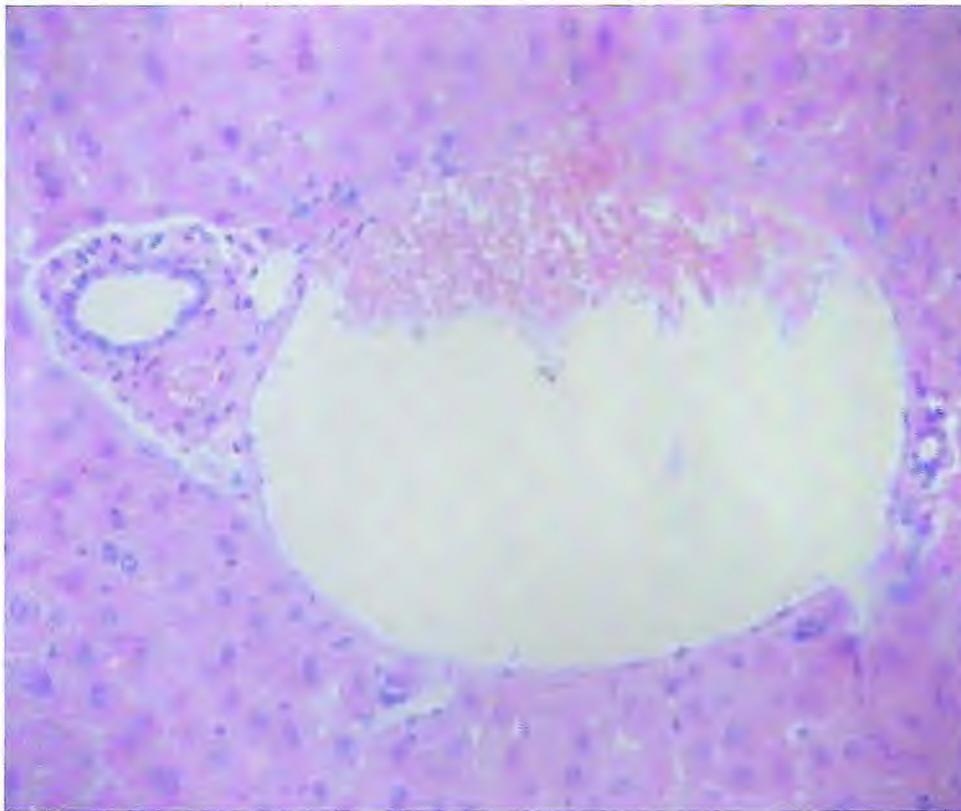


FIGURA 21 – Fotomicrografia de corte histológico do fígado da prole cuja mãe lactante foi intubada com F_{0-30%} (Grupo experimental). Destruição da arquitetura das traves hepáticas; perda dos contornos hepáticos.

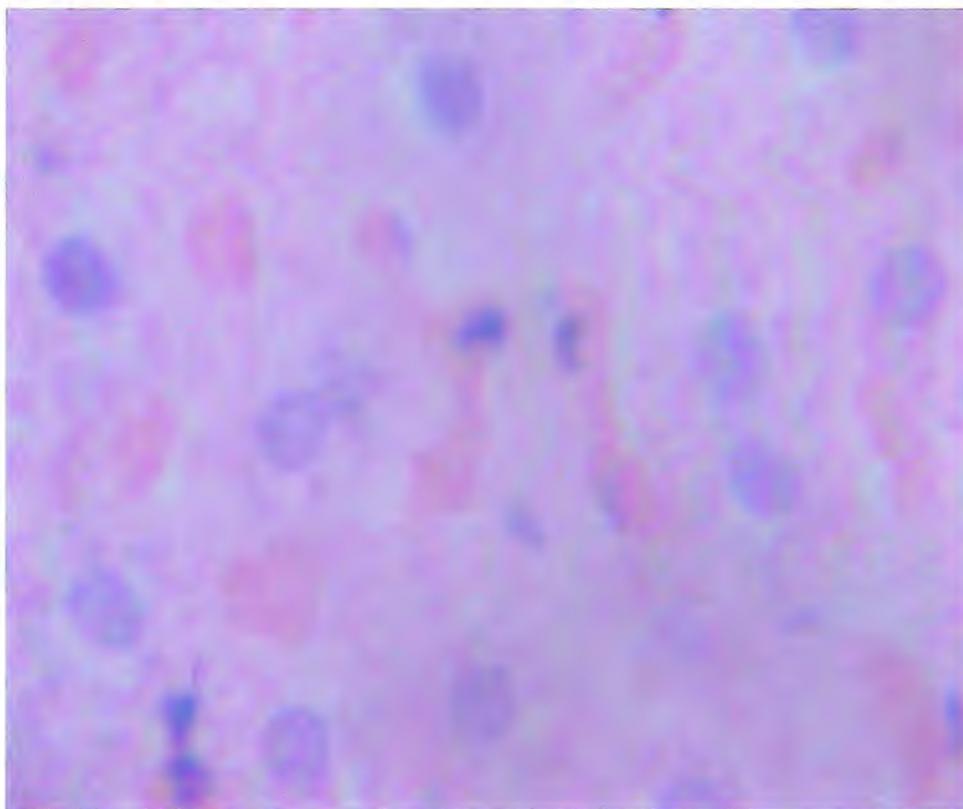


FIGURA 22 – Fotomicrografia de corte histológico do fígado da prole cuja mãe lactante foi intubada com F_{0-30%} (Grupo experimental). Megalocitose dos hepatócitos; dilatação e repleção dos sinusóides.

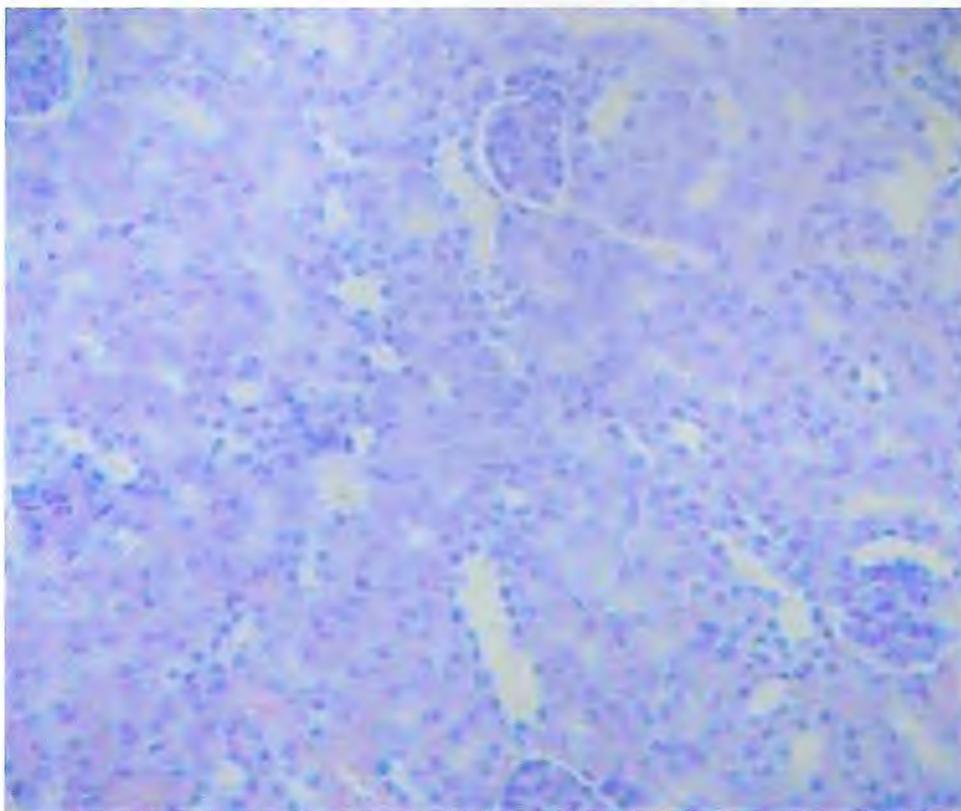


FIGURA 23 – Fotomicrografia de corte histológico do rim da prole cuja mãe lactante foi intubada com NaCl 150 mM (Grupo controle).

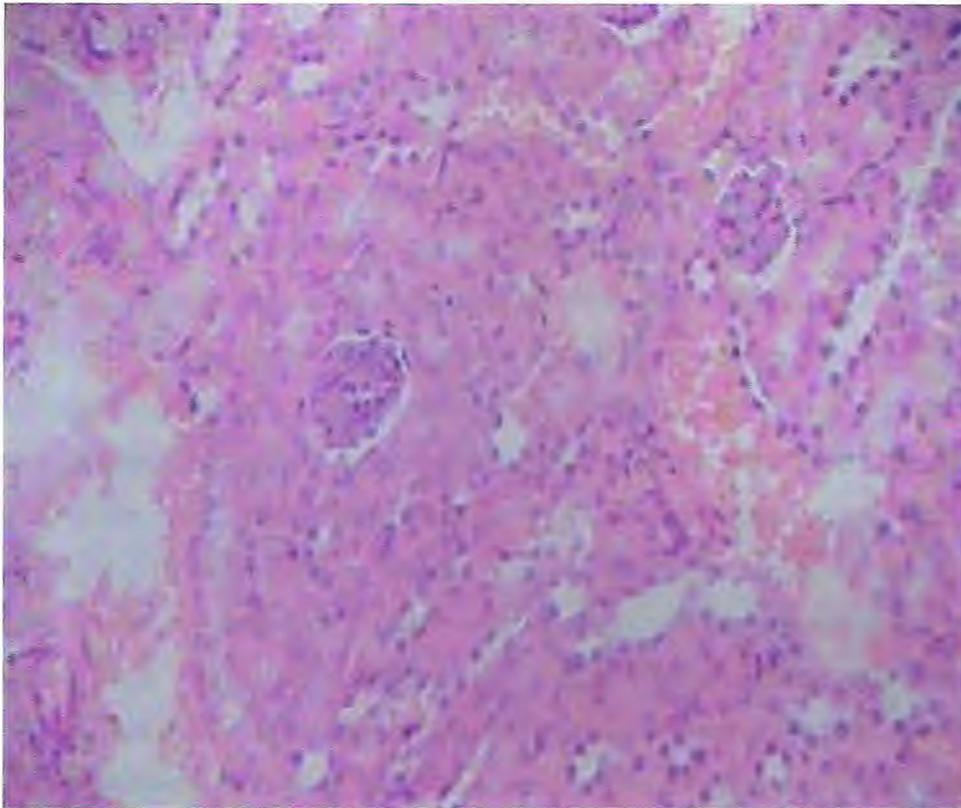


FIGURA 24 – Fotomicrografia de corte histológico do rim da prole cuja mãe lactante foi intubada com F_{0-30%} (Grupo experimental). Destruição dos vasos; degeneração do epitélio tubular; congestão; tecido amorfo próprio de necrose do tipo liquefativa; glomérulo com atrofia; esclerose.

Os dados sugerem que, no modelo animal testado, a eventual eliminação do princípio tóxico através do leite ocorreu em níveis suficientemente elevados para que houvesse redução no ganho de peso dos camundongos lactentes. É possível que as lesões observadas nos filhotes sejam devidas à toxina.

Há relatos de observações no campo, que entre os animais acometidos de intoxicação, os grupos populacionais mais afetados são indivíduos lactentes. Esses, supostamente, ingerem o componente tóxico através do leite, quando suas genitoras se encontram pastando em locais onde plantas tóxicas são abundantes. DRAKE (1941) foi o primeiro pesquisador a verificar o perigo potencial da ingestão de toxinas de plantas de forma indireta, através do leite. A partir desse relato pioneiro seguiram-se outros mostrando que, de fato, os princípios ativos tóxicos de várias plantas, ou seus metabólitos, podem ser transferidos para o leite (MEDEIROS, 1994; JAMES *et al.*, 1994). Por um lado, a veiculação de substâncias tóxicas através do leite pode ser considerada benéfica ao animal intoxicado, pois dessa forma parte da toxina ingerida pode ser eliminada do organismo. Todavia, por outro lado, podem ocorrer vários danos, principalmente para os consumidores diretos de produtos oriundos desses animais intoxicados.

Embora tenham sido observados resultados positivos de toxicidade em camundongos e sinais de veiculação da toxina pelo leite materno, deve-se ressaltar que os dados aqui apresentados não permitem uma extrapolação direta para ruminantes. O trato gastrointestinal de camundongos apresenta velocidade de trânsito de ingesta bastante superior ao verificado nos ruminantes. Isto pode afetar a quantidade de toxina absorvida e, por conseguinte, a quantidade eliminada através do leite.

5.8 – Avaliação da Atividade Inseticida da F_{0-30%}, Rica em LTS

Os resultados da avaliação de toxicidade do extrato bruto e F_{0-30%} de folhas de salsa para *Callosobruchus maculatus* estão mostrados nas FIGURAS 25, 26 e 27.

O extrato bruto de salsa foi capaz de influenciar negativamente a emergência de larvas apenas quando testado na dose 1% (p/p). Todavia, a F_{0-30%} foi altamente ativa, pois uma dose de apenas 0,1% causou uma redução na emergência em torno de 70%. As doses mais elevadas da F_{0-30%}, 0,25%, 0,5% e 1,0%, diminuíram a emergência das larvas em aproximadamente 90%. No entanto, nessas doses não foram observadas diferenças significativas (FIGURA 23).

Um outro parâmetro analisado foi o tempo médio de desenvolvimento dos insetos. A F_{0-30%} quando presente em doses elevadas (0,5% e 1,0%) foi capaz de retardar de modo significativo o desenvolvimento dos insetos. No entanto, apesar de aparentemente as doses de 0,5 e 1,0% induzirem tempos médios de desenvolvimento dos insetos distintos, vale ressaltar que essa diferença não foi significativa estatisticamente (FIGURA 24). Esse resultado pode ter sido mascarado pelo tratamento estatístico devido ao pequeno número de amostras utilizadas, desde que foram pouquíssimos os insetos que emergiram das sementes artificiais na dose de 1%. MURDOCK *et al.* (1990) também analisaram os efeitos de lectinas vegetais sobre o *Callosobruchus maculatus*. Dentre as 17 lectinas testadas, somente 5 causaram alterações significativas no tempo médio de desenvolvimento dos insetos, cujas doses utilizadas variaram de 0,2 a 1,0% (p/p). A mais potente foi a aglutinina de germe de trigo (WGA), específica para N-acetil-D-glucosamina. Assim como a WGA, as lectinas de *Oryza sativa* e *Urtica dioica*, também específicas para N-acetil-D-glucosamina, foram tóxicas para *C. maculatus* (HUESING *et al.*, 1991).

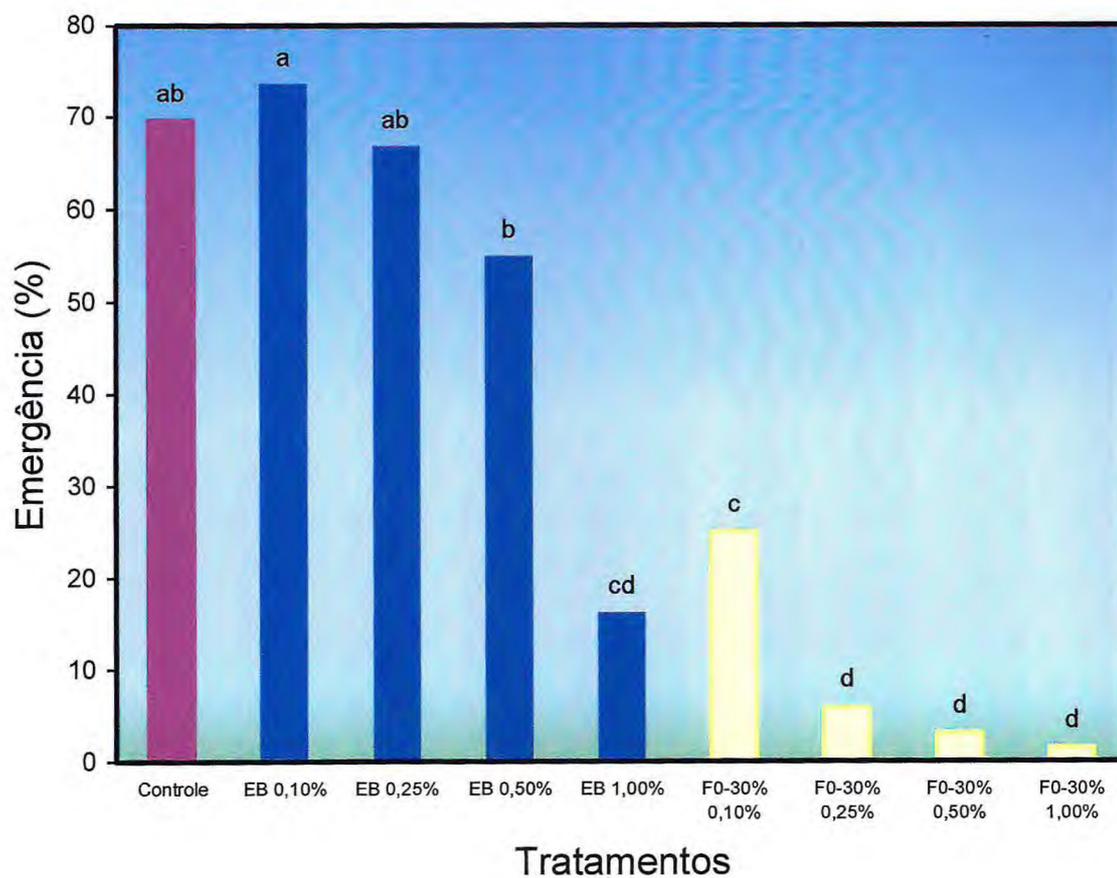


FIGURA 25 – Efeito do extrato bruto e da F_{0-30%} obtidos de folhas de salsa sobre a emergência de larvas de *Callosobruchus maculatus*.

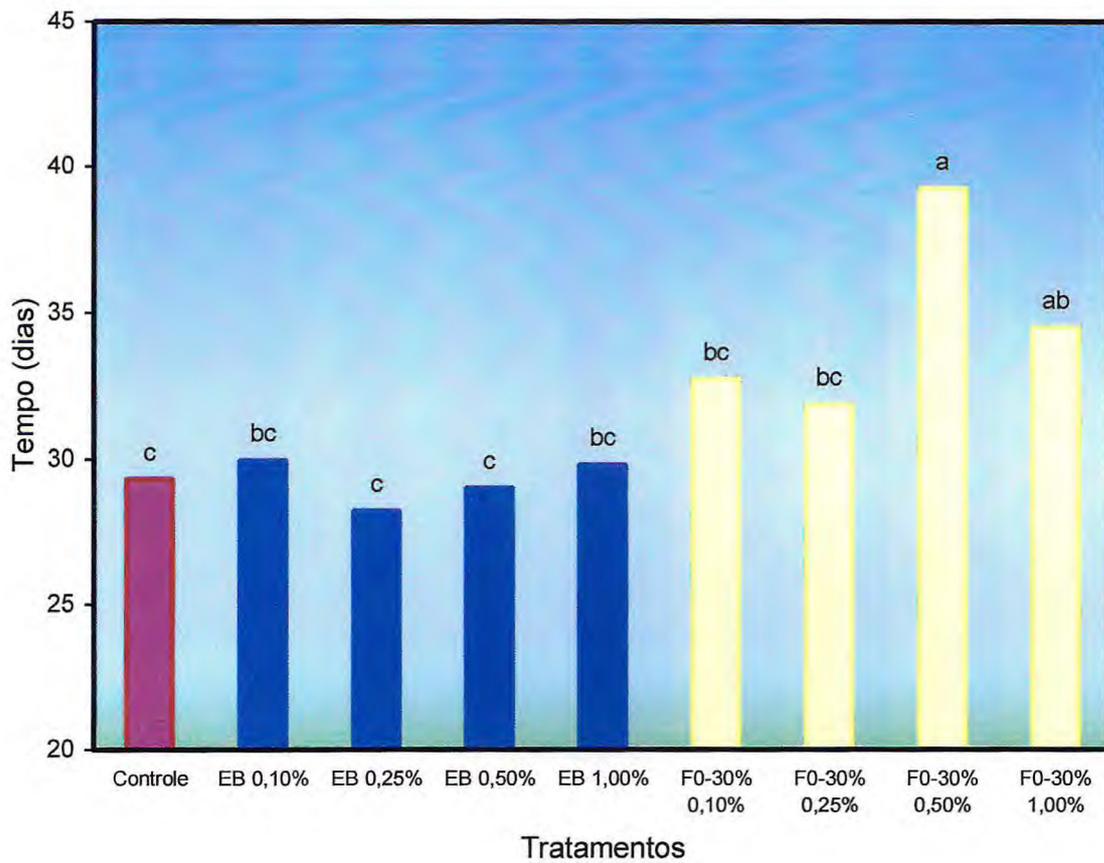


FIGURA 26 – Efeito do extrato bruto e F_{0-30%} obtidos de folhas de salsa sobre o tempo médio de desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus*.

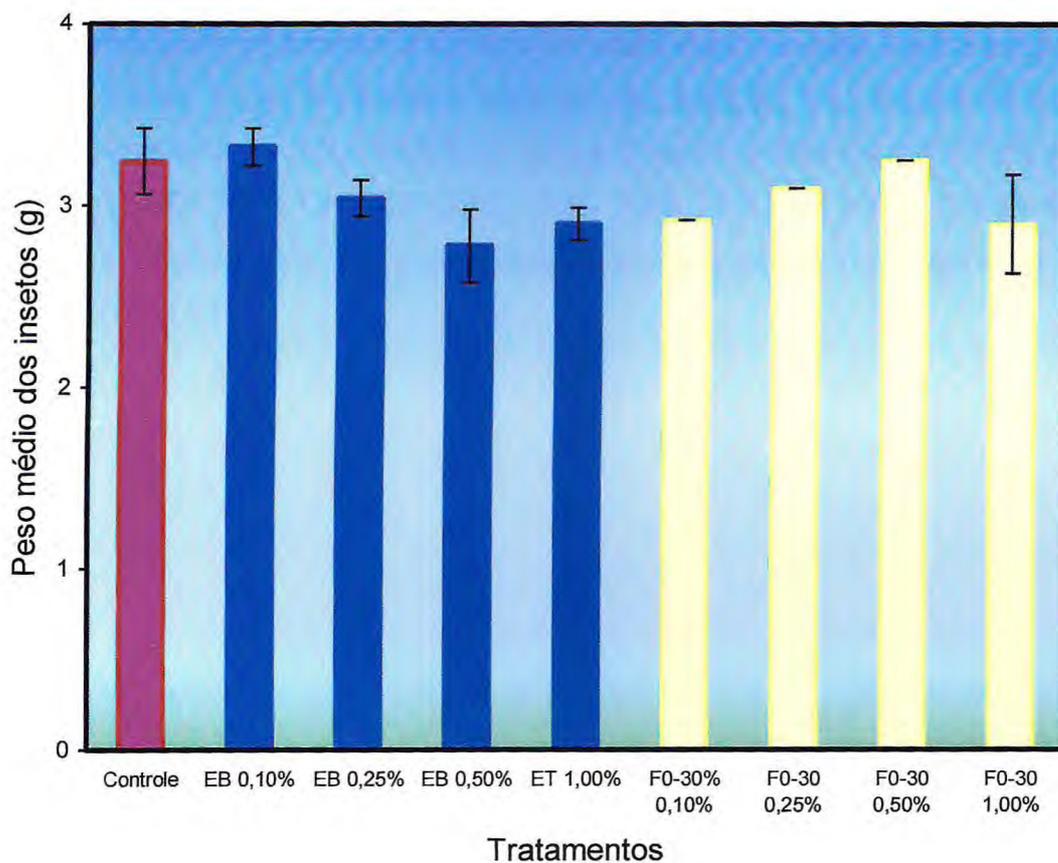


FIGURA 27 – Efeito do extrato bruto e da F_{0-30%} obtidos de folhas de salsa sobre o peso médio de *Callosobruchus maculatus*.

Em relação ao peso médio dos insetos não houve diferença significativa entre o controle e as amostras testadas, indicando que o desenvolvimento dos insetos não foi afetado.

A toxicidade de lectinas a insetos está bem documentada. Várias lectinas já foram testadas e se mostraram efetivas na redução da sobrevivência, no desenvolvimento e na fecundidade (*in vitro* e *in vivo*) de insetos (HARPER *et al.*, 1995; GATEHOUSE & GATEHOUSE, 1995, 1998; SOUSA, 2001). Diante disso, embora os experimentos sejam preliminares, é possível que o componente ativo da F_{0-30%} seja a LTS.

6. CONCLUSÕES

A atividade tóxica apresentada pelas folhas de *Ipomoea asarifolia* (salsa), pelo menos em parte, é devida à presença de uma proteína aglutinante denominada lectina tóxica da salsa (LTS), representando a primeira lectina isolada e caracterizada de folhas de espécies pertencentes à família Convolvulaceae.

Uma fração rica em LTS quando administrada orogastricamente a camundongos lactantes ocasionou redução no ganho de peso e lesões no fígado e rins dos lactentes, revelando a veiculação do princípio tóxico através do leite.

A avaliação do potencial inseticida de uma fração rica em LTS utilizando como modelo o gorgulho (*Callosobruchus maculatus*) resultou na redução da emergência e retardamento no desenvolvimento desses insetos, mostrando, assim, o potencial biotecnológico desta lectina tóxica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKEV, N., CAN, A. Separation and some properties of *Aloe vera* L pulp lectins. **Phytother. Res.**, v. 13, n. 6, p. 489-493, 1999.

ALLEN, A. K., NEUBERGER, A. The purification and properties of the lectin from potato tubers, a hydroxyproline-containing glycoprotein. **Biochem. J.**, v. 135, p. 307-314, 1973.

ALOUF, J. E., FREER, J. H. **Bacterial Protein Toxins**. London: Academic Press, p. 136, 1999.

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. Washington, 1970. 1094p.

ASHIDA, H., YAMAMOTO, K., KUMAGAI, H. Trypsin inhibitory activity of bovine fetuin de-O-glycosylated by endo- α -N-acetylgalactosaminidase. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, p. 2266-2268, 2000.

BAETHGEN, W. E., ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Soil Science**, v. 20, p. 961-969, 1989.

BARONDES, S. H. Bifunctional properties of lectins: Lectins redefined. **Trends Biochem. Sci.**, v. 13, p. 480-482, 1988.

BENEVIDES, N. M. B., LEITE, A. M., FREITAS, A. L. P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 8, p. 117-122, 1996.

BERMAN, E. Reinvestigation of the carbohydrate chains of calf fetuin using ^{13}C .N.M.R. spectroscopy. **Carbohyd. Res.**, v. 152, p. 33-46, 1986.

BIDLINGMEYER, B. A., COHEN, S. A., TARVIN, T. L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **J. Chromatogr.**, v. 336, p. 93-104, 1984.

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

BOYD, W. C., REGUERA, R. M. Studies on haemagglutinins present in seeds of some representatives of the family Leguminosae. **J. Immunol.**, v. 62, p. 333-339, 1949.

BOYD, W. C., SHAPLEIGH, E. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). **Blood**, v. 9, p. 1195-1198, 1954.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROEKAERT, W. F., ALLEN, A. K., PEUMANS, W. J. Separation and partial characterization of isolectins with different subunit compositions from *Datura stramonium* seeds. **FEBS Lett.**, v. 220, p. 116-120, 1987.

BRUYLANT, M., VANNEMAN, M. Le jequirity. **Bull. Acad. R. Med. Belg.**, v. 18, p.147-179, 1884.

CARLINI, C. R., BARCELLOS, G. B. S., BAETA-NEVES, A. D. V., GUIMARÃES, J. A. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin A among proteins from leguminous seeds. **Phytochemistry**, v. 27, p. 25-30, 1988.

CARLINI, C. R., GUIMARÃES, J. A. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. **Toxicon**, v. 29, p. 791-806, 1991.

CARLINI, C. R., OLIVEIRA, A. E. A., AZAMBUJA, P., XAVIER-FILHO, J., WELLS, M. A. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. **J. Econ. Entomol.**, v. 90, p. 72-80, 1997.

CASTRO-FARIA-NETO, H. C., MARTINS, M. A., BOZZA, P. T., PEREZ, S. A. C., CORREA-DA-SILVA, A. C. V., LIMA, M. C. R., CRUZ, H. N., CORDEIRO, R. S. B., SOUSA, M. V., MORHY, L. Pro-inflammatory activity of enterolobin: a haemolytic protein purified from seeds of the brazilian tree *Enterolobium contortisiliquum*. **Toxicon**, v. 29, p. 1143-1150, 1991.

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

CHRISPEELS, M. J., RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**, v. 3, p. 1-9, 1991.

CHRISPEELS, M. J., GROSSI DE SA, M. F., HIGGINS, T. J. V. Genetic engineering with alpha-amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. **Seed Sci. Res.**, v. 8, p. 257-263, 1998.

CLENDENNEN, S. K., MAY, G. D. Differential gene expression in ripening banana fruit. **Plant Physiol.**, v. 115, p. 463-469, 1997.

COELHO, L. C. B. B., SILVA, M. B. R. **Phytochem. Anal.**, v. 11, p. 295-300, 2000.

CONGDON, R. W., MUTH, G. W., SPLITTGERBER, A. L. The binding interaction of Coomassie Blue with proteins. **Anal. Biochem.**, v. 212, p. 407-413, 1993.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. Londres: Sons, 1968.

CUSSAC, V., FERRERO, R. L., LABIGNE, A. Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 2466-2473, 1992.

DANA, N., TEGEGNE, A., SHENKORU, T. Feed intake, sperm output and seminal characteristics of Ethiopian highland sheep supplemented with different levels of leucaena (*Leucaena leucocephala*) leaf hay. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 86, p. 239-249, 2000.

DAWES, E. A. Quantitative problems in Biochemistry. C hurchill Livingstone, Edinburg, UK, 470 pp.

DELOBETTE, H., FRIRY, A., PLEWNIAC, F., EGLY, J. M. Le dosage des proteines. **Biofutur.**, v. 97, p. 1-11, 1991.

DIXON, H. B. F. Defining a lectin. **Nature**, v. 338, p. 192, 1981.

DIXSON, T. **Australas. Med. Gaz.**, v. 6, p. 137-138, 1887.

DOBEREINER, J., TOKARNIA, H. C., CANELLA, C. F. C. Intoxicação experimental pela "salsa" em ruminantes (*Ipomoea asarifolia*). **Arq. Inst. Biol. Anim.**, v. 3, p. 39-57, 1960.

DRAKE, 1941. *Apud* PANTER, K. E., JAMES, L. F. Natural plant toxicants in milk: a review. **J. Anim. Sci.**, v. 68, p. 892-904, 1990.

EKPA, O. D. Nutrient composition of three Nigerian plants medicinal. **Food Chem.**, v. 57, p. 229-232, 1996.

ELFSTRAND, M. Über blukörperchenagglutinierende Eiweisse. In: KOBERT, R. (ed.). **Görberdorfer Veröffentlichungen a Band I**. Enke, Stuttgart, Germany. 1898. p. 1-159.

FAO/WHO/UNU. Energy and protein requeriments. Report of a joint FAO/WHO/UNU. **Thechnical Report Series 724**. WHO, Geneva, 1985.

FARIAMARMOL, J., MORILLO, D. E., McDOWELL, L. R. In vitro digestibility, crude protein, and mineral concentrations of *Leucaena leucocephala*. **Commun. Soil Sci. Plant.**, v. 27, p. 2663-2674, 1996.

FERREIRA-DASILVA, C. T., GOMBAROVITS, M. E. C., MASUDA, H., OLIVEIRA, C. M., CARLINI, C. R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 44, p. 162-171, 2000.

FOLLMER, C. (2001). **Ureases da *Canavalia ensiformis*: Aspectos Biológicos e Estruturais Comparativos**. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 120p.

GATEHOUSE, A. M. R., GATEHOUSE, J. A. Effects of lectins on insects. In: BARDOCZS, S., GELENCSE, E., PUSZTAI, A. (eds.). **Effects of Antinutrients on the Nutritional Value of Legume Diets**, v.1, p. 14-21, 1995.

GATEHOUSE, A. M. R., GATEHOUSE, J. A. Identifying proteins with insecticidal activity: Use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Pestic. Sci.**, v. 52, p. 165-175, 1998.

GERHARDT, I. R., PAES, N. S., BLOCH, JR., C., MENDES, P. A. M., LEITE, A., CHRISPEELS, M. J., GROSSI DE SA, M. F. Molecular characterization of a new arcelin-5 gene. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 93352, p. 1-11, 1999.

GOLDSTEIN, I. J., HUGUES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

GOLDSTEIN, I. J., PORETZ, R. D. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I. E., SHARON, N., GOLDSTEIN, I. J. (eds.). **The Lectins, Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine**. Orlando: Academic Press, 1986. 600p.

GOODWIN, T. W., MORTON, R. A. The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. **Biochem. J.**, v. 40, p. 628-632, 1946.

GRANT, G., EDWARDS, J. E., EWAN, E. C., MURRAY, S., ATKINSON, T., FARNINGHAM, D. A. H., PUSZTAI, A. Secretion of pancreatic digestive enzymes induced in rats by first-time oral exposure to kidney bean E₂L₂ lectin is mediated only in part by cholecystokinin (CCK). **Pancreas**, v. 19, p. 382-389, 1999.

HAMERSTRAND, G. H., BLACK, L. T., GLOVER, J. D. Trypsin inhibitors in soy products: modification of standart analytical procedure. **Cer. Chem.**, v. 58, p. 42-45, 1981.

HARPER, S. M., CRENSHAW, R. W., MULLINS, M. A, PRIVALLE, L. S. Lectin binding to insect brush border membranes. **J. Econ. Ecol.**, v. 88, p. 1197-1202, 1995.

HIRSCH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Cur. Op. Plant Biol.**, v. 2, p. 320-326, 1999.

HUESING, J. E., MURDOCK, L. L., SHADE, R. E. Effect of wheat germ isolectins on development of cowpea weevil. **Phytochemistry**, v.30, p. 785-788, 1991.

- MANISHI, S., NAKAMURA, K. K., MATSUOKA, K., MORIKAMI, A., NAKAMURA, K. A major jasmonate-inducible protein of sweet potato, ipomoelin, is an ABA-independent wound-inducible protein. **Plant Cell Physiol.**, v. 38, p 643-652, 1997.
- SHIDA, H., SUZUNO, H., SUGIYAMA, N., INNAMI, S., TADOKORO, T., WACKAVA, A. Nutritive evaluation on chemical components of leaves, stalks and stems of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* *poir*). **Food Chem.**, v. 68, p. 359-367, 2000.
- JAMES, L. F., PANTER, K. E., MOLYNEAUX, R. J., STEGELMEIER, B. L., WAGATAFF, D. J. Plant toxicants in milk. **4th International Symposium on Poisonous Plants**. Tucson, Arizona, p. 83-88, 1994.
- JANZEN, D. H., JUSTER, H. B., LIENER, I. E. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black bean on a bruchid beetle. **Science**, v. 192, p. 795-796, 1976.
- KALLAH, M. S., BALE, J. O., ABDULLAHI, U. S., MUHAMMAD, I. R., LAWAL, R. Nutrient composition of native forbs of semi-arid and dry sub-humid savannas of Nigeria. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 84, p. 137-145, 2000.
- KAPLAN, A. The determination of urea, ammonia and urease. In: GLICK, D. (ed.). **Methods of Biochemical Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1969. p. 311-314.
- KNIBBS, R. N., GOLDSTEIN, I. J., RATCLIFFE, R. M., SHIBUYA, N. Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leucoagglutinin from *Maackia amurensis*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 83-88, 1991.
- KOCOUREK, J., HOREJSI, V. Defining a lectin. **Nature**, v. 290, p. 188, 1981.

- KOJIMA, H., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends Plant Sci.**, v. 2, p. 379-384, 1997.
- KRICH, G. F. **Experimenta Quaedam Pharmacologica de Oleis Ricini Crotonis et Euphorbia lathyridis**. Tese, Dorpati Livonorum, 1857. Citado Por Ilomets, 1990.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 689-685, 1970.
- LANDSTEINER, K., RAUBITSCHKE, H. Beobachtungen über hämolyse and hämagglutination. **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1: Orig.**, v. 45, p. 660-667, 1907.
- LEE, H. -I., BROEKAERT, W. F., RAIKHEL, N. V. Co- and post- translational processing of the hevein preproprotein of latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 15944-15948, 1991.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. New York: Worth Publishers, p. 304, 1993.
- LIS, H., SHARON, N. Soybean (*Glycine max*) agglutinin. **Method. Enzymol.**, v. 28, p. 360-368, 1972.
- LIS, H., SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 55, p. 35-67, 1986.
- LIS, H., SHARON, N. Lectin-carbohydrate interactions. **Current Op. Struct. Biol.**, v. 1, p. 741-749, 1991.
- LIS, H., SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.**, v. 98, p. 637-674, 1998.

LITCHFIELD, J. T., J., WILCOXON, F. A simplified method for evaluation of dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 96, p. 99-104, 1949.

MAIA, F. M. M. **Composição e caracterização nutricional de três cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** EPACE 10, Olho de ovelha e IPA-206. 1996, 87 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.

MAIA, F. M. M., OLIVEIRA, J. T. A., MATOS, M. R. T., MOREIRA, R. A., VASCONCELOS, I. V. Proximate composition, amino acid content and haemagglutinating and trypsin-inhibiting activities of some Brazilian *Vigna unguiculata* (L) Walp cultivars. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 453-458, 2000.

MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of Leguminosae seeds. **An. Med. Exp. Biol.**, v. 35, n. 11, p. 1-156, 1957.

MATOS, M. R. T. **Estudos bioquímicos e nutricionais de três cultivares *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** Epac 11, Pitiúba e TVU 1888. 1997, 122 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997.

MEDEIROS, R. M. T. **Veiculação do princípio tóxico da *Crotalaria spectabilis* (Roth) em leite de cabra e rata: uma avaliação toxicológica.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994. 142p.

MELO, M. M. Plantas Ornamentais Tóxicas. **Cad. Téc. Vet. Zootec.**, v. 32, p. 77-88, 2000.

MELO, M. M., OLIVEIRA, N. J. F. Plantas Tóxicas. **Cad. Téc. Vet. Zootec.**, v. 32, p. 7-76, 2000.

MELO, V. M. M. **Lectina de cotilédones de *Luetzelburgia auriculata* Ducke e seu papel na defesa da planta.** Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001. 166p.

MERO, R. N., UDÉN, P. Promising tropical grasses and legumes as feed resources in Central Tanzania: VI. Nitrogen balance in growing bulls consuming tropical herbaceous forage legumes. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 72, p. 387-396, 1998.

MONTEIRO, A. C. O. **Características químicas, físico-químicas e estruturais da frutalina, uma lectina D-galactose ligante de *Artocarpus incisa*.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998. 151 p.

MONTEIRO, M. V. B., CRISÓSTOMO, F. S. M., SANTOS, L. F. L., ALBUQUERQUE, F. G. S., CUNHA, Y. C. Evoluções dos níveis plasmáticos de glicose, uréia e proteínas totais em caprinos intoxicados com salsa (*Ipomoea asarifolia*). In: **IV Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária**, Recife-PE, 1999. Abstracts.

MORAES, S. M. D., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., ROQUE-BARREIRA, M. C., SANTOS-DE-OLIVEIRA, PINTO, V. P. T., OLIVEIRA, J. T. A. Purification, physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* f. *aurantiaca* seeds. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 977-985, 1996.

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

MURDOCK, L. L., HUESING, J. E., NIELSEN, S. S., PRATT, R. C., SHADE, R. E. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry**, v. 29, p. 85-89, 1990.

NASCIMENTO, J. M., COSTA, C., SILVEIRA, A. C., ARRIGONI, M. D. B. Influência do método de fenação e tempo de armazenamento sobre a composição bromatológica e ocorrência de fungos no feno de alfafa (*Medicago sativa*, L. cv. Florida 77). **Rev. Bras. Zootec.**, v. 29, p. 669-677, 2000.

NIELSON, D. B., JAMES, L. F. Economic impact of poisonous plants in livestock production. In: **International Symposium on Poisonous Plants**, 3., Utah, 1990. Abstracts, p.1.

OBIDAIRO, T. K., AKPOCHAFO, O. M. Isolation and characterization of some proteolytic enzyme inhibitors in sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Enzyme Microb. Technol.**, v. 6, p. 132-134, 1984.

OKA, Y., CHET, I., SPIEGEL, Y. An immunoreactive protein to wheat-germ agglutinin antibody is induced in oat roots following invasion of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*, and by jasmonate. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 10, p. 961-969, 1997.

OKAMOTO, R., HORI, K., MIYAZAWA, K., ITO, K. Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria bursa-pastoris*. **Experientia**, v.46, p. 975-977, 1990.

OSBORN, T. C., ALEXANDER, D. C., SUN, S. S. M., CARDONA, C., BLISS, F. A. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. **Science**, v. 240, p. 207-210, 1988.

PAES, N. S., GERHARDT, I. R., COUTINHO, M. V., YOKOYAMA, M., SANTANA, E., HARRIS, N., CHRISPEELS, M. J., GROSSI DE SA, M. F. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. **J. Insect. Physiol.**, v. 46, p. 393-402, 2000.

PANTER, K. E., JAMES, L. F. Natural plant toxicants in milk: a review. **J. Anim. Sci.**, v. 68, p. 892-904, 1990.

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v. 109, p. 347-352, 1995.

PEUMANS, W. J., WINTER, H. C., BEMER, V., VAN LEUVEN, F., GOLDSTEIN, I. J., TRUFFA-CACHI, P., VAN DAMME, E. J. M. Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate J.**, v. 14, p. 259-265, 1997.

PEUMANS, W. J., BARRE, A., QUING, H., PIERRE, R., VAN DAMME, E. J. M. Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign glycans. **Trends Glycosci. Glyc.**, v. 12, p. 83-101, 2000.

PINHEIRO, R. R., SANTA ROSA, J. Poisoning by *Ipomoea asarifolia* on goats and its effects on carbohydrate metabolism. In: **Congresso Mundial de Veterinária**, Rio de Janeiro, 1991. p. 225.

PINTÉR-SZAKÁCS, M., MOLNÁR-PÉRL, H. Determination of tryptophan in unhydrolyzed food and feedstuffs by the acid ninhydrin method. **J. Agric. Food Chem.**, v. 38, p. 720-726, 1990.

POLLACO, J. C., HOLLAND, M. A. Roles of urease in plant cells. **Int. Rev. Cytol.**, v. 145, p. 65-103, 1993.

POTTER, S., UKNES, S., LAWTON, K., WINTER, A. M., CHANDLER, D., DIMAIO, J., NOVITZKY, R., WARD, E., RYALS, J. Regulation of a hevein-like gene in *Arabidopsis*. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 6, p. 680-685, 1993.

PUSZTAI, A., GRANT, A., BARDOCZ, S., EWENS, S. W. B., BAINTEK, K., PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Lectins binding to the gut wall are growth factors for the pancreas: nutritional implications for transgenic plants. In: PUSZTAI, A., BARDOCZ, S. (eds). **Lectins - Biomedical Perspectives**. London: Taylor & Francis Ltd, 1995. p. 141-154.

PUSZTAI, A., GRANT, G., BAINTEK, K., BARDOCZ, S., HERZIG, K. H., FOLSCH, U. R., NUSTEDEL, R. Orally administered lectins induce release of CCK from the duodenum and the growth of pancreas which is blocked by CCK-A receptors antagonist. **Regul. Peptides**, v. 64, p. 156-160, 1996.

RAMOS, M. V., CAVADA, B. S., CALVETE, J. J., SAMPAIO, A. H., MAZARD, A. M., BARRE, A., GRANGEIRO, T. B., FREITAS, B. T., LEITE, K. B., ROUGÉ, P. Specificity of the *Vatairea macrocarpa* lectin towards glycans exhibiting exposed Gal/GalNac residues. **Protein Pep. Lett.**, v. 6, p. 163-171, 1999.

RATANAPO, S., NGAMJUNYAPORN, W., CHULAVATNATOL, M. Sialic acid binding lectins from leaf of mulberry (*Morus alba*). **Plant Sci.**, v. 139, p. 141-148, 1998.

RENKONEN, H. O. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family Leguminosae. **Ann. Med. Exp. Fenn**, v. 26, p. 66, 1948.

RIOS, F. J. B., CAVADA, B. S., MEDEIROS, D. A., MOREIRA, R. A., VASCONCELOS, I. M., OLIVEIRA, J. T. A. Digestibility of plant lectins from *Canavalia*, *Cratylia*, *Dioclea* and *Artocarpus* genera. In: VAN DRIESSCHE, E., ROUGE, P., BEECKMANS, S., BOG-HANSEN, T. C. (eds). **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. 1996. v. 11, p. 277-284.

RUDIGER, H. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure and possible functions of plant lectins. **Acta Anat.**, v. 161, p. 130-152, 1998.

SCOTT, G. K., SYMES, C. W. Isolation, characterization and cell growth-regulatory properties of kumara (sweet potato) trypsin inhibitors. **Biochem. Mol. Biol. Intern.**, v. 38, p. 333-344, 1996.

SCHULER, T. H., POPPY, G. M., KERRY, B. R., DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **TiBiotech.**, v. 16, p. 168-175, 1998.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends Biochem. Sci.**, v. 18, p. 221-226, 1993.

SHARON, N., LIS, H. Occurrence and isolation. In: SHARON, N., LIS, H. (eds). **Lectins**. New York: Champmam and Hall, 1989, p. 20-24.

SHARON, N., LIS, H. Legume lectins – A large family of homologous proteins. **FASEB J.**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SIEBRA, E. A. **SBTX, uma nova toxina protéica das sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] cv. BR-10. Isolamento e Purificação**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998. 109 p.

SIKDAR, S., CHATTERJEE, B. P. Studies on the effect of various parameters on crotalarin-fetuin interaction. **Indian J. Biochem. Bio.**, v. 28, p. 146-149, 1991.

SILVA, D. J. **Análise de Alimentos (Métodos Químicos e Biológicos)**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1990. 165p.

SILVA, H. O., FONSECA, R. A., GUEDES FILHO, R. S. Características produtivas e digestibilidade da farinha de folhas de mandioca em dietas de frangos de corte com e sem adição de enzimas. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 29, p. 823-829, 2000.

SINGH, U., SINGH, B. Tropical grain Legumes as important human foods. **Econ. Bot.**, v. 46, p. 310-321, 1992.

SOUSA, D.O.B. **Avaliação bioquímica e nutricional da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] cv. seridó e seridó-RCH**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001. 108p.

SOUSA, F. A. M. **Caracterização das interações moleculares entre lectinas manose específicas tóxicas e o trato digestivo do pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum* (Harris)**. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001. 123p.

SPACKMAN, D. H., STEIN, N. H., MOORE, E. S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Anal. Chem.**, v. 30, p. 1190-1196, 1958.

STILLMARK, H. Uber ricin, ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L., und einige anderen Euphorbiaceen. **Inaugural Dissertation Dorpat**, Tartu, 1888.

TALBOT, C. F, ETZLER, M. E. Isolation and characterization of a protein from leaves and stems of *Dolichos biflorus* that cross reacts with antibodies to the seed lectin. **Biochemistry**, v. 17, p. 1474-1479, 1978.

TRIEBOLD, H. O. **Quantitative Analysis with Applications to Agricultural and Food Products**. New York: Van Nostrand Co., p. 331, 1946.

TOKARNIA, C. H., DÖBEREINER, J., SILVA, M. F. **Plantas Tóxicas da Amazônia a Bovinos e Outros Herbívoros**. Manaus: Helianthus, 1979. 95p.

TOKARNIA, C. H., DÖBEREINER, J., PEIXOTO, P. V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 320p.

VALENCIA, A., BUSTILLO, A. E., OSSA, G. E., CHRISPEELS M. J. Alpha-amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. **Insect Biochem. Molec.**, v. 30, p. 207-13, 2000.

VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F., PEUMANS, W. J. Characterization and molecular cloning of *Sambucus nigra* agglutinin V (nigrinin b), a GalNac-specific type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of elderberry (*Sambucus nigra*). **Eur. J. Biochem.**, v. 237, p. 505-513, 1996.

VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., BARRE, A., ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Plant Sci.**, v. 17, p. 575-692, 1998.

VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., MAZARD, A. M., VERHAERT, P., HORMAN, A., DEBRAY, H., ROUGÉ, P., PEUMANS, W. J. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus tuberosus*. **Eur. J. Biochem.**, v. 259, p. 135-142, 1999.

VAN DAMME, E. J. M., ASTOUL, C. H., BARRE, A., ROUGE, P., PEUMANS, W. J. Cloning and characterization of a monocot mannose-binding lectin from *Crocus vernus* (family *Iridaceae*). **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5067-5077, 2000.

VASCONCELOS, I. M., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **J. Food Biochem.**, v. 15, p. 137-154, 1991.

VASCONCELOS, I. M., TRENTIN, A., GUIMARÃES, J. A., CARLINI, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 312. p. 357-366, 1994.

VASCONCELOS, I. M., SIEBRA, E. A., MAIA, A. A. B., MOREIRA, R. A., NETO, M. A. F., CAMPELO, G. J. A. Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of brazilian soybean (*Glycine max*). **J. Sci. Food Agric.**, v. 75, p. 419-426, 1997.

VASCONCELOS, I. M., MAIA, A. A., SIEBRA, E. A., OLIVEIRA, J. T. A., MELO, V. M. M., CARLINI, C. R., CASTELAR, L. I. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **J. Nutr. Biochem.**, v. 12, p. 55-62, 2001.

VIEIRA, R. A. M., PEREIRA, J. C., MALAFAIA, P. A. M., QUEIROZ, A. C. The influence of elephant-grass (*Pennisetum purpureum* Schum., Mineiro variety) growth on the nutrient kinetics in the rumen. **Anim. Food Sci. Tech.**, v. 67, p. 151-161, 1997.

VIJAYAN, M., CHANDRA, N. Lectins. **Cur. Op. Struct. Biol.**, v. 9, p. 707-714, 1999.

WALLACE, P. A., MARFO, E. K., PLAHAR, W. A. Nutritional quality and antinutritional composition of four non-conventional leaf vegetables. **Food Chem.**, v. 61, p. 287-291, 1998.

WARDEN, C. J. H., WADDEL, L. A. The nature of poison with observations on its chemical and physiological properties. Bengal Secretarial Press. Calcutta, 1884.

WATKINS, W. M., MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel by simple sugars. **Nature**, v. 196, p. 825-826, 1952.

WEIS, W. I., DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 441-473, 1996.

WERNER, E. **Pharm. Zschr. F. Russland**, v. 9, p. 33-44, 1870.

WRIGHT, L. M., REYNOLDS, C. D., RIZKALLAH, P. J., ALLEN, A. K., VAN DAMME, E. J. M., DONOVAN, M. J., PEUMANS, W. J. Structural characterization of the native fetuin-binding protein *Scilla campanulata* agglutinin: a novel two-domain lectin. **FEBS Lett.**, v. 468, p. 19-22, 2000.

ZANETTA, J. P., TIMMERMAN, LEROY, I. Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutyrate derivatives of the O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of the monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. **Glycobiology**, v. 9, p. 255-266, 1999.

ZENG, F. Y., GABIUS, H. J. *Apud* RUDIGER, H. (1998). Sialic acid-binding proteins: characterization, biological function and application. **Z. Naturforsch.**, v. 47, p. 641-653, 1992.

ANEXO 1

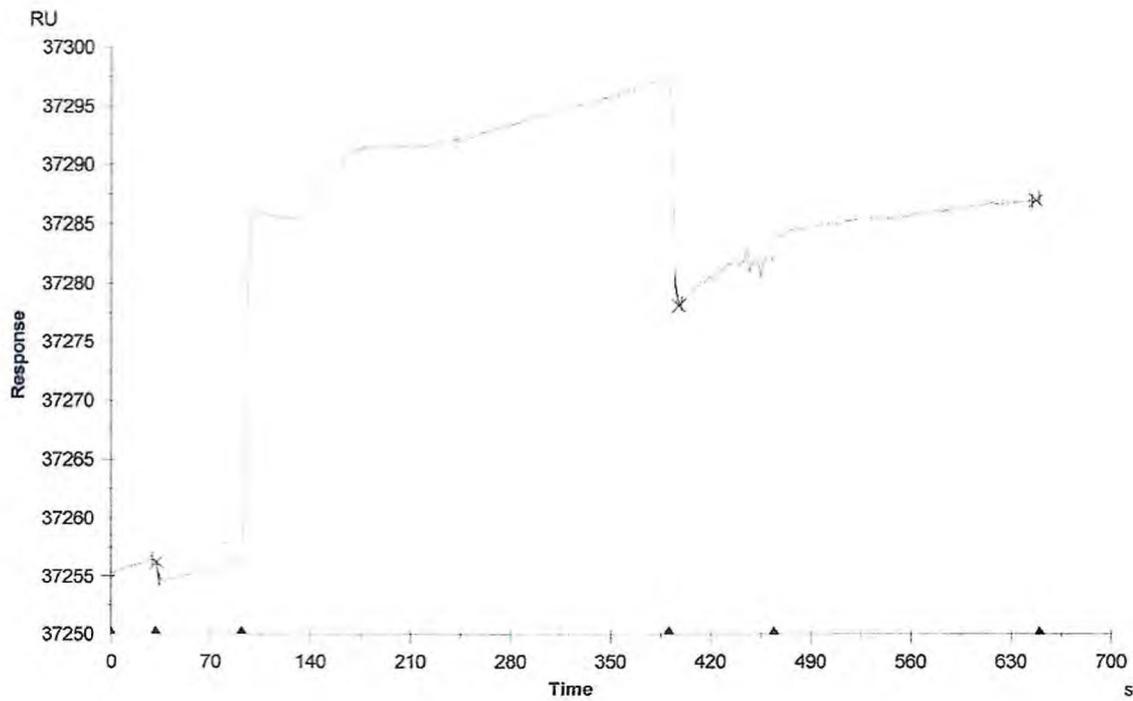


FIGURA 23 – Cinética de interação entre a lectina tóxica da salsa (100 $\mu\text{g/ml}$) e a lactotransferrina bovina. Volume injetado: 25 μl ; Fluxo: 5 $\mu\text{l/min}$.

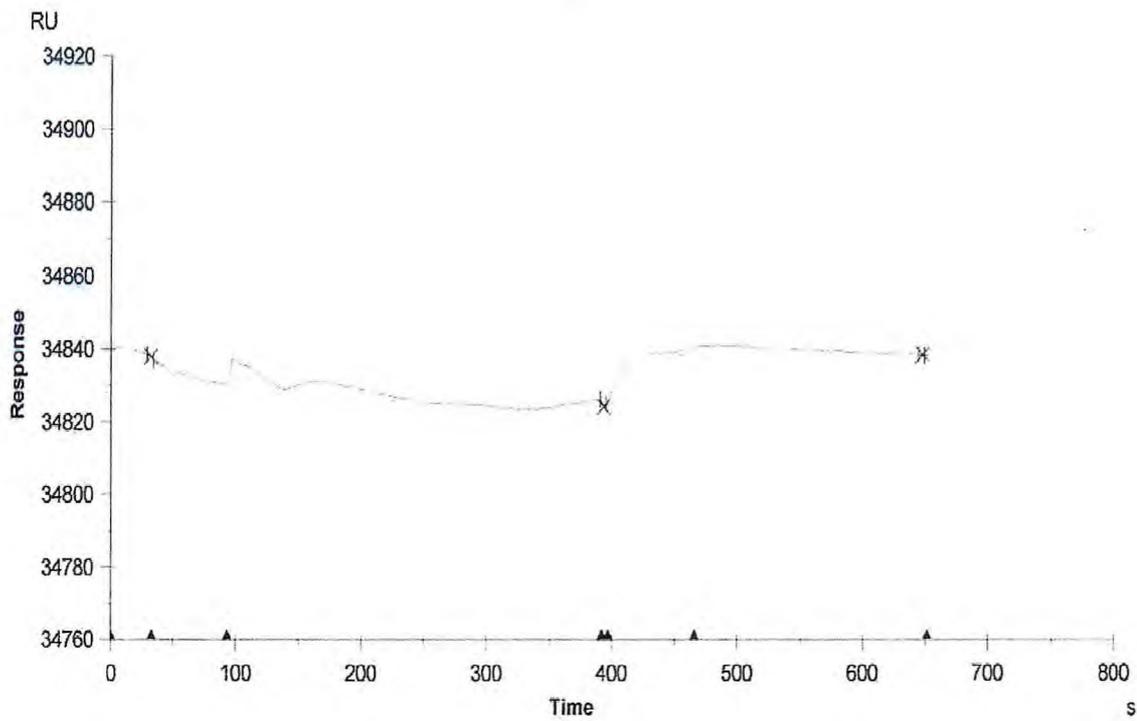


FIGURA 24 – Cinética de interação entre a lectina tóxica da salsa (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e a sorotransferrina humana. Volume injetado: 25 μl ; Fluxo: 5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

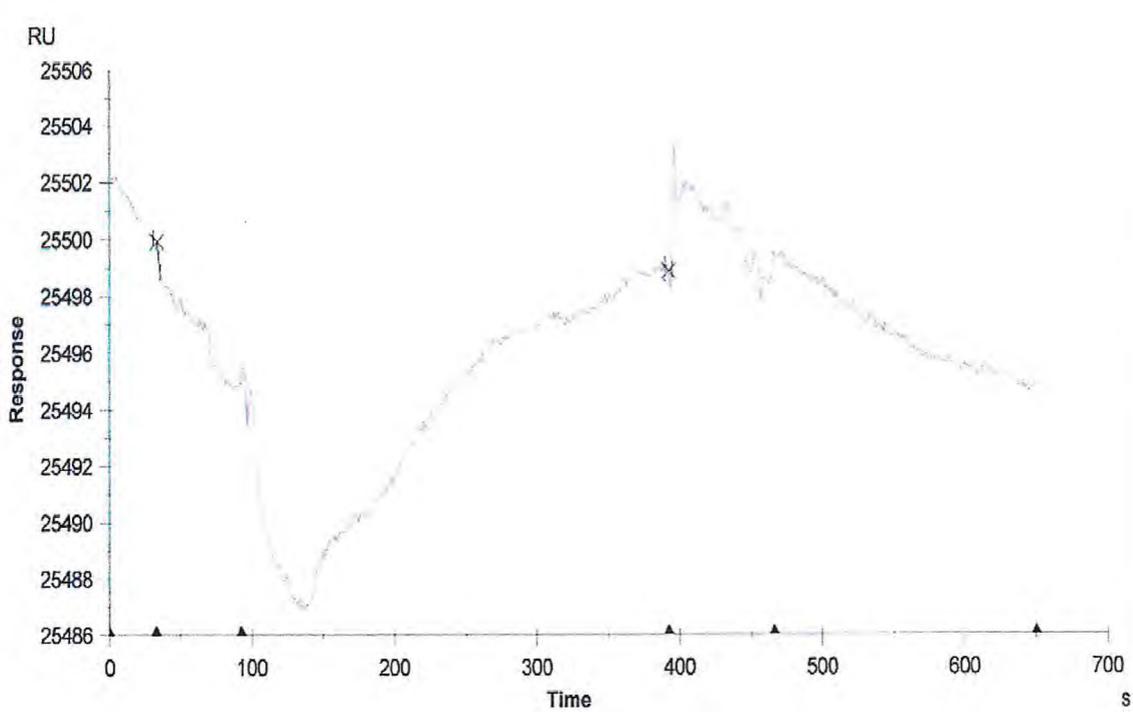


FIGURA 25 – Cinética de interação entre a lectina tóxica da salsa (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e a mucina de estômago de porco. Volume injetado: 25 μl ; Fluxo: 5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

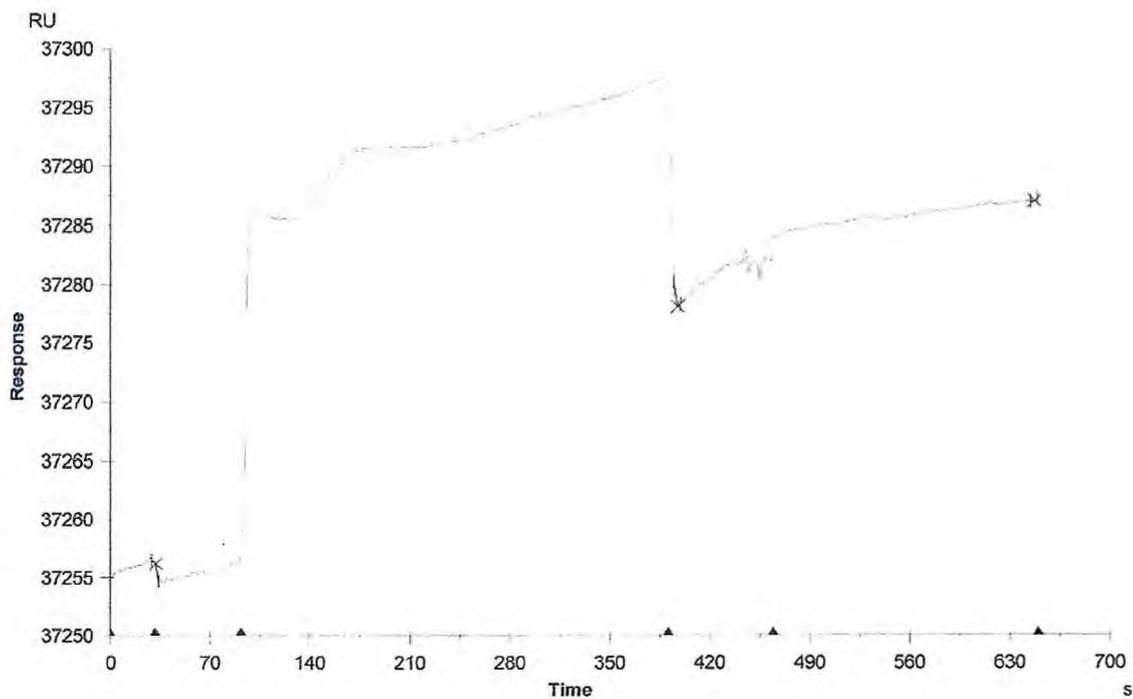


FIGURA 26 – Cinética de interação entre a lectina tóxica da salsa (100 $\mu\text{g/ml}$) e a asialofetuína. Volume injetado: 25 μl ; Fluxo: 5 $\mu\text{l/min}$.

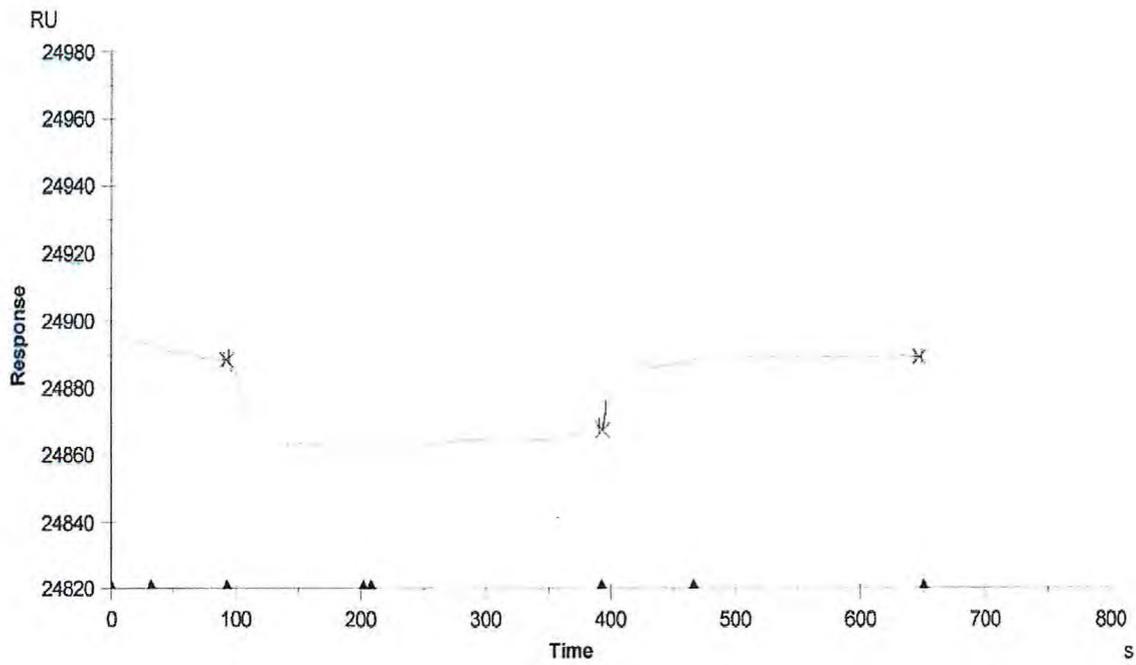


FIGURA 27 – Cinética de interação entre a lectina tóxica da salsa (100 µg/ml) e a lectina de *Artocarpus integrifolia*. Volume injetado: 25 µl; Fluxo: 5 µl/min.

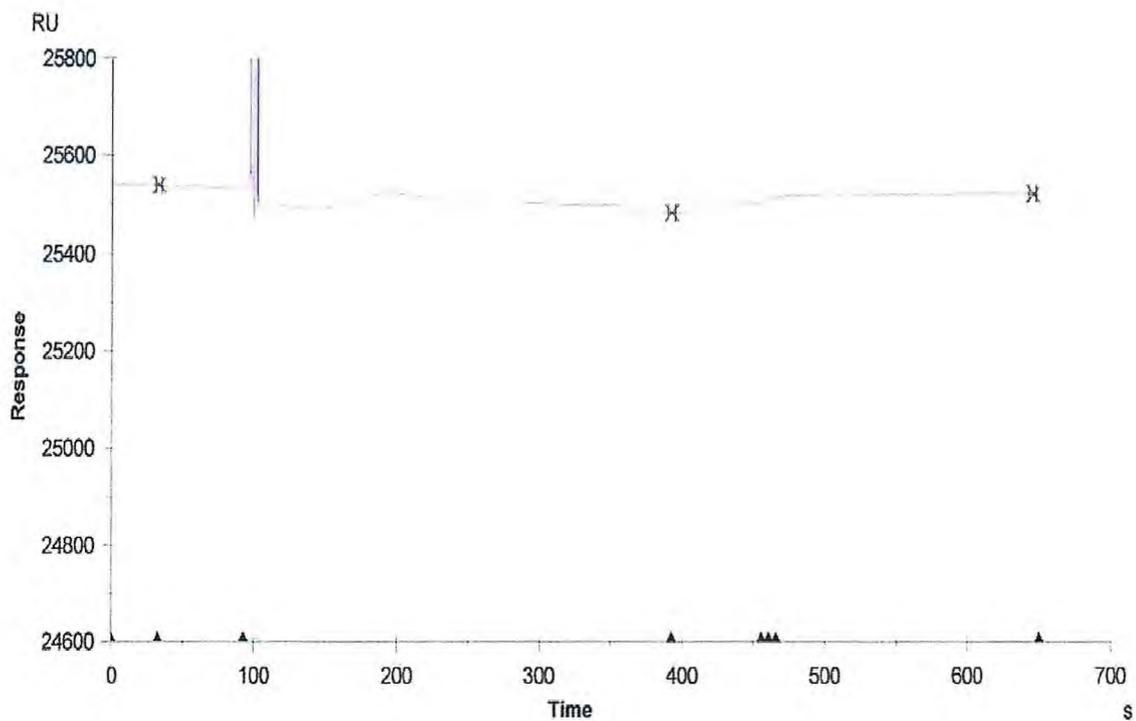


FIGURA 28 – Cinética de interação entre a lectina tóxica da salsa (100 $\mu\text{g/ml}$) e a aglutinina de *Glycine max*. Volume injetado: 25 μl ; Fluxo: 5 $\mu\text{l/min}$.

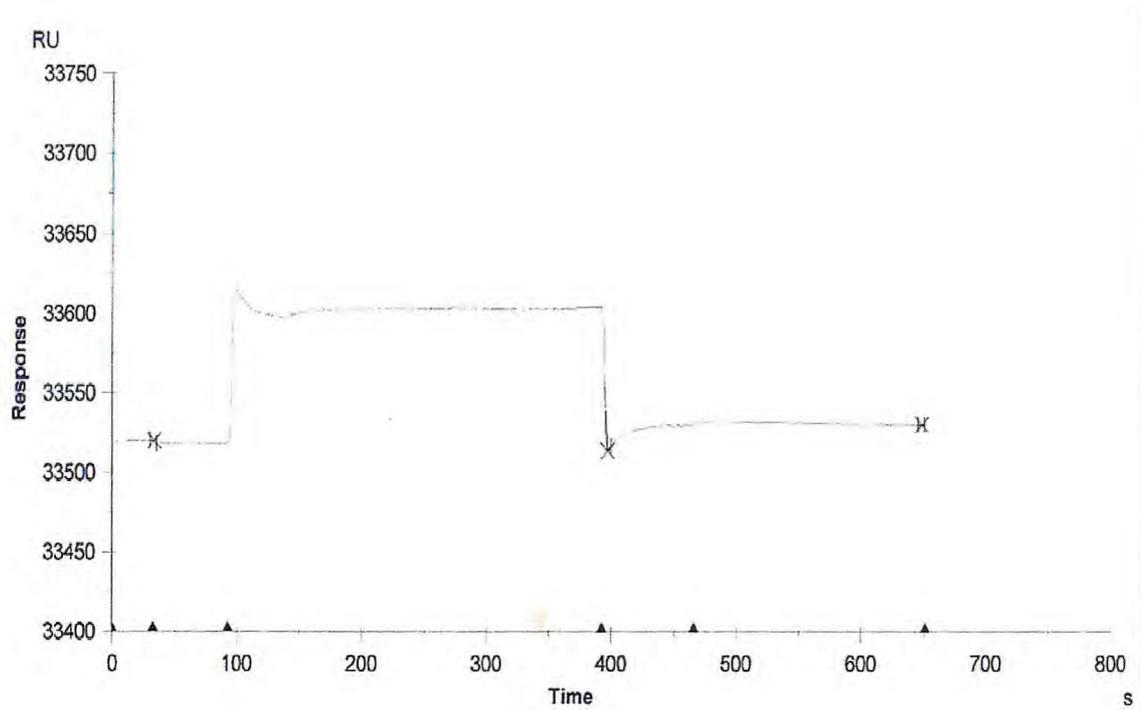


FIGURA 29 – Cinética de interação entre a lectina tóxica da salsa (100 $\mu\text{g/ml}$) e a lectina de *Cratylia floribunda*. Volume injetado: 25 μl ; Fluxo: 5 $\mu\text{l/min}$.