



Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

**PROTEÍNAS DE SEMENTES DE *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith:
VALOR NUTRICIONAL E BIOATIVIDADE CONTRA PATÓGENOS E
VETORES DE DOENÇAS**

DAVI FELIPE FARIAS

Fortaleza-Ceará

2009

DAVI FELIPE FARIAS

**PROTEÍNAS DE SEMENTES DE *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith:
VALOR NUTRICIONAL E BIOATIVIDADE CONTRA PATÓGENOS E
VETORES DE DOENÇAS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho

Fortaleza-Ceará

2009

F238p

Farias, Davi Felipe

Proteínas de sementes de *Amburana cearensis* (Allemao) A. C. Smith: valor nutricional e bioatividade contra patógenos e vetores de doenças / Davi Felipe Farias, 2009.

187 f. ;il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho

Área de concentração: Bioquímica vegetal

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Bioquímica, Fortaleza, 2009.

1. *Aedes aegypti*. 2. Valor nutricional. 3. Proteínas bioativas. 4. Antimicrobiano. 5. Larvicida. I. Carvalho, Ana de Fátima Fontenele Urano (orienta.). II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. III. Título.

CDD 574.192

DAVI FELIPE FARIAS

PROTEÍNAS DE SEMENTES DE *Amburana cearensis* (Allemao) A. C. Smith:
VALOR NUTRICIONAL E BIOATIVIDADE CONTRA PATÓGENOS E
VETORES DE DOENÇAS

Esta Dissertação foi submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca do Centro de Ciências e Tecnologia da referida universidade.

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

Aprovada em: ____/____/____.

Davi Felipe Farias

Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho
Departamento de Biologia
Universidade Federal do Ceará
- Orientadora –

Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
- Examinadora –

Prof. Dr. Cláudio Cabral Campello
- Examinador –
Faculdade de Veterinária
Universidade Estadual do Ceará

**Aos meus pais, aos meus irmãos, a Carlosnaik, aos meus
parentes e amigos mais próximos, e a minha orientadora
dedico este trabalho, mais um grande e firme passo
dado graças ao apoio pessoas tão valorosas.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho, inicialmente pela feliz convivência ao longo destes sete anos, pela confiança e amizade em tantos momentos difíceis, pelo apoio incondicional e autonomia na execução das minhas mais loucas idéias de jovem cientista e por não medir esforços em oferecer-me a melhor formação acadêmica possível ao seu alcance, puxando minha orelha nas horas certas e ensinando-me uma ciência livre de vaidades e, realmente, engajada em solucionar problemáticas sociais e ambientais. Mais uma vez, obrigado.

À Profa. Ilka Maria Vasconcelos, inicialmente por aceitar a participação em minha banca examinadora e por sempre me receber em seu laboratório com alegria, carinho e paciência, disponibilizando toda a infraestrutura de seu laboratório e pessoal a este trabalho. Além disso, por disponibilizar-se a esclarecer minhas dúvidas, pelas valorosas sugestões e, especialmente, por acreditar em mim para revisar alguns de seus artigos e aceitar minhas sugestões na execução de alguns dos trabalhos de seus alunos.

Ao Prof. Dr. Cláudio Cabral Campello, inicialmente por aceitar a participação em minha banca examinadora, pelos ensinamentos várias vezes cedidos, presteza, amizade e por confiar em mim na execução de vários ensaios de seus projetos.

À Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo, pela motivação, presteza e por me ceder a infraestrutura e o pessoal do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia, indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Profa. Suzana Cláudia Martins Silveira e a Profa. Cláudia Miranda Martins, pela convivência agradável ao longo de todos estes anos.

A todos os professores que ministraram disciplinas para o Curso de Mestrado em Bioquímica Vegetal, pelos conhecimentos cedidos e, em especial, à Profa. Ilka Vasconcelos e ao Prof. José Tadeu Abreu de Oliveira por me trazerem experiências de vida e ensinamentos que livros não podem transmitir.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, na pessoa da Profa. Dra. Norma Benevides, Coordenadora, da Profa. Dra. Ilka Vasconcelos, Vice-Coordenadora, e de Márcio Souza, Secretário, pelo apoio institucional no decorrer de meu curso de Mestrado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec), onde este trabalho foi realizado, Glauber Lima, Sayonara Viana, Bruno Soares, Terezinha Souza, Pedro Henrique, Rachel Braz, Lady Clarissa e Nathanna Sousa pelo grande e impagável apoio em todas as etapas deste trabalho, pela amizade e companheirismo. Em especial, ao melhor estudante de iniciação científica com quem já “esbarrei”, Martônio Ponte Viana, por seu valioso e indispensável apoio para realização deste trabalho, pela amizade e companheirismo. Aos meus ex-colegas de laboratório e amigos, Paulo Michel, Nara Gadelha, André Leão, Mariana Giovenardi, Eliane Araújo e Cecília Oliveira pelo apoio, paciência e carinho cedidos durante vários momentos.

À Francisca Berenice Alves (Berê), por sua amizade, alegria, presteza e carinho em tantos momentos.

A todos os colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia e do Laboratório de Microbiologia Ambiental, pelo grande apoio prestado em todos os ensaios com microrganismos apresentados neste trabalho. Em especial, agradeço a Denise Hissa, a Tallita Tavares e Vanessa Nogueira, pelo apoio mais próximo e convivência agradável durante todos esses anos.

A todos os colegas do Laboratório de Toxinas Vegetais, Geórgia Fernandes, Juliana Gifoni, Janne Morais, Hermógenes Oliveira, Henrique Oliveira, Mirella Pereira, Silvia de Paula, Andréia Maia, Ellen Paula, Raquel Rocha e Handerson Ribeiro por sempre estarem dispostos a ajudar em todos os momentos que precisei. Em especial, a minha amiga, Adelina Batista e, ao meu amigo e nutricionista, Daniel Câmara, pela amizade, pelo apoio e companheirismo durante o mestrado.

Aos amigos Valdenor e Rivalda, pelo companheirismo e amizade cedidos diariamente.

Aos colegas e amigos da turma 2007.1, pelo companheirismo durante todo o curso e, em especial, a Adelina, Eliane, Henrique, Elton, Alexcyane, Cristina, Raquel e Jefferson pela amizade e companheirismo ao longo do curso.

À minha avó, Margarida, aos meus tios maternos e paternos e a todos os meus primos (as) pelo apoio incondicional em tantos momentos difíceis pelos quais passei.

Especialmente, aos meus pais, Antonio Felipe e Ana Maria, que sempre proporcionaram-me as condições adequadas para meu crescimento e desenvolvimento pessoal e profissional. São meu porto seguro e a razão que me impulsiona a lutar e crescer todos os dias. Seus ensinamentos me guiaram por um caminho de luta e honestidade. Aos meus irmãos, Felipe Júnior e Juliana, pela amizade e companheirismo durante toda a vida. Ao Carlosnaik, pelo inestimável apoio, amor, amizade e carinho cedidos durante toda a execução deste trabalho.

Ao meu Deus, que me guia e me acompanha, ajudando-me a alcançar todos os meus objetivos, sempre fazendo-me refletir que o maior engrandecimento pessoal é proporcionar o crescimento dos que nos cercam.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Núcleo de Controle das Endemias Transmissíveis por Vetores (NUVET), da Secretária de Saúde do Estado do Ceará.

Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Laboratório de Toxinas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Laboratório de Entomologia Médica, Departamento de Saúde Comunitária, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, onde o trabalho foi desenvolvido.

“É melhor arriscar coisas grandiosas, alcançando triunfo e glória, mesmo expondo-se à derrota,
do que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito,
nem sofrem muito, porque vivem na penumbra cinzenta e
não conhecem vitória nem derrota.”

- Theodore Roosevelt -

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	19
LISTA DE TABELAS.....	25
ABREVIATURAS.....	29
RESUMO.....	30
ABSTRACT.....	32
1. INTRODUÇÃO.....	34
1.1. O Bioma Caatinga.....	34
1.2. Valorização da Biodiversidade da Caatinga.....	37
1.3. Vegetação e Flora da Caatinga, especialmente de Leguminosas	38
1.4. <i>Amburana cearensis</i> (Allemao) A. C. Smith; Fabaceae.....	40
1.5. Valor Nutricional de Proteínas Vegetais.....	42
1.5.1. Avaliação da Qualidade Nutricional de Proteínas.....	44
1.5.1.1. Digestibilidade.....	44
1.5.1.2. Utilização Líquida de Proteínas (NPU).....	45
1.5.1.3. Valor Biológico (VB).....	45
1.6. Bioatividade de Proteínas Vegetais contra Microorganismos.....	46
1.7. Bioatividade de Proteínas Vegetais contra Vetores de Doenças.....	47
2. OBJETIVOS.....	49
2.1. Objetivos Gerais.....	49
2.2. Objetivos Específicos.....	49
3. MATERIAIS.....	50
3.1. Sementes de <i>Amburana cearensis</i>.....	50
3.2. Microorganismos.....	50
3.3. Animais de Laboratório e Alojamento.....	50
3.4. Insetos e Alojamento.....	51

3.5. Reagentes Químicos e Outros Materiais.....	51
3.5.1. Proteínas.....	51
3.5.2. Meios de Cultura.....	52
3.5.3. Reagentes para Eletroforese.....	52
3.5.4. Componentes das Dietas.....	52
4. METODOLOGIA.....	53
4.1. Processamento das Sementes de <i>Amburana cearensis</i>.....	53
PARTE I. VALOR NUTRICIONAL DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE	
<i>A. cearensis</i>.....	53
4.2. Composição Química Elementar das Sementes de <i>A. cearensis</i>.....	53
4.2.1. Umidade.....	53
4.2.2. Proteínas Totais.....	54
4.2.3. Lipídios Totais.....	54
4.2.4. Matéria Mineral.....	54
4.2.5. Amido.....	55
4.2.5.1. Preparação da Solução A de Fehling.....	55
4.2.5.2. Preparação da Solução B de Fehling.....	55
4.2.5.3. Determinação do Teor de Amido.....	55
4.2.6. Açúcares Totais.....	56
4.2.6.1. Determinação de Açúcares Redutores.....	56
4.2.6.2. Determinação de Açúcares Não-Redutores.....	57
4.2.6.3. Cálculo para o Teor de Açúcares Totais.....	58
4.2.7. Fibra Alimentar.....	58
4.2.7.1. Quantificação da Fibra Alimentar Total (FAT).....	58
4.3. Caracterização Bioquímica das Proteínas das Sementes de <i>A. cearensis</i>.....	59
4.3.1. Seleção da Melhor Solução Tampão para Extração de Proteínas Solúveis.....	59
4.3.2. Dosagem de Proteínas Solúveis.....	59
4.3.3. Preparação do Extrato Bruto (EB) e Separação das principais Classes de Proteínas.....	62
4.3.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo SDS (PAGE-SDS).....	62
4.3.5. Composição em Aminoácidos.....	65

4.4. Detecção e/ou Dosagem de Fatores Tóxicos e/ou Antinutricionais.....	66
4.4.1. Lectinas.....	66
4.4.2. Inibidores de Tripsina.....	66
4.4.3. Urease.....	67
4.4.4. Toxinas.....	68
4.4.5. Taninos.....	68
4.4.6. Metabólitos Secundários.....	68
4.5. Obtenção da Fração Proteica 0-90 (F_{0/90}) do EB de Sementes de <i>A. cearensis</i>.....	69
4.5.1. Atividade Inibitória de Tripsina da F _{0/90} e Tratamento Térmico.....	69
4.5.2. Perfil Eletroforético da F _{0/90} e da F _{0/90} Tratada Termicamente em Gel de Tricina em Condições Desnaturantes.....	70
4.6. Experimento de Alimentação I.....	70
4.6.1. Avaliação da Farinha de Sementes de <i>A. cearensis</i> como Fonte de Proteínas.....	70
4.6.1.1. Dietas Experimentais.....	71
4.6.1.2. Procedimento Experimental.....	73
4.6.1.3. Parâmetros Bioquímicos Sanguíneos.....	75
4.6.1.4. Peso Relativo dos Órgãos – Base Úmida e Base Seca.....	75
4.6.1.5. Índices para Avaliação da Qualidade Proteica.....	75
4.7. Experimento de Alimentação II.....	76
4.7.1. Avaliação da F _{0/90} Obtida de Sementes de <i>A. cearensis</i> como Fonte de Proteínas.....	76
PARTE II. BIOATIVIDADE DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE <i>A. cearensis</i> CONTRA PATÓGENOS E VETORES DE DOENÇAS	78
4.8. Obtenção de Globulinas e Albuminas de Sementes de <i>A. cearensis</i>.....	78
4.8.1. Atividade Inibitória do Crescimento Bacteriano em Meio Líquido.....	78
4.8.2. Atividade Inibitória do Crescimento de Leveduras em Meio Líquido.....	79

4.8.3. Atividade Inibitória da Germinação de Esporos de Fungos Filamentosos - “Ensaio da Gota”	81
4.8.4. Atividade Inibitória do Crescimento de Fungos Filamentosos em Meio Líquido.....	82
4.8.5. Atividade Inibitória do Crescimento de Fungos Filamentosos em Meio Sólido.....	83
4.8.6. Atividade Inibitória da Eclosão dos Ovos de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	83
4.8.7. Atividade Larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	84
4.9. Obtenção das Frações Proteicas 0-70 (F_{0/70}) e 70-90 (F_{70/90}) do EB de Sementes de <i>A. cearensis</i>.....	84
4.9.1. Atividade Inibitória do Crescimento de Fungos Filamentosos pela F _{0/70} e F _{70/90} em Meio Líquido.....	85
4.9.2. Perfil Eletroforético da F _{0/70} e da F _{70/90} em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE).....	85
4.9.3. Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de Resource Q Acoplada a Sistema de FPLC.....	85
4.9.4. Perfil Eletroforético dos Picos Obtidos da Cromatografia de Troca Iônica em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE).....	86
4.10. Análise Estatística.....	86
5. RESULTADOS.....	88
PARTE I. VALOR NUTRICIONAL DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE <i>A. cearensis</i>.....	88
5.1. Composição Química Elementar das Sementes.....	88
5.2. Caracterização Bioquímica das Proteínas das Sementes de <i>A. cearensis</i>.....	88
5.2.1. Seleção da Melhor Solução Tampão para Extração de Proteínas Solúveis.....	88
5.2.2. Separação das Principais Classes de Proteínas.....	
5.2.3. Eletroforese em Condições Desnaturantes do Extrato Bruto e das Classes de proteínas.....	92
5.2.4. Composição em Aminoácidos.....	92
5.3. Presença de Fatores Tóxicos e/ou Antinutricionais.....	96

5.4. Obtenção da F_{0/90}, Proteínas Totais, Teor de Trp, Tratamento Térmico e Dosagem da Atividade Inibitória de Tripsina.....	96
5.4.1. Eletroforese da F _{0/90} e da F _{0/90} Tratada Termicamente em Condições Desnaturantes.....	99
5.5. Experimento de Alimentação I.....	99
5.5.1. Farinha de Sementes de <i>A. cearensis</i> como Fonte de Proteínas.....	99
5.6. Experimento de Alimentação II.....	111
5.6.1. Fração Proteica F _{0/90} de Sementes de <i>A. cearensis</i> como Fonte de Proteínas...	111
5.6.1.1. Crescimento dos Animais.....	111
5.6.1.2. Ganho de Peso e Dieta Ingerida.....	112
5.6.1.3. Balanço Nitrogenado e Parâmetros Nutricionais.....	115
5.6.1.4. Peso Úmido e Seco Relativo dos Órgãos e Parâmetros Séricos.....	116
PARTE II. BIOATIVIDADE DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE <i>A.cearensis</i> CONTRA PATÓGENOS E VETORES DE DOENÇAS	123
5.7. Bioatividade do EB, das Globulinas e das Albuminas.....	123
5.7.1. Atividade Inibitória do Crescimento Bacteriano em Meio Líquido.....	123
5.7.2. Atividade Inibitória do Crescimento de Leveduras em Meio Líquido.....	125
5.7.3. Atividade Inibitória da Germinação de Esporos de Fungos Filamentosos - “Ensaio da Gota”.....	125
5.7.4. Atividade Inibitória do Crescimento de Fungos Filamentosos em Meio Líquido.....	125
5.7.5. Atividade Inibitória do Crescimento de Fungos Filamentosos em Meio Sólido.....	129
5.7.6. Atividade Inibitória da Eclosão dos Ovos de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	129
5.7.7. Atividade Larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	131
5.8. Obtenção e Bioatividade das frações Proteicas 0-70 (F_{0/70}) e 70-90 (F_{70/90})	131
5.9. Atividade Inibitória do Crescimento de Leveduras e Fungos Filamentosos pela F_{0/70} e F_{70/90} em Meio Líquido.....	135
5.10. Perfil Eletroforético da F_{0/70} e da F_{70/90} em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE).....	135

5.11. Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de Resource Q Acoplada a Sistema de FPLC.....	139
5.11.1. Perfil Eletroforético dos Picos Obtidos da Cromatografia de Troca Iônica em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE).....	139
6. DISCUSSÃO.....	142
7. CONCLUSÃO.....	166
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A área em destaque no mapa representa a abrangência do Bioma Caatinga no Nordeste do Brasil. **35**
- Figura 2.** A área em destaque no mapa representa o domínio do clima semi-árido no Nordeste Brasil, por sua vez delineando a abrangência do Bioma Caatinga na mesma região. **36**
- Figura 3.** A. Ramos superiores com vagens de *Amburana cearensis* em área de Caatinga arbórea durante o período de estiagem; B. Flores branco-amareladas e pequenas em um ramo terminal de *A. cearensis*; C. Vagens maduras de *A. cearensis* recém-coletadas no município de Quixadá, Ceará; D. Sementes de *A. cearensis* desprovidas de suas asas membranáceas. **41**
- Figura 4.** Procedimento para determinação de Fibra Alimentar Total da farinha delipidada das sementes de *Amburana cearensis* segundo a metodologia descrita pela AOAC (1997). **61**
- Figura 5.** Esquema de obtenção do Extrato Bruto (EB) da farinha desidratada e delipidada de sementes de *Amburana cearensis* e obtenção sequencial da fração protéica 0-90% de saturação com sulfato de amônio. **63**
- Figura 6.** Esquema utilizado para separação das globulinas, albuminas e proteínas tipo prolaminas, glutelinas ácidas e glutelinas básicas de *Amburana cearensis*. **64**
- Figura 7.** A. Imagem do Biotério experimental do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec), Departamento de Biologia da UFC, mostrando à direita as estantes com as gaiolas metabólicas utilizadas nos experimentos de alimentação. **B.** Gaiola metabólica utilizada nos experimentos de alimentação com coleta separada de fezes, urina, água e de dieta **74**

disperdiçadas.

Figura 8. Esquema de obtenção do Extrato Bruto (EB) e das frações Globulina e Albumina da farinha desidratada e delipidada de sementes de *Amburana cearensis*. **80**

Figura 9. Esquema de obtenção das frações protéicas 0-70 (F_{0/70}) e 70-90 % (F_{70/90}) de saturação de sulfato de amônio das albuminas obtidas do extrato bruto de sementes de *Amburana cearensis*. **87**

Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS (2%) e β-mercaptoetanol (2,5%) do extrato bruto - EB (50 µgP) obtido da farinha de sementes de *Amburana cearensis*. À esquerda, os marcadores de massa molecular: lisozima (14,4 kDa); inibidor de tripsina da soja (21,4 kDa); anidrase carbônica (31,0 kDa); ovalbumina (45,0 kDa); albumina sérica bovina (66,2 kDa); fosforilase B (97,4 kDa); β-galactosidase (116 kDa) e miosina (216 kDa). À direita, o extrato bruto (EB). **93**

Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS (2,0%) e β-mercaptoetanol (2,5%) das principais classes de proteínas obtidas a partir da farinha de sementes de *Amburana cearensis*. Em cada poço foram aplicados 50 µgP. 1). Marcadores de massa molecular: lisozima (14,4 kDa), inibidor de tripsina da soja (21,4 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), β-galactosidase (116 kDa) e miosina (216 kDa); 2). Globulina; 3) Albumina; 4) Glutelina básica; 5) Glutelina ácida; e, 6) Prolamina. **94**

Figura 12. Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS (1%) e β-mercaptoetanol (0,7%) do extrato bruto (EB) obtido da farinha de sementes de *Amburana cearensis* e sua fração F_{0/90} não-tratada e tratada termicamente em água fervente, por 180 min. Em cada poço foi injetado 50 µgP de cada amostra. 1) Marcadores de massa molecular: lisozima (14,4 kDa), inibidor de tripsina da **101**

soja (21,4 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), β -galactosidase (116 kDa) e miosina (216 kDa); 2) Extrato Bruto (EB); 3) F_{0/90}; e, 4) F_{0/90} tratada termicamente. A seta indica a altura da banda protéica referente ao inibidor de tripsina de *A. cearensis*.

Figura 13. Curva de crescimento dos ratos alimentados (n = 6/grupo) durante 4 dias com uma dieta á base da farinha integral de sementes de *Amburana cearensis* crua (Dieta AC) e processada termicamente, demolho e fervura por 90 min, (Dieta ACP) como fonte de proteínas; uma dieta padrão (Dieta DP), com a proteína da clara do ovo como fonte de proteica; e uma dieta aprroteica (Dieta DAp), isenta de proteínas. **103**

Figura 14. À esquerda, rato alimentado com dieta à base da clara do ovo (Dieta Padrão) comparado aos demais ratos alimentados com a dieta isenta de proteínas – Dieta Aprroteica (A), com a dieta à base da farinha integral crua – Dieta AC (B) e processada, demolho e fervura por 90 min, – Dieta ACP (C) de sementes de *A. cearensis*. **105**

Figura 15. Curvas de crescimento dos ratos alimentados (n = 6/grupo) durante 10 dias com uma dieta à base da fração proteica F_{0/90} obtida por precipitação com sulfato de amônio do EB da farinha delipidada de sementes de *Amburana cearensis* como fonte de proteínas (Dieta FP); outra dieta à base da fração proteica F_{0/90} processada termicamente (Dieta FPP); uma dieta padrão, com a proteína da clara do ovo como fonte de proteica (Dieta DP); e uma dieta aprroteica, isenta de proteínas (Dieta DAp). **113**

Figura 16. Relação ganho de peso e dieta ingerida dos ratos alimentados (n = 6/grupo) durante 10 dias com uma dieta à base da fração proteica F_{0/90} obtida do EB da farinha delipidada de sementes de *Amburana cearensis* como fonte de proteínas (Dieta FP) e outra dieta à base da fração proteica F_{0/90} processada **114**

termicamente (Dieta FPP), comparadas a uma dieta padrão, com a proteína da clara do ovo como fonte de proteína (Dieta DP) e uma dieta aprroteica (Dieta DAp).

Figura 17. Curvas de crescimento de cinco cepas bacterianas crescidas em caldo nutritivo, contendo o extrato bruto de sementes de *Amburana cearensis* (EB = 2,73 mgP), albuminas (Alb = 1,0 mgP), globulinas (Glob = 1,0 mgP), BSA (1,0 mgP), água (C -) e formol 0,4 % (C +). Os valores do coeficiente de variação para cada ponto foram ≤ 10 %.

Figura 18. Curvas de crescimento de quatro leveduras crescidas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), pH 5,0, contendo o extrato bruto de sementes de *Amburana cearensis* (EB = 2,73 mgP), albuminas (Alb = 1,0 mgP), globulinas (Glob = 1,0 mgP), BSA (1,0 mgP), água (C -) e formol 0,4 % (C +). Os valores do Coeficiente de Variação para cada ponto foram ≤ 10 %.

Figura 19. Atividade inibitória da germinação dos esporos de *Penicillium herguei* na presença do extrato bruto (EB) de sementes de *Amburana cearensis* nas concentrações de 2,48 (A), 1,24 (B) e 0,62 mgSST. mL⁻¹ (C), e na presença dos controles NaCl-Glucose 150 mM (D) e peróxido de hidrogênio 10 mM (E) após 48 h.

Figura 20. Curvas de crescimento de seis fungos filamentosos crescidos em caldo YPD (*Yeast Potato Dextrose*), contendo o extrato bruto de sementes de *Amburana cearensis* (EB = 2,73 mgP), albuminas (Alb = 1,0 mgP), globulinas (Glob = 1,0 mgP), BSA (1,0 mgP), água (C -) e peróxido de hidrogênio 10 mM (C +). Os valores do coeficiente de variação para cada ponto foram ≤ 10 %.

Figura 21. Crescimento em agar batata do fungo filamentoso fitopatogênico *Aspergillus niger* na presença do extrato bruto (EB) de sementes de *Amburana cearensis* (EB = 8,24 mgP), albuminas (Alb = 3,0 mgP), globulinas (Glob = 3,0

mgP) e nistatina (C+) após 24 h.

Figura 22. Curvas de crescimento de seis fungos filamentosos crescidos em caldo YPD (*Yeast Potato Dextrose*), contendo as albuminas (1,0 mgP) obtidas do EB de sementes de *Amburana cearensis*, a F_{0/70} (0,33 mgP), F_{70/90} (0,28 mgP), solução-tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 (C -) e peróxido de hidrogênio 10 mM (C +). Os valores do coeficiente de variação para cada ponto foram ≤ 10 %.

Figura 23. Curvas de crescimento de quatro leveduras crescidos em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), pH 5,0, contendo as albuminas (1,0 mgP) obtidas do EB de sementes de *Amburana cearensis*, a F_{0/70} (0,33 mgP), F_{70/90} (0,28 mgP), solução-tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 (C -) e formol 0,4 % (C +). Os valores do Coeficiente de Variação para cada ponto foram ≤ 10%.

Figura 24. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS (2,0%) e β-mercaptoetanol (2,5%) do extrato bruto (EB) e das frações proteicas F_{0/70} e F_{70/90} derivadas das albuminas obtidas a partir da farinha de sementes de *Amburana cearensis*. Em cada poço foram aplicados 50 µgP de cada amostra. 1). Marcadores de massa molecular: lisozima (14,4 kDa), inibidor de tripsina da soja (21,4 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), β-galactosidase (116 kDa) e miosina (216 kDa); 2) EB; 3) F_{0/70}; e 4) F_{70/90}.

Figura 25. Cromatografia de troca-iônica em coluna aniônica (Resource Q) da fração 70/90 (10 mgP) obtida por precipitação com sulfato de amônio das albuminas das sementes de *Amburana cearensis*. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. O material que não interagiu com a coluna está contido no PNR (pico não-retido). PRI, PRII e PRIII foram eluídos com tampão de equilíbrio contendo 0,1 M, 0,2 M e 1,0 M de NaCl, respectivamente.

Figura 26. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS (2,0%) e β -mercaptoetanol (2,5%) revelada com nitrato de prata das frações proteicas obtidas de F_{70/90} em coluna de Resource Q. Em cada poço foram aplicados 5 μ gP de cada amostra. MM = marcadores de massa molecular: lisozima - 14,0 kDa, inibidor de tripsina da soja - 21,4/19,7 kDa (duplo), anidrase carbônica - 31,0 kDa, ovalbumina - 45,0 kDa, albumina sérica bovina - 66,2 kDa, fosforilase B - 97,4, β -galactosidase - 116 kDa, miosina - 212 kDa; PNR: pico não-retido; PRI: pico retido I eluído com NaCl 0,1 M; PII: pico retido II eluído com NaCl 0,2 M; PRIII: pico retido III com NaCl 1,0 M. **141**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Composição (g. Kg⁻¹) e densidade calórica (Kcal. g⁻¹) das dietas controle (Dieta padrão – DP e Dieta Aproveiteica - DAp) e experimentais (Farinha crua de sementes de *Amburana cearensis* – DAC e Farinha processada termicamente de sementes de *A. cearensis* – DACP, ambas suplementadas com L-metionina). **72**
- Tabela 2.** Composição (g. Kg⁻¹) e densidade calórica (Kcal. g⁻¹) das dietas controle (Dieta padrão – DP e Dieta Aproveiteica - DAp) e experimentais (Fração proteica F_{0/90} do extrato bruto de sementes de *Amburana cearensis* – DFP e Fração proteica F_{0/90} processada termicamente de sementes de *Amburana cearensis* – DFPP, ambas suplementadas com L-metionina e L-triptofano). **77**
- Tabela 3.** Composição química elementar (g. 100g⁻¹) e energia (Kcal. 100g⁻¹) da farinha integral de sementes de *Amburana cearensis* em base seca*. **89**
- Tabela 4.** Extração (n = 3) de proteínas (mg. mL⁻¹) da farinha delipidada de sementes de *Amburana cearensis* expostas a diferentes soluções-tampão com diferentes pH*. **90**
- Tabela 5.** Teores das proteínas (N x 6,25) das frações proteicas presentes nas sementes de *Amburana cearensis* obtidas com diferentes soluções de extração. **91**
- Tabela 6.** Composição de aminoácidos (g. Kg de proteína⁻¹) da farinha delipidada de sementes de *Amburana cearensis* comparada aos requerimentos estabelecidos pela FAO/WHO/UNU para crianças e aos requerimentos estabelecidos para ratos em crescimento. **95**
- Tabela 7.** Análise quantitativa da presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais nas sementes de *Amburana cearensis*. **97**

- Tabela 8.** Análise qualitativa da presença de metabólitos secundários no extrato etanólico de sementes de *Amburana cearensis*. 98
- Tabela 9.** Atividade inibitória de tripsina* na F_{0/90} e na F_{0/90} submetida à fervura por diferentes tempos. 100
- Tabela 10.** Ganho de peso (g) e ingestão diária (g/ rato) dos ratos (n = 6/ grupo) alimentados com a Dieta Padrão – Dieta DP (clara do ovo como fonte de proteínas), grupo Dieta Aprroteica – Dieta DAp (isenta de proteínas), grupo Dieta AC (à base da farinha de sementes de *A. cearensis* crua como fonte de proteínas) e do grupo Dieta ACP (à base da farinha de sementes de *A. cearensis* processada, demolho e fervura por 90 min, como fonte de proteínas). 104
- Tabela 11.** Peso úmido relativo (%) dos órgãos dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas experimentais à base da farinha integral crua (Dieta AC) e processada, demolho e fervura por 90 min, (Dieta ACP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas comparadas às dietas controles, uma com a clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão) e outra isenta de proteínas (Dieta Aprroteica). 108
- Tabela 12.** Peso seco relativo (%) dos órgãos dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas experimentais à base da farinha integral crua (Dieta AC) e processada, demolho e fervura por 90 min, (Dieta ACP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas comparadas com as dietas controles, uma com a clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão) e outra isenta de proteínas (Dieta Aprroteica). 109
- Tabela 13.** Parâmetros séricos dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas experimentais à base da farinha integral de sementes de *A. cearensis* crua (Dieta AC) e processada, demolho e fervura por 90 min, (Dieta ACP) como fonte de proteínas, comparadas com as dietas controles, uma com a clara do ovo como

fonte de proteínas (Dieta Padrão) e outra isenta de proteínas (Dieta Aproteica) por um período de 4 dias.

Tabela 14. Balanço de nitrogênio* dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas experimentais à base da fração proteica F_{0/90} (Dieta FP) e da F_{0/90} processada termicamente, demolho e fervura por 90 min, (Dieta FPP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas, comparados a dieta padrão à base da clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão), calculados para os últimos cinco dias de experimento. **118**

Tabela 15. Parâmetros nutricionais obtidos da alimentação de ratos (n=6/grupo) com dietas experimentais à base da fração proteica F_{0/90} (Dieta FP) e da F_{0/90} processada termicamente, demolho e fervura por 90 min, (Dieta FPP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas, comparados a dieta padrão à base da clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão). **119**

Tabela 16. Peso úmido relativo (%) dos órgãos dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas experimentais à base da fração proteica F_{0/90} (Dieta FP) e da F_{0/90} processada termicamente, demolho e fervura por 90 min, (Dieta FPP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas e com as dietas controles, uma com a clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão) e outra isenta de proteínas (Dieta Aproteica). **120**

Tabela 17. Peso seco relativo (%) dos órgãos dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas experimentais à base da fração proteica F_{0/90} (Dieta FP) e da F_{0/90} processada termicamente, demolho e fervura por 90 min, (Dieta FPP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas e com as dietas controles, uma com a clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão) e outra isenta de proteínas (Dieta Aproteica). **121**

Tabela 18. Parâmetros séricos dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas **122**

experimentais à base da fração proteica F_{0/90} (Dieta FP) e da F_{0/90} processada termicamente, demolho e fervura por 90 min, (Dieta FPP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas e com as dietas controles, uma com a clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão) e outra isenta de proteínas (Dieta Aproteica) por um período de 10 dias.

Tabela 19. Efeitos do extrato aquoso bruto e das frações proteicas albumina e globulina das sementes de *Amburana cearensis* sobre a eclosão dos ovos e sobrevivência de larvas em 1º estágio de *Aedes aegypti* após 72 h de exposição. **132**

Tabela 20. Efeitos do extrato bruto e das frações proteicas albumina e globulina de sementes de *Amburana cearensis* sobre a eclosão dos ovos e sobrevivência de larvas em 1º estágio de *Aedes albopictus* após 72 h de exposição. **133**

Tabela 21. Efeitos do extrato bruto e das frações proteicas albumina e globulina das sementes de *Amburana cearensis* sobre larvas em 3º estágio de *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* após 24 h de exposição. **134**

ABREVIATURAS

BAPNA	<i>N</i> α-Benzoil-DL-Arginina-p-Nitroalinida
BSA	Albumina Sérica Bovina
CRA	Capacidade de Retenção de Água
CL₅₀	Concentração Letal capaz de matar 50 % organismos
Dap	Digestibilidade aparente
Dv	Digestibilidade verdadeira
DL₅₀	Dose Letal capaz de matar 50 % dos animais testados
FAT	Fibra Alimentar Total
gTI	Gramas de Tripsina Inibida
NPU	Utilização Líquida da Proteína
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SST	Sólidos Solúveis Totais
TEMED	<i>N</i> ', <i>N</i> ', <i>N</i> ', <i>N</i> ', tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
VB	Valor Biológico

RESUMO

Amburana cearensis (Allemao) A. C. Smith, popularmente conhecida como Imburana-de-Cheiro ou Cumaru, é uma leguminosa arbórea da subfamília Papilionoideae de ocorrência freqüente na região do domínio Caatinga. Apesar dos inúmeros usos etnobotânicos, poucos trabalhos relatam atividades biológicas de interesse médico e/ou agroindustrial para esta espécie ou, mesmo, sua utilização como fonte de alimento para humanos e/ou animais. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar as proteínas de *A. cearensis* quanto a seu valor nutricional aliado à sua caracterização bioquímica e quanto à presença de bioatividade contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos, todos patógenos do homem, de animais ou de plantas de importância econômica, e, ainda, contra os vetores de doenças, *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*. Para tanto, sementes foram coletadas em área de caatinga arbórea, no município de Quixadá – CE, sendo, posteriormente, desidratadas e finamente moídas. As sementes de *A. cearensis* possuem alto potencial nutricional, revelado pelo alto teor de proteínas ($22,69 \pm 0,81 \text{ g. } 100 \text{ g}^{-1}$), lipídios ($24,45 \pm 2,02 \text{ g. } 100 \text{ g}^{-1}$) e fibra alimentrar ($34,75 \pm 1,78 \text{ g. } 100 \text{ g}^{-1}$), retendo quantidades menores de amido ($11,43 \pm 0,18 \text{ g. } 100 \text{ g}^{-1}$), açúcares totais ($5,60 \pm 0,09 \text{ g. } 100 \text{ g}^{-1}$), e de minerais ($4,51 \pm 0,21 \text{ g. } 100 \text{ g}^{-1}$). Sua composição aminoacídica é comparável àquela da soja e feijão. Além disso, as sementes apresentam moderados níveis de fatores antinutricionais, sendo detectados apenas atividade inibitória de tripsina ($27,41 \pm 0,03 \text{ gTI.Kg}^{-1}$), atividade ureásica ($434,0 \pm 34,0 \text{ U.Kg}^{-1}$) e alguns metabólitos secundários, como taninos, fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas e esteróides. Componentes químicos, provavelmente de baixa massa molecular, presentes nas sementes incorporadas a dietas interferem na sua aceitação e aproveitamento por parte dos animais, uma vez que quando a fração proteica ($F_{0/90}$) obtida de suas proteínas solúveis é incorporada à dieta balanceada, apresenta boa aceitação pelos animais, mostrando-se uma boa fonte de proteínas, comparável a importantes fontes de proteínas vegetais como a soja e os feijões. As proteínas das sementes de *A. cearensis* são compostas principalmente por globulinas ($74,43 \text{ g. } 100 \text{ g}^{-1}$) e albuminas ($14,23 \text{ g. } 100 \text{ g}^{-1}$), com quantidades menores de proteínas do tipo glutelinas básicas ($10,07 \text{ g. } 100 \text{ g}^{-1}$), prolaminas ($1,20 \text{ g. } 100 \text{ g}^{-1}$) e proteínas do tipo glutelinas ácidas ($0,07 \text{ g. } 100 \text{ g}^{-1}$). O extrato bruto (EB) das sementes apresenta uma grande diversidade de bandas proteicas com predominância de bandas com massa molecular aparente $> 45,0 \text{ kDa}$. As sementes de *A. cearensis* possuem também alto potencial bioativo, destacando-se as atividades de suas proteínas

majoritárias (globulinas e albuminas) contra o crescimento de bactérias e leveduras patógenas do homem e de fungos filamentosos fitopatogênicos, e atividade contra larvas de *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*. A atividade inibitória do crescimento de fungos fitopatogênicos concentra-se na fração F_{70/90} das albuminas, sendo rica em proteínas de baixa massa molecular (< 30 kDa). Assim, pode-se concluir que a F_{0/90} é uma boa fonte de proteína alimentar quando comparada a outras fontes vegetais já utilizadas pela população. Além disso, as globulinas e albuminas de *A. cearensis* são fontes promissoras de proteínas bioativas que devem ser estudadas mais detalhadamente e em maior grau de pureza.

Palavras-chave: *Amburana cearensis*, valor nutricional, proteínas bioativas, globulinas, albuminas, antimicrobiano, larvicida.

ABSTRACT

Amburana cearensis (Allemão) A. C. Smith, usually known in Portuguese language as “Imburana-de-Cheiro” or “Cumaru”, is a leguminous tree, subfamily Papilionoideae with common occurrence in “Caatinga” Dominion. Despite the numerous ethnobotanical uses, few studies report biological activities of medical interest and / or agribusiness for this species or yet its utilization as food for humans and / or animals. This study aimed to evaluate the proteins of *A. cearensis* on its nutritional value associated with its biochemical characterization and as to the presence of bioactivity against bacteria, yeasts and filamentous fungi, all pathogens of humans, animals or plants of economic importance, and also against the vectors of disease, *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. For this, seeds were collected in areas of caatinga trees in the municipality of Quixadá - CE and, subsequently, dried and finely ground. The seeds of *A. cearensis* have high nutritional potential, evidenced by the high content of proteins ($22.69 \pm 0.81 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), lipid ($24.45 \pm 2.02 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) and dietary fiber ($34.75 \pm 1.78 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), keeping smaller quantities of starch ($11.43 \pm 0.18 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), of total sugars ($5.60 \pm 0.09 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) and minerals ($4.51 \pm 0.21 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$). Its amino acid composition is comparable to that of soybeans and beans. Moreover, the seeds have moderate levels of antinutritional factors, being detected only trypsin inhibitory activity ($27.41 \pm 0.03 \text{ gTI Kg}^{-1}$), urease activity ($434 \pm 34 \text{ U kg}^{-1}$) and some secondary metabolites such as tannins, phenols, flavones, flavonols, and xanthone steroids. Chemical components, probably of low molecular mass present in seeds flour incorporated into diets, seem to interfere with their acceptance and use by animals since when the protein fraction (F0/90), obtained from its soluble protein, was incorporated into the balanced diet, the rats accepted well the diets and their performance indicated that F0/90 a good source of protein, comparable to major sources of vegetable protein such as soy and beans. Proteins of *A. cearensis* seeds are mainly composed of globulins ($74.43 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) and albumins ($14.23 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), with smaller quantities of glutelin basic proteins ($10.07 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), prolamins ($1.20 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) and glutelin acidic proteins ($0.07 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$). The seeds crude extract (GE) offers a wide variety of proteins as shown by electrophoretic profiles with a predominance of proteins with apparent molecular mass over 45.0 kDa. The seeds of *A. cearensis* show also high bioactive potential, especially the activities of their majority proteins (albumins and globulins) against the growth of human pathogenic bacteria and yeast and phytopathogenic filamentous fungi, and against larvae of *Aedes*

aegypti and *Ae. albopictus*. The inhibitory activity of the growth of phytopathogenic fungi concentrated in the albumins F70/90 fraction, being rich in proteins of low molecular mass (<30 kDa). Thus we can conclude that F0/90 is a good source of protein food when compared to other plant sources already used by the population. In addition, the globulins and albumins of *A. cearensis* are promising sources of bioactive proteins to be studied further and in greater purity.

Key words: *Amburana cearensis*, nutritional value, bioactive proteins, globulins, albumins, antimicrobial, larvicide.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Bioma Caatinga

O Bioma Caatinga ocupa uma área de 734.478 km², correspondendo a quase 10% do território brasileiro. Abrange todos os estados da região Nordeste e, ainda, o norte do estado de Minas Gerais (Figura 1). A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro. Isto significa que grande parte do patrimônio biológico dessa região não é encontrada em outro lugar do mundo além do Nordeste do Brasil. Essa posição única entre os biomas brasileiros não foi suficiente para garantir à Caatinga o destaque que merece. Ao contrário, a Caatinga tem sido sempre colocada em segundo plano quando se discutem políticas para o estudo e conservação da biodiversidade do país (SILVA *et al.*, 2004).

A Caatinga estende-se por todo o domínio do clima semi-árido (Figura 2), sob um solo raso e pedregoso e com um índice pluviométrico inferior a 800 milímetros anuais concentrados em menos de três meses. Tal escassez de água aliada a outros fatores abióticos criam, durante a maior parte do ano, uma feição desoladora da Caatinga, o que contribuiu para a criação de vários mitos a respeito da biodiversidade desse bioma. Dentre esses, desatacam-se três, que são comumente mencionados: 1. a Caatinga é homogênea; 2. é pobre em espécies endêmicas; e, 3. apresenta-se em bom estado de conservação. Por outro lado, nas últimas duas décadas tais mitos começaram a ser derrubados com os primeiros estudos e levantamentos de espécies vegetais e animais em poucas áreas do bioma.

Apesar de estar, realmente, bastante alterada, a Caatinga possui uma grande variedade de tipos vegetacionais, com elevado número de espécies e, também, remanescentes de vegetação ainda bem preservada, que incluem um número expressivo de táxons raros e endêmicos (GIULIETTI *et al.*, 2002).



Figura 1. A área em destaque no mapa representa a abrangência do Bioma Caatinga no Nordeste do Brasil.



Fonte: www.integracao.gov.br/programas/programasregi...

Figura 2. A área em destaque no mapa representa o domínio do clima semi-árido no Nordeste Brasil, por sua vez delineando a abrangência do Bioma Caatinga na mesma região.

A lista de espécies existentes na Caatinga é incompleta devido à falta de estudos na região. Segundo Tabarelli *et al.* (2000), mais de 40% deste bioma ainda não foi amostrado, cerca de 80% das áreas estudadas foram sub-amostradas e as áreas protegidas, como reservas e unidades de conservação, totalizam menos de 2% de todo ecossistema. Portanto, a crescente preocupação com a conservação do bioma Caatinga vem aumentando à medida que estudos são realizados na região e novas espécies endêmicas de plantas e animais são constantemente descritos (ANDRADE-LIMA, 1981; RODAL, 1992; SAMPAIO, 1995; GARDA, 1996, SILVA e OREN, 1997).

Apesar da alta biodiversidade, a Caatinga ainda é pouco explorada cientificamente [MARACAJÁ *et al.*, 2003; AMBIENTE BRASIL-AMBIENTE NATURAL (CAATINGA), 2008]. Contrapondo-se à falta de pesquisas voltadas ao seu conhecimento, há uma exploração crescente dessa vegetação, com fins meramente lucrativos, necessitando, dessa forma, de elementos básicos de sustentabilidade (ARAÚJO FILHO; BARBOSA, 2000), que venham a evitar a extinção de espécies nativas desse bioma, antes mesmo do conhecimento de várias de suas propriedades e aplicabilidades.

1.2. Valorização da Biodiversidade da Caatinga

A descoberta de espécies florestais de valor econômico e o crescente risco de extinção decorrente da ação predatória e da exploração indiscriminada em áreas nativas têm motivado o estudo de espécies que empiricamente possuem algum potencial ou propriedades que venham a ser reveladas através de pesquisas científicas antes que sejam extintas. O potencial de muitas espécies silvestres cearenses está sendo subestimado pela comunidade em suas áreas de ocorrência e pelo setor governamental competente devido à falta de conhecimento do seu real valor de utilização (RIZZINI, 1978).

Em 2003, foram produzidas no semi-árido nordestino 80 toneladas de mel de abelha, 30 toneladas de doces, sucos e geléias a partir de umbu, além de 3 mil artigos de couro comercializados mensalmente, dentre outros. Esses são apenas alguns exemplos do imenso potencial que a região semi-árida nordestina oferece com a exploração racional, pura ou associada, dos recursos do bioma caatinga.

Um outro grande filão do bioma caatinga, contudo, ainda está por ser conhecido e explorado. Ele é representado pela sua extraordinária biodiversidade, na qual se inserem espécies vegetais de uso medicinal, produtoras de óleos essenciais, agentes praguicidas e outras provedoras de matérias primas para indústria química, alimentar e farmacêutica; espécies animais, especialmente insetos, inimigas naturais de pragas, provedoras de substâncias de uso medicinal (soros, enzimas, hormônios); bactérias, fungos e líquens com propriedades de antagonismo a agentes de pragas e doenças, bioinseticidas, biolixiviadoras, antibióticas e genes indutores de tolerância aos estresses hídrico e salino, à acidez do solo e a doenças. Na identificação e expressão prática desse potencial, cabe à pesquisa um papel decisivo, ainda não assumido efetivamente. A valorização dos produtos locais é, no contexto da globalização, o grande instrumento estratégico para alcançar os objetivos principais de preservar os recursos da caatinga e assegurar, ao mesmo tempo, o bem estar das populações que nela vivem e dela dependem (GUIMARÃES FILHO, 2006).

Desta forma, um estudo sistemático poderia revelar o potencial de utilização de muitas espécies, considerando a riqueza da biodiversidade brasileira. O extrativismo fomenta, cada vez mais, os riscos de extinção das espécies e, medidas que venham inviabilizar as ações degradantes favorecendo ao mesmo tempo o domínio do conhecimento sobre os recursos naturais representam, neste momento, o caminho para a elaboração de diagnósticos e estabelecimentos de estratégias adequadas ao manejo racional desses recursos, bem como uma alternativa para a melhoria da qualidade de vida das populações envolvidas, no momento em que a conservação ambiental é fator de vital importância para a humanidade.

1.3. Vegetação e Flora da Caatinga, especialmente Leguminosas

A vegetação do bioma é extremamente diversificada, incluindo, além das caatingas, vários outros ambientes associados. São reconhecidos 12 tipos diferentes de Caatingas, que chamam atenção especial pelos exemplos fascinantes de adaptações aos habitats semi-áridos (BIOSFERA DA CAATINGA, 2008). Tal situação pode explicar, parcialmente, a grande diversidade em paisagens e tipos vegetacionais devido às variações geomorfológicas, climáticas e topográficas da região (ANDRADE-LIMA, 1981), o que influencia a distribuição, riqueza e diversidade de suas espécies vegetais. Já a altura e a densidade da comunidade vegetal deste ecossistema estão relacionadas, principalmente, com a precipitação (GOMES, 1979), mas

também com as características químicas e físicas do solo (SANTOS; RIBEIRO; SAMPAIO, 1992), sendo seu ecossistema definido pelo seu clima.

A vegetação do Bioma Caatinga é constituída, especialmente, de espécies lenhosas e herbáceas, de pequeno porte, geralmente dotadas de espinhos, sendo, geralmente, caducifólias, perdendo suas folhas no início da estação seca, e de cactáceas e bromeliáceas. Estima-se que pelo menos 932 espécies já foram registradas para a região, das quais 380 são endêmicas. As famílias arbóreas e arbustivas mais frequentes são Fabaceae, Euphorbiaceae e Cactaceae, sendo os gêneros *Senna*, *Mimosa* e *Pithecellobium* com maior número de espécies (BIOSFERA DA CAATINGA, 2008).

No que diz respeito à família Fabaceae em área de Caatinga, já foram registradas mais de 215 espécies, sendo 79 espécies endêmicas, ou seja, de ocorrência exclusiva neste bioma. A subfamília mais numerosa é a Papilionoideae com mais de 102 espécies registradas, sendo os gêneros *Zornia* e *Macroptilium* os mais numerosos, cada um com sete espécies, e o conhecido gênero *Dioclea* com cinco espécies que são popularmente conhecidas como olho-de-boi ou mucunã. A segunda família mais numerosa é a Caesalpinoideae com 84 espécies descritas, predominando o gênero *Chamaecrista* com 25 espécies, seguido do gênero *Senna* com 17 espécies e do popular gênero *Bauhinia* com 14 espécies, sendo chamadas vulgarmente de pata-de-vaca ou mororó e de grande aplicação na medicina popular. Esta subfamília abriga ainda o gênero *Caesalpinia*, importante na medicina popular, principalmente a espécie *Caesalpinia ferrea* (júca ou pau-ferro). A subfamília Mimosoideae possui cerca de 80 espécies, sendo predominantes os gêneros *Mimosa*, com 36 espécies, e *Acacia* com 11 espécies (SAMPAIO *et al.*, 2000).

1.4. *Amburana cearensis* (Allemao) A. C. Smith; Fabaceae

Amburana cearensis (Allemao) A. C. Smith, popularmente conhecida como Imburana-de-Cheiro, Amburana ou Cumaru, é uma leguminosa da subfamília Papilionoideae de ocorrência freqüente em áreas semi-áridas do Brasil, especialmente na região do domínio Caatinga. É uma árvore que atinge até 20 m de altura em áreas de caatinga com copa achatada e curta formada por folhas compostas. As flores são branco-amareladas, pequenas e muito aromáticas. O fruto é uma vagem, típica das leguminosas, de 7-9 cm de comprimento que guarda freqüentemente apenas uma semente provida de uma asa membranácea. As sementes são achatadas de 1-2 cm, rugosas, de cor escura e exalam um odor forte e agradável, típico da cumarina (Figura 3). O mesmo cheiro, embora mais fraco, está presente em todas as partes da planta. A madeira extraída do caule é resistente ao ataque de fungos e insetos, o que lhe confere um excelente valor no mercado nacional e internacional (LORENZI; MATOS, 2002; MAIA, 2004; MATOS *et al.*, 2004).

As cascas retiradas do caule e as sementes de *A. cearensis* são bastante utilizadas na medicina popular, especialmente, como cicatrizantes, anti-inflamatórias, antiespasmódicas, emenagogas, antidiarréicas, para o tratamento de várias afecções no trato respiratório, indicadas no tratamento de bronquites, asma, gripes e resfriados. O banho com cozimento das cascas é usado para tratar dores reumáticas. As folhas e vagens também servem como forragem, sendo consumidas por caprinos e bovinos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; MAIA, 2004; MATOS *et al.*, 2004).

A cumarina é um de seus principais constituintes fitoquímicos, sendo responsável, juntamente com outras substâncias, pela sua ação anti-inflamatória, broncodilatadora, antiedematogênica, anti-espasmódica, antitrombótica (LORENZI; MATOS, 2002; MATOS *et al.*, 2004).

Apesar dos inúmeros usos etnobotânicos e demais utilidades de *A. cearensis*, ainda poucos trabalhos científicos relatam atividades biológicas de interesse médico e/ou agroindustrial para esta espécie ou, mesmo, a utilização como fonte de alimentos para humanos e/ou animais visto que é uma espécie endêmica de uma área com graves problemas sócio-econômicos. Os trabalhos com *A. cearensis* que mais se destacaram nesta temática foram: a purificação de um inibidor de tripsina e quimotripsina (TANAKA *et al.*, 1989), a presença de atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e broncodilatadora (LEAL *et al.*, 2000), atividade relaxante



Fonte: Davi Farias e Harri Lorenzi.

Figura 3. A. Ramos superiores com vagens de *Amburana cearensis* em área de Caatinga arbórea durante o período de estiagem; B. Flores branco-amareladas e pequenas em um ramo terminal de *A. cearensis*; C. Vagens maduras de *A. cearensis* recém-coletadas no município de Quixadá, Ceará; D. Sementes de *A. cearensis* desprovidas de suas asas membranáceas.

muscular (LEAL *et al.*, 2003), atividade antiproliferativa (COSTA-LOTUFO, 2003) e, mais recentemente, o isolamento de um glucosídeo com efeito hepatoprotetor (LEAL *et al.*, 2008).

1.5. Valor Nutricional de Proteínas Vegetais

As proteínas são polímeros de alta massa molecular, contendo aproximadamente 16% de nitrogênio, além de outros elementos como carbono, oxigênio, hidrogênio, e às vezes enxofre e fósforo (MAHAN; SCOTT-STUMP, 1998).

Dentre os nutrientes de uma dieta, as proteínas são consideradas importantes por estarem envolvidas na síntese tecidual e em funções metabólicas específicas, sendo proveniente delas os aminoácidos necessários para a construção e manutenção dos tecidos orgânicos (SGARBIERI, 1996a,b; MAHAN; SCOTT-STUMP, 1998).

As proteínas são formadas por combinações de 21 aminoácidos em diversas proporções. Dentre esses, vários devem estar presentes na dieta – os aminoácidos essenciais – enquanto outros, não; em conseqüência, a qualidade nutricional das proteínas pode ser determinada pelo tipo e pela quantidade de seus aminoácidos constituintes. Proteínas que possuem todos os aminoácidos essenciais na quantidade e proporções adequadas são tidas como de alto valor biológico, enquanto que aquelas que possuem carência de um ou mais aminoácidos, atuando como fatores limitantes são tidas como proteínas de baixo valor biológico (LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998).

Poucos alimentos contêm proteínas com todos os aminoácidos essenciais, como as de origem animal usadas como referência, principalmente o ovo. No entanto, a ingestão de misturas de cereais e leguminosas nos fornece também as quantidades de aminoácidos necessárias para a síntese proteica (LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998). No Brasil, há muito tempo se sabe que a principal fonte proteica da alimentação é derivada da ingestão de arroz e feijão (SANTOS *et al.*, 1979). Tem sido demonstrado que essa mistura é de alto valor biológico (OLIVEIRA; VANNUCCHI, 1983), pois tem adequado teor nitrogenado, supre os aminoácidos essenciais e tem digestibilidade ao redor de 80% (PIRES *et al.*, 2006).

Os grãos de leguminosas constituem a principal fonte de proteína na dieta humana e/ou animal em muitos países tropicais e subtropicais (CRUZ *et al.*, 2004), apesar de serem deficientes em aminoácidos sulfurados, especialmente metionina (LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998; PROLL *et*

al., 1998). As populações pobres, tanto rurais como urbanas, dependem de leguminosas para a ingestão de proteína, pois as de origem animal, consideradas melhores do ponto de vista de equilíbrio de aminoácidos e digestibilidade, são de mais alto custo (CRUZ *et al.*, 2004).

A maior restrição ao uso de leguminosas deve-se à presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais, os quais depreciam a qualidade nutricional do alimento, devido a influências negativas na digestibilidade proteica (BURBANO *et al.*, 1999; BECKER-RITT *et al.*, 2004; VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). As plantas produzem alguns compostos de natureza proteica e não-proteica que podem causar efeitos deletérios nos organismos que os consomem. Quando o efeito é agudo, causando lesões em tecidos e órgãos e alterações fisiológicas que levam, em última instância, à morte do indivíduo, trata-se de uma toxina. Em oposição, um antinutriente ou fator antinutricional fica caracterizado quando o efeito provocado é crônico, ocorrendo interferência no aproveitamento de um ou mais nutrientes (SGARBIERI, 1996). Em geral, os antinutrientes podem provocar desordens fisiológicas e reduzir a biodisponibilidade dos nutrientes (SILVA; SILVA, 1999, 2000). Proll *et al.* (1998) sugeriram que antes que se recomende qualquer leguminosa sub-explorada para a dieta humana, sejam realizados estudos em animais experimentais acerca de fatores antinutricionais, visto que estes estão amplamente distribuídos nesta família.

Nos últimos anos, tem sido freqüente a publicação de trabalhos relatando os efeitos benéficos à saúde de uma série de compostos de natureza proteica considerados, anteriormente, somente como fatores antinutricionais, ou seja, que só trazem prejuízos ao bom funcionamento do organismo após sua ingestão. Atualmente, questiona-se até que nível a bioatividade de lectinas, inibidores de proteases e inibidores de alfa-amilase deve ser reduzida em uma dieta, visto que lectinas apresentam atividade anticâncer e imunomoduladora, inibidores de proteases do tipo Bowman-Birk apresentam atividade anticâncer, anti-inflamatória e antiobesidade, e inibidores de alfa-amilase ajudam no controle da glicemia, atuando de forma efetiva no tratamento do diabetes. Portanto, alimentos contendo tais compostos, em níveis ainda a serem definidos, podem promover benefícios à saúde através da prevenção ou tratamento de doenças de acordo com a perspectiva nutracêutica (DURANTI, 2006).

1.5.1. Avaliação da Qualidade Nutricional de Proteínas

A qualidade nutricional das proteínas refere-se à sua capacidade de satisfazer os requerimentos nutricionais do homem por aminoácidos essenciais e nitrogênio não-essencial, para fins de síntese proteica (BLANCO; BRESSANI, 1991), sendo capaz de promover o crescimento dos jovens e manter a composição corporal do adulto (LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998). Uma mistura proteica de alta qualidade ou de alto valor biológico é aquela que apresenta boa digestibilidade, fornece quantidades adequadas de aminoácidos essenciais e de nitrogênio total (PIRES *et al.*, 2006).

Para avaliação da qualidade nutricional costuma-se recorrer, principalmente, a métodos químicos e biológicos. Esses métodos visam mostrar o que a proteína em estudo significa em relação ao seu conteúdo de aminoácidos essenciais, sua capacidade de aproveitamento e incorporação aos tecidos corporais, com base em uma proteína de referência ou nos requerimentos para humanos e animais. Alguns dos parâmetros utilizados neste trabalho são apresentados a seguir:

1.5.1.1. Digestibilidade

A digestibilidade é o primeiro fator que afeta a eficiência da utilização proteica da dieta. É referida como a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado, isto é, avalia a proporção de nitrogênio, proveniente da dieta, que ficou retido no organismo. Quando certas ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, parte da proteína é excretada nas fezes, ou transformada em produtos do metabolismo pelos microrganismos do intestino grosso (SGARBIERI; WHITAKER, 1982; PIRES, 2006).

A digestibilidade aparente (Dap) é calculada com base no nitrogênio ingerido e no eliminado pelas fezes. A digestibilidade verdadeira (Dv), mais precisa, leva em conta o nitrogênio endógeno, ou seja, eliminado pelas fezes do grupo alimentado com dieta isenta de proteínas (grupo aprotéico) (DE ANGELIS, 1986a; SGARBIERI, 1996a; LAJOLO e TIRAPEGUI, 1998). As equações para o cálculo da digestibilidade são:

$$D_{ap} = \frac{N \text{ ingerido} - N \text{ fecal}}{N \text{ ingerido}} \times 100 = \frac{N \text{ absorvido}}{N \text{ ingerido}} \times 100$$

$$D_v = \frac{N \text{ ingerido} - (N \text{ fecal} - N \text{ fecal endógeno})}{N \text{ ingerido}} \times 100$$

1.5.1.2. Utilização Líquida de Proteínas (NPU)

É o percentual de nitrogênio, obtido pela dieta, que ficou retido no organismo, segundo o método de Miller e Bender (1955). O nitrogênio retido é determinado pelo teor de nitrogênio total da carcaça do grupo experimental comparado com o nitrogênio total da carcaça do grupo alimentado com dieta isenta de proteínas (grupo aprotéico) (MAHAN; SCOTT-STUMP, 1998). A equação é a seguinte:

$$NPU = \frac{N \text{ carcaça teste} - N \text{ carcaça aprotéico}}{N \text{ ingerido teste}} \times 100$$

1.5.1.3. Valor Biológico (VB)

Quantifica e expressa, percentualmente, a fração de nitrogênio absorvida que foi retida pelo organismo consumidor, para o seu crescimento e manutenção. Utiliza o NPU e a D_v (MAHAN; ARLIN, 1992):

$$VB = \frac{NPU}{D_v}$$

1.6. Bioatividade de Proteínas Vegetais contra Microorganismos

Nos últimos anos, a resistência de microorganismos patogênicos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos a múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, comumente comercializados e usados no tratamento de doenças infecciosas (NOVAIS *et al.*, 2003). Para os fungos fitopatogênicos de importância agrônômica não tem sido muito diferente. Em todos os lugares do mundo onde se pratica uma agricultura econômica, a intervenção para o controle de doenças de plantas é largamente realizada através do uso de pesticidas (KIMATI *et al.*, 1997). Sem dúvida, o uso racional desses produtos pode ter, em curto prazo, um efeito positivo para o produtor. No entanto, em longo prazo, além do surgimento de isolados dos fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, os resultados para a sociedade como um todo e para o meio ambiente podem se tornar negativos devido à poluição causada pela deposição dos resíduos (ZADOKS, 1992). Ambas as problemáticas tem forçado os cientistas à busca constante de novas drogas. Neste contexto, os vegetais apresentam-se como excelentes fontes de busca de novas drogas antimicrobianas, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos produtos de síntese química (NOVAIS *et al.*, 2003).

Vários autores referem-se às proteínas vegetais como promissoras moléculas no combate a microorganismos patogênicos (WANG *et al.*, 2001; KELEMU *et al.*, 2004; MINCOFF *et al.*, 2006). Wang e Ng (2007) listaram uma coletânea de trabalhos a fim de apontar as principais classes de proteínas potencialmente envolvidas na defesa do vegetal contra microorganismos patogênicos, sendo as seguintes classes: glucanases, quitinases, proteínas tipo-quitinase, proteínas ligantes à quitina, proteínas semelhantes a alergénos, proteínas semelhantes à miraculina, proteínas semelhantes à ciclofilina, proteínas transferidoras de lipídios, proteínas semelhantes à taumatina, peroxidases, defensinas, proteínas semelhantes à defensinas, lectinas/hemaglutininas, proteínas inativadoras de ribossomos, inibidores de proteases e novos peptídeos/proteínas com atividade antimicrobiana. Os genes que codificam para este grande número de peptídeos/proteínas ativos contra fitopatógenos podem ser inseridos em organismos geneticamente modificados a fim de torná-los resistentes às pragas ou, então, induzir a sua expressão em importantes partes da planta, como nas sementes, sem necessariamente transformá-las (TURRINI *et al.*, 2004). Além disso,

esses compostos podem atuar no combate a patógenos do homem e/ou dos animais a partir de sua veiculação em fórmulas farmacêuticas.

1.7. Bioatividade de Proteínas Vegetais contra Vetores de Doenças

A dengue é hoje a arbovirose mais importante do mundo. Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas encontram-se sob o risco de se infectarem, principalmente em países tropicais e subtropicais onde as condições climáticas (temperatura e umidade) são favoráveis a proliferação do *Aedes aegypti*, o mosquito vetor do vírus da dengue mais importante (TAUIL, 2002; SILVA *et al.*, 2004). Esta por sua vez, dentre outras doenças transmitidas por vetores, é a causa mais importante de impacto em termos de morbimortalidade na população mundial nos últimos anos, exigindo intensos esforços e investimentos dos serviços de saúde pública (CORREA *et al.*, 2005).

Os mosquitos geralmente adquirem o vírus enquanto se alimentam de sangue de pessoas infectadas. Depois de incubado por 8 – 10 dias, a fêmea infectada é capaz, durante a picada e a alimentação, de transmitir o vírus a indivíduos suscetíveis. As fêmeas infectadas podem transmitir o vírus para a sua prole via transmissão transovariana (via ovos), mas sua importância na transmissão do vírus para os humanos ainda não foi esclarecida (WHO, 1997).

O *Aedes albopictus* é um mosquito de origem asiática que teve sua dispersão incrementada para outras partes do mundo desde 1980, sendo considerado a segunda espécie de Culicidae em importância para o homem como vetor do vírus da dengue, sendo superado apenas pelo *Ae. aegypti*. No Brasil, atinge 14 estados brasileiros, tendo se disseminado rapidamente desde o primeiro registro da espécie no país, em 1986. Devido à sua rápida dispersão, foi provado que essa espécie é capaz de utilizar uma grande variedade de criadouros artificiais, sendo, portanto, um colonizador eficiente (BORGES, 2001). Além disso, a propagação através dos mais diversos ambientes, o torna um depósito potencial de vírus ou outros patógenos de humanos (GOMES *et al.*, 1999). Este inseto é o vetor natural da dengue nas áreas rurais, suburbanas e urbanas da Ásia, além de ser transmissor da encefalite japonesa (CONSOLI; OLIVEIRA 1994). Populações infectadas com o vírus já foram isoladas durante uma epidemia de dengue em Minas Gerais (SERUFO *et al.*, 1993).

Por habitarem o mesmo ambiente, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* competem por território e acredita-se que esta última é mais favorecida, pois sua densidade costuma aumentar após certo tempo de coexistência. Nos demais aspectos biológicos, esta espécie em muito se assemelha ao *Ae. aegypti* (CONSOLI; OLIVEIRA 1994).

Os principais agentes usados no controle, especialmente, de larvas de insetos vetores de doenças são os inseticidas organofosforados (CARVALHO *et al.*, 2003). Como consequência do uso continuado desses produtos surgiram as populações resistentes (MACORIS *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 2003) e a permanência por longos períodos de tempo no meio ambiente afetou os ecossistemas (SILVA *et al.*, 2004). Consoli e Oliveira (2004) sugeriram a utilização de produtos naturais de plantas como alternativa para o controle químico convencional. Silva *et al.* (2004) apontam vários compostos de origem botânica com atividade larvívora e, potencialmente, viáveis no controle de vetores de doenças como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

Apesar do grande número de relatos de óleos essenciais e extratos orgânicos de várias partes vegetais com atividade inseticida, especialmente, contra *Ae. aegypti* (CARVALHO *et al.*, 2003; LUNA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004), poucos são os trabalhos de proteínas de origem vegetal com atividade contra *Aedes* sp. Apenas se conhece que proteases cisteínicas do látex de *Calotropis procera* (RAMOS *et al.*, 2006) e, mais recentemente, que lectinas de *Myracrodruon urundeuva* (SÁ *et al.*, 2008) apresentaram atividade larvívora contra *Ae. aegypti*. No entanto, já é bem conhecido que lectinas e toxinas apresentam atividade inseticida contra dípteros, mas nada se conhece sobre a atividade de inibidores de proteases serínicas e cisteínicas, inibidores de alfa-amilase e arcelinas contra essa ordem, apesar de estar bem documentada a ação desses compostos contra muitas outras ordens de insetos (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002). Portanto, a escassez de proteínas descritas com atividade contra o gênero *Aedes* resulta do pequeno número de trabalhos realizados, sendo necessário um aumento de pesquisas nesta área a fim de se abrir uma nova linha de combate a dengue.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Este trabalho objetivou a realização de um amplo estudo sobre as proteínas de *Amburana cearensis*, enfocando seu potencial nutricional aliado à sua caracterização bioquímica e sua bioatividade contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos, todos patógenos do homem, de animais ou de plantas de importância econômica, e ainda, sua atividade contra os vetores de doenças *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a composição química elementar das sementes de *A. cearensis*;
- Selecionar a melhor solução extratora de proteínas e avaliar o perfil eletroforético das proteínas do extrato bruto das sementes;
- Quantificar as principais classes de proteínas presentes nas sementes, assim como visualizar seu perfil eletroforético;
- Determinar a composição de aminoácidos da semente;
- Avaliar a presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais de natureza primária e secundária nas sementes;
- Avaliar a farinha integral crua e processada (lavagem e cocção) das sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas em dietas para ratos em crescimento (Experimento de Alimentação I);
- Avaliar a fração proteica $F_{0/90}$ e a $F_{0/90}$ processada termicamente obtidas do EB de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas em dietas para ratos em crescimento (Experimento de Alimentação II);
- Avaliar o EB e as frações albumina e globulina quanto a sua atividade contra cinco bactérias, quatro leveduras e onze fungos filamentosos e, ainda, contra os vetores de doenças *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*;
- Fracionar as albuminas em $F_{0/70}$ e $F_{70/90}$ e avaliá-las quanto a sua atividade contra os mesmos fungos filamentosos e leveduras;
- Propor passos cromatográficos para a purificação das proteínas bioativas.

3. MATERIAL

3.1. Sementes de *Amburana cearensis*

As sementes de *A. cearensis* (aproximadamente 3,0 Kg) foram obtidas de vagens maduras coletadas com equipamento adequado (podão, facão e tesouras de poda) e com a ajuda de nativos em uma área de caatinga arbórea localizada na fazenda “Não me deixes” (4°58’07.51’’S 39°01’12.23’’W), município de Quixadá, no sertão central do estado do Ceará. A coleta prezou pela manutenção do banco de sementes depositado anualmente no solo, evitando a retirada excessiva de vagens de uma única árvore. Um ramo terminal com folhas e frutos foi coletado, prensado e desidratado para posterior identificação e incorporação ao acervo do Herbário Prisco Bezerra (EAC), Universidade Federal do Ceará (UFC), sob a identificação EAC 39618.

3.2. Microorganismos

As bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e as Gram-negativas *Enterobacter aerogens* ATCC 13048, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 foram cedidas pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH), do Departamento de Biologia da UFC. As leveduras *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *Pichia anomala* foram obtidas de isolados clínicos, identificadas e mantidas no referido laboratório. O mesmo laboratório cedeu cepas dos fungos fitopatogênicos *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Colletotrichum gloesporioides*, *C. musae*, *C. truncatum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. virguliformes*, *Lasioidiploidia theobromae*, *Mucor* sp., *Neurospora* sp., *Pithium oligandrum*, *Phomopsis* sp. e *Rhizoctonia solani*.

3.3. Animais de Laboratório e Alojamento

Um coelho da raça Nova Zelândia com três meses de idade foi adquirido junto ao setor de cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFC. O coelho foi mantido no Biotério de Manutenção do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC com água e ração

apropriadas *ad libitum*. Ratos machos convencionais da linhagem Wistar e camundongos machos convencionais da linhagem Swiss foram adquiridos do Biotério Central da UFC (Biocen-UFC) com 3 semanas de idade. Os animais foram alojados no Biotério Experimental do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec), do Departamento de Biologia da UFC, com temperatura ($23,0 \pm 2,0$ °C) e fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro) controlados. Os ratos e camundongos foram mantidos em número adequado em caixas de polipropileno com substrato de raspa de pinho, água e ração (Nutrilabor, Campinas, São Paulo, Brasil) *ad libitum* até atingirem cerca de 60 g e 20 g, respectivamente.

Todos os protocolos com animais, adotados neste trabalho, foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, que adota os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.4. Insetos e Alojamento

Ovos e larvas em 3º estágio de *Aedes aegypti* foram obtidos de uma colônia de mosquitos mantida no NUVET/SESA (Núcleo de Controle de Endemias Transmissíveis por Vetores da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará). Ovos e larvas de *Ae. albopictus* foram obtidos do Laboratório de Entomologia, Departamento de Saúde Comunitária da Faculdade de Medicina da UFC. As pupas de ambas as espécies foram obtidas a partir de larvas mantidas no insetário do Bioprospec. Os insetos (ovos, larvas e pupas) foram mantidos no insetário do Bioprospec com umidade 40 - 50%, temperatura 27 – 30 °C e fotoperíodo 12 h claro/12 h escuro e alimentados, diariamente, com ração para tartaruga (Reptolife, Alcon, Camboriú, Brasil). Os insetos remanescentes dos experimentos e o excedente foram sacrificados por fervura em água por 15 min.

3.5. Reagentes Químicos e Outros Materiais

3.5.1. Proteínas

Albumina sérica bovina (BSA), marcadores de massa molecular e proteases foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EEUU) e da AMRESCO Inc. (Ohio, EEUU).

3.5.2. Meios de Cultura

Agar batata, agar Mueller-Hinton, agar nutritivo, agar sabouraud, caldo nutritivo, caldo TGE (Tripton, Glucose e Extrato de levedura) e caldo BHI (“Brain-Heart Infusion”) foram obtidos da Difco, Becton, Dickinson and Company (Sparks, EEUU).

3.5.3. Reagentes para Eletroforese

Acrilamida, Coomassie Brilliant Blue R-250, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), TEMED (N', N', N', N' - tetrametiletilenodiamina), trizma-base, metilenobisacrilamida, β -mercaptoetanol, nitrato de prata e demais reagentes foram comprados das empresas Amersham Biosciences (Piscataway, EEUU), Sigma-Aldrich Co. (St Louis, EEUU), Acros Organics (Geel, Bélgica) e AMRESCO Inc. (Ohio, EEUU).

3.5.4. Componentes das Dietas

As farinhas integrais das sementes de *A. cearensis*, crua e tratada termicamente, e, ainda, uma fração proteica das sementes, tratada e não tratada termicamente, foram utilizadas como fonte de proteínas das dietas teste. Para a dieta padrão, foi utilizada a clara do ovo de galinha (Egg Whites, Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU). Foi utilizada maizena® (Unilever, São Paulo, Brasil) como fonte de amido, D(+)-glucose anidra P.A. (dextrose) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) como fonte de carboidratos simples e celulose (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) como fonte de fibra alimentar. A fonte de lipídios das dietas foi o óleo de milho Mazola® (Cargil, São Paulo, Brasil). As misturas de minerais e vitaminas utilizadas nas dietas foram produzidas a partir de reagentes de grau analítico, sendo obtidos comercialmente. Os aminoácidos L-triptofano e L-metionina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e estão citados no decorrer da descrição da metodologia, assim como todos os equipamentos usados nos experimentos.

4. METODOLOGIA

4.1. Processamento das Sementes de *Amburana cearensis*

As sementes de *A. cearensis* foram retiradas de suas vagens e moídas em moinho para grãos de café (Cadence, Caxias do Sul, Brasil). Em seguida, a farinha foi peneirada em malha de 1,0 mm² e colocada em estufa (FANEM, Modelo 002 CB, São Paulo, Brasil) a 45 °C/ 72 h para obtenção de um material mais homogêneo e livre de umidade. Para as análises de composição química elementar, foi utilizada a farinha integral desidratada das sementes de *A. cearensis* e para a análise do teor de fibra alimentar total foi utilizada farinha delipidada. Para a referida análise e para todas as demais apresentadas no decorrer deste tópico foi utilizada a farinha delipidada das sementes. A delipidação foi realizada com *n*-hexano, na proporção de 1:3 (p/v), num total de quatro trocas de solvente. O solvente foi desprendido da farinha em capela de exaustão à temperatura ambiente. As farinhas integral e delipidada foram acondicionadas em recipientes plásticos até a realização das análises.

PARTE I. VALOR NUTRICIONAL DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE *A. cearensis*

4.2. Composição Química Elementar das Sementes

4.2.1. Umidade

A umidade das sementes de *A. cearensis* foi determinada seguindo a metodologia descrita pela AOAC (1998). Em triplicata, 10 g de farinha não-desidratada de sementes de *A. cearensis* foram colocadas em recipientes limpos e tarados e deixadas a 105 °C por 24 h. O valor da umidade foi determinado pela diferença entre os pesos iniciais e finais das amostras após o processamento.

4.2.2. Proteínas Totais

As proteínas totais foram determinadas em triplicata das amostras de farinha das sementes de *A. cearensis* segundo o método Macrokjeldahl, utilizando o fator 6,25 para conversão do teor de N em teor de proteína. Balões de Kjeldahl contendo 0,5g de amostra, 25 mL de ácido sulfúrico concentrado e 5,0 g de mistura catalítica (sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio metálico, 100:10:1, respectivamente), foram levados para um digestor (Modelo MA 448, Marconi, Piracicaba, Brasil) e deixados por 1 h a 400 °C. Em seguida, o material digerido foi transferido para balões volumétricos de 100 mL, que tiveram seus volumes aferidos com água deionizada. A medida de nitrogênio foi obtida por ensaio fotolorimétrico como descrito por Baethgen e Alley (1989), utilizando uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de sulfato de amônio (Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.2.3. Lipídios Totais

O teor de lipídios totais das amostras de farinha das sementes de *A. cearensis* foi determinado em triplicata segundo o método descrito pela AOAC (1998). Amostras de 5 g foram pesadas em balança analítica (Bioprecisa, Modelo FA2104N, São Paulo, Brasil) e depositadas em cartuchos de papel de filtro, sendo, então, transferidas para um sistema de Soxhlet 303 mm. A extração foi contínua durante 8 h, sendo o *n*-hexano utilizado como solvente, na proporção de 1:5 (p/v). Em seguida, o solvente foi evaporado em estufa durante 48 h e os balões contendo os resíduos de óleo resfriados em dessecador e pesados em balança analítica. Os lipídios totais foram calculados pela diferença entre os pesos inicial e final dos balão, para posterior cálculo do percentual em relação à amostra bruta inicial.

4.2.4. Matéria Mineral

A matéria mineral foi determinada a partir de triplicata das amostras de farinha das sementes de *A. cearensis* segundo metodologia descrita pela AOAC (1998). Amostras pesando 1 g foram levadas em cadinhos de porcelana a um forno mufla (Quimis, Modelo Q-318m24,

Diadema, Brasil) e calcinizadas à temperatura de 550 °C por 4 h. O valor de matéria mineral foi determinado pela diferença entre os pesos inicial e final.

4.2.5. Amido

4.2.5.1. Preparação da Solução A de Fehling

Foram dissolvidos 34,65 g de sulfato de cobre em água destilada e levado a um volume de 500 mL.

4.2.5.2. Preparação da Solução B de Fehling

Foram dissolvidos 173 g de tartarato de sódio e potássio e 125 g de hidróxido de potássio em água destilada e completado o volume para 500 mL.

4.2.5.3. Determinação do Teor de Amido

A determinação de amido foi feita segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). Em triplicata, foram pesados 2,5 g da farinha das sementes de *A. cearensis* e adicionados 50 mL de água destilada, sendo deixada em repouso por uma 1 h, agitando-se ocasionalmente a mistura. Em seguida, o resíduo foi filtrado e lavado com 250 mL de HCl concentrado, transferindo-o para um sistema de refluxo por 140 min a partir da ebulição. A solução foi resfriada e neutralizada com NaOH. A suspensão neutralizada foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL, onde foram adicionados de 2 a 3 mL de acetato de chumbo neutro e saturado e o volume aferido. Uma alíquota da suspensão foi inserida em uma bureta de 25 mL. Ao mesmo tempo, num erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 10 mL da solução A de Fehling e 10 mL da solução B de Fehling e, ainda, 40 mL de água destilada. Em seguida, foram aquecidas e quando começou a ebulir, a solução foi titulada até a viragem de cor do vermelho tijolo para o azul a incolor. O volume gasto na titulação da solução foi inserido na seguinte fórmula:

$$\% \text{ amido} = \frac{V \times 0,05 \times 0,9 \times 100}{P \times V_t}$$

Onde:

V = volume do balão (mL) onde foi completado após a neutralização da amostra;

V_t = volume gasto (mL) na titulação das soluções de Fehling;

P = peso da amostra (g);

0,9 = fator de conversão de glucose para amido;

0,05 = g de glucose reduzida por 10 mL da mistura das soluções de Fehling.

4.2.6. Açúcares Totais

4.2.6.1. Determinação de Açúcares Redutores

A determinação de açúcares redutores foi feita segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). Em triplicata, foram pesados 3,0 g da farinha das sementes de *A. cearensis* e adicionados 100 mL de água destilada. A mistura foi aquecida a 70 °C por 15 min. Em seguida, resfriada e centrifugada. O sobrenadante foi filtrado, sendo 25 mL do filtrado transferido para um balão volumétrico de 250 mL, após a adição de 5 mL de acetato de chumbo, tendo o volume aferido. A solução contida no balão foi deixada em repouso e filtrada novamente. À solução filtrada foi adicionado 0,5 g de sulfato de sódio. Ao mesmo tempo, foram colocados em um erlenmeyer 40 mL de água destilada, 10 mL da solução A de Fehling (preparada como descrito no item 4.2.5.1) e 10 mL da solução B de Fehling (preparada como descrito no item 4.2.5.2), sendo tituladas com a solução preparada descrita anteriormente. O volume da solução gasto na titulação foi inserido na fórmula a seguir para cálculo do percentual de açúcares redutores:

$$\% \text{ açúcares redutores} = \frac{A \times 0,05 \times 100}{P \times V}$$

Onde:

A = volume da solução (mL) da amostra;

0,05 = g de glucose reduzida por 10 mL da mistura das soluções de Fehling;

P = peso da amostra (g);

V = volume da solução da amostra gasto na titulação.

4.2.6.2. Determinação de Açúcares Não-Redutores

A determinação de açúcares não-redutores foi feita segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). Foram retirados 50 mL da solução preparada para determinação de açúcares redutores e misturados a 5 mL de HCl concentrado. A solução foi levada ao banho-maria Dubnof (Modelo 304-D, Vargem Grande Paulista, Brasil) e deixada de 70 °C a 80 °C por 30 min. Em seguida, a solução foi resfriada e neutralizada com carbonato de sódio (solução saturada) e o volume completado para 250 mL. Ao mesmo tempo, foram colocados em um erlenmeyer 40 mL de água destilada, 10 mL da solução A de Fehling (preparada como descrito no item 4.2.5.1) e 10 mL da solução B de Fehling (preparada como descrito no item 4.2.5.2), sendo tituladas com a solução preparada descrita anteriormente. O volume da solução gasto na titulação foi inserido na fórmula abaixo para cálculo do percentual de açúcares não-redutores:

$$\% \text{ Açúcares não-redutores} = \left\{ \left[\frac{A \times 0,05 \times 100}{P \times V} \right] - B \right\} \times 0,95$$

Onde:

A = volume da solução (mL) da amostra;

0,05 = g de glucose reduzidas por 10 mL da mistura das soluções de Fehling;

P = peso da amostra (g) - calculado a partir da massa inicial utilizada para a determinação do açúcar redutor (3 g estavam em 100 mL, então, na alíquota retirada de 25 mL para o ensaio de açúcares não-redutores estavam 0,75 g);

V = volume da solução da amostra gasto na titulação;

B = % de açúcares redutores da amostra.

4.2.6.3. Cálculo para o Teor de Açúcares Totais

O teor de açúcares totais foi calculado através do somatório do % de açúcares redutores somado ao % de açúcares não-redutores da amostra.

4.2.7. Fibra Alimentar

A determinação do teor de fibra alimentar da farinha das sementes de *A. cearensis* foi feito em quadruplicata seguindo a metodologia descrita pela AOAC (1997) e utilizando o kit para ensaio de fibra dietética TDF-100A (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EEUU). Os procedimentos da digestão, filtração e quantificação das proteínas e da matéria mineral estão representados na Figura 4.

4.2.7.1. Quantificação da Fibra Alimentar Total (FAT)

Para quantificar o teor de fibra alimentar total alguns valores adquiridos durante o procedimento experimental, apresentado na Figura 4, foram inseridos na seguinte fórmula:

$$\% \text{ FAT} = \left\{ \left[\frac{R_{\text{amostra}} - P_{\text{amostra}} - A_{\text{amostra}} - B}{PA} \right] \right\} \times 100$$

Onde:

FAT = fibra alimentar total

R = peso médio do resíduo da amostra (mg), calculado pela diferença entre o R2 e o R1;

P = peso médio da proteína (mg);

A = peso médio da matéria mineral (mg), calculado pela diferença entre o R3 e o R1;

PA = peso médio da amostra (mg).

$B = R_{\text{branco}} - P_{\text{branco}} - A_{\text{branco}}$

4.3. Caracterização Bioquímica das Proteínas das Sementes de *A. cearensis*

4.3.1. Seleção da Melhor Solução Tampão para Extração de Proteínas Solúveis

Para determinação da melhor solução tampão de extração das proteínas, a farinha delipidada de sementes de *A. cearensis* foi submetida à extração, em duplicata, com tampões glicina-HCl 0,05 M, pH 2,6; fosfato de sódio 0,05 M, pH 5,8; fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0; tris-HCl 0,05 M, pH 8,0; e tris-HCl 0,05 M, pH 9,0, na proporção de 1:5 (p/v), por 2 h, sob agitação constante a 4 °C. Em seguida, a mistura foi filtrada em tecido de nylon. O filtrado foi mantido a temperatura de 4 °C, em recipiente separado, e ao material retido foram adicionados novamente os referidos tampões, na proporção de 1:2 (p/v), por 2 h, sob agitação constante a 4 °C. A nova mistura foi filtrada em tecido de nylon, o material retido foi descartado e o material recém-filtrado misturado ao filtrado da primeira extração e submetidos à centrifugação a 12.000 x g, por 30 min, a 4 °C. Os precipitados foram descartados e alíquotas dos sobrenadantes foram utilizadas para dosagem de proteínas.

4.3.2. Dosagem de Proteínas Solúveis

A dosagem de proteínas solúveis foi feita pelo método de Bradford (1976). A uma alíquota de 100 µL dos extratos, em diferentes tampões, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 min foram feitas às leituras das absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro (Genesys 10, Spectronic Unicam, New York, EEUU). A concentração

DIGESTÃO

1,0000 g da amostra livre de umidade em tampão fosfato de sódio 0,08 M, pH 6,0 (50 mL)
contendo 0,1 mL de α -amilase (kit TDF-100, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EEUU)



Banho-maria em ebulição (95 °C) por 15 min, agitação a cada 5 min



Resfriar à temperatura ambiente



Ajustar o pH 7,3 a 7,7 com 10 mL de NaOH 0,275 M



Adicionar 0,1 mL de protease 50 mg/mL (kit TDF-100, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EEUU)



Banho-maria a 60°C com agitação por 30 min, após a temperatura interna atingir 60 °C



Deixar resfriar à temperatura ambiente



Ajustar o pH 4,0 a 4,6 com 10 mL de HCl 0,325M



Adicionar 100 mL de amiloglucosidase (kit TDF-100, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EEUU) e
misturar bem



Banho-maria a 60°C com agitação por 30 min, após a temperatura interna atingir 60 °C



Deixar resfriar à temperatura ambiente



Acrescentar um volume de etanol 95% correspondente a 4 x o volume já existente nos recipientes



Registrar o peso do cadinho livre de umidade e da celite (referido como **R1 = cadinho + celite**)



Deixar as soluções sedimentarem *overnight* à temperatura ambiente

Umedecer e redistribuir a camada de celite (kit TDF-100, Sigma Co., St. Louis, EEUU) em cada cadinho, usando etanol 78%

FILTRACÃO

Aplicar sucção branda para sentar a celite e transferir o precipitado e a suspensão para o cadinho



Acrescentar 20 mL de etanol 78%, 2 porções de 10 mL de etanol 95% e 2 porções de 10 mL de acetona



Secar os cadinhos contendo os resíduos *overnight* em uma estufa ventilada a 105 °C ou a vácuo a 70 °C



Pesar os cadinhos livres de umidade (referido como **R2 = cadinho + celite + resíduo**)

PROTEÍNAS E CINZAS

Das 4 repetições de cada amostra, duas terão suas proteínas totais quantificadas segundo Baethgen e Alley (1989) e as outras duas a matéria mineral (registrar o peso do cadinho + amostra calcinizada = **R3**) segundo a AOAC (1990)

Figura 4. Procedimento para determinação de Fibra Alimentar Total da farinha delipidada das sementes de *Amburana cearensis* segundo a metodologia descrita pela AOAC (1997).

foi estimada em relação a uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) em NaCl 0,9%.

4.3.3. Preparação do Extrato Bruto (EB) e Separação das Principais Classes de Proteínas

Conforme os resultados obtidos no item 4.3.2, a farinha delipidada de sementes de *A. cearensis* foi submetida à extração com solução tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 nas mesmas condições descritas no item 4.3.1. Em seguida, o filtrado foi centrifugado a 12.000 x g, por 30 min, 4° C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, chamado de Extrato Bruto (EB), foi utilizado para obtenção da fração proteica 0-90 % de sulfato de amônio (Figura 5), pesquisa de alguns fatores tóxicos e/ou antinutricionais e para a avaliação das atividades biológicas contra patógenos e vetores de doenças.

As principais classes de proteínas foram separadas de acordo com sua solubilidade, em globulinas; albuminas; prolaminas e glutelinas ácidas e básicas, conforme mostrado na Figura 6.

Os teores de proteínas das diferentes classes citadas foram determinados pelo método descrito por Baethgen e Alley (1989), descrito anteriormente.

4.3.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo SDS (PAGE-SDS)

O perfil proteico do EB e das principais classes de proteínas extraídas da farinha delipidada de sementes de *A. cearensis* foi observado por eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, seguindo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). O extrato bruto foi ajustado com o tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH6,8 com SDS 2%, glicerol, azul de bromofenol e β -mercaptoetanol) para uma concentração proteica de 2,5 mg/mL. Amostras liofilizadas das albuminas, globulinas e proteínas tipo glutelinas ácidas, glutelinas básicas e prolaminas foram ressuspensas em tampão de amostra de forma que encerrassem concentrações semelhantes de proteínas (ca. 2,5 mg/mL). As amostras foram aquecidas a 100 °C, durante 10 min, e centrifugadas a 10.000 x g, durante 5 min, a 4 °C. Em seguida, 20 μ L de cada amostra foram aplicadas em poços feitos em um gel vertical de 2 mm de espessura, composto por

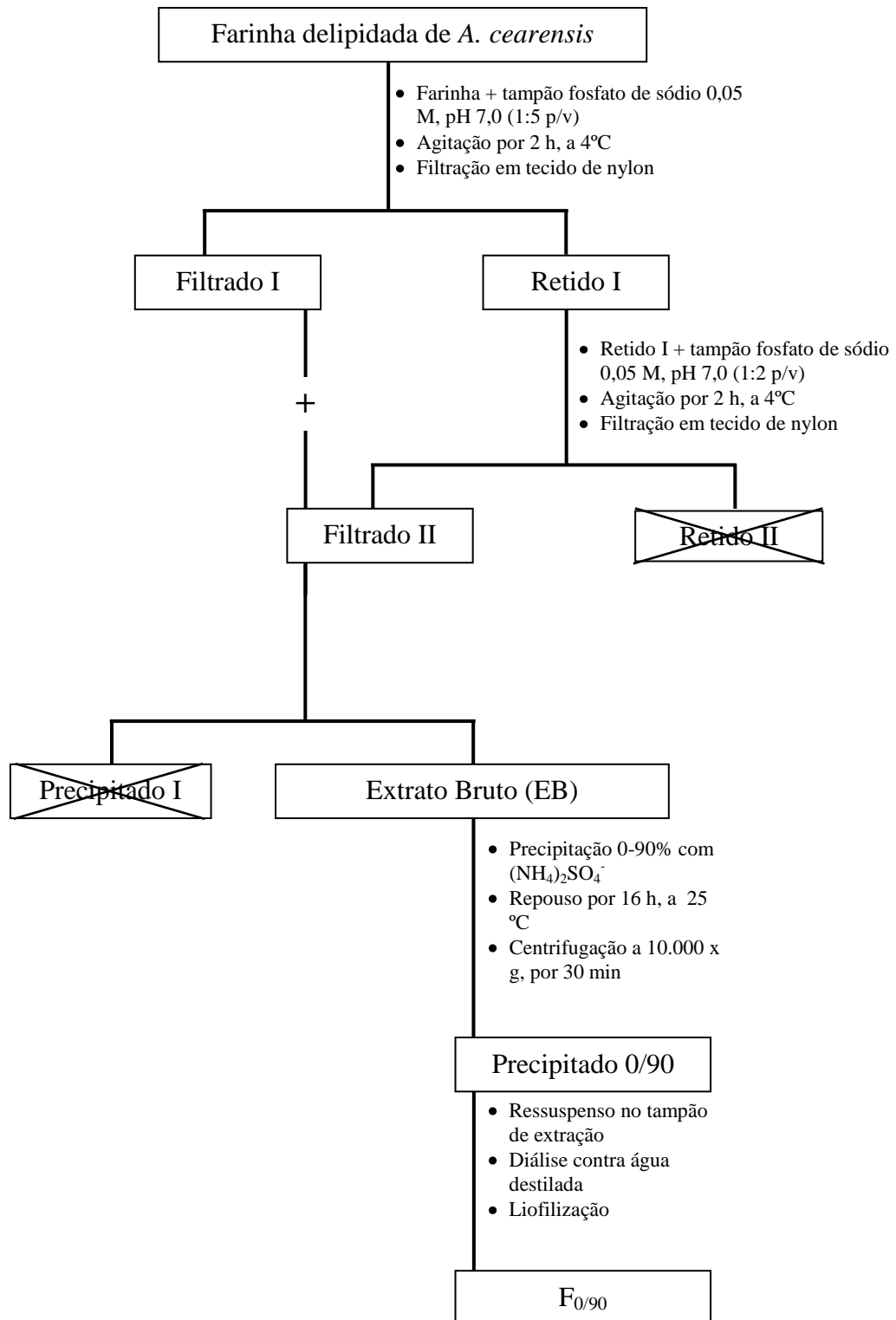


Figura 5. Esquema de obtenção do Extrato Bruto (EB) da farinha desidratada e delipidada de sementes de *Amburana cearensis* e obtenção sequencial da fração protéica 0-90% de saturação com sulfato de amônio.

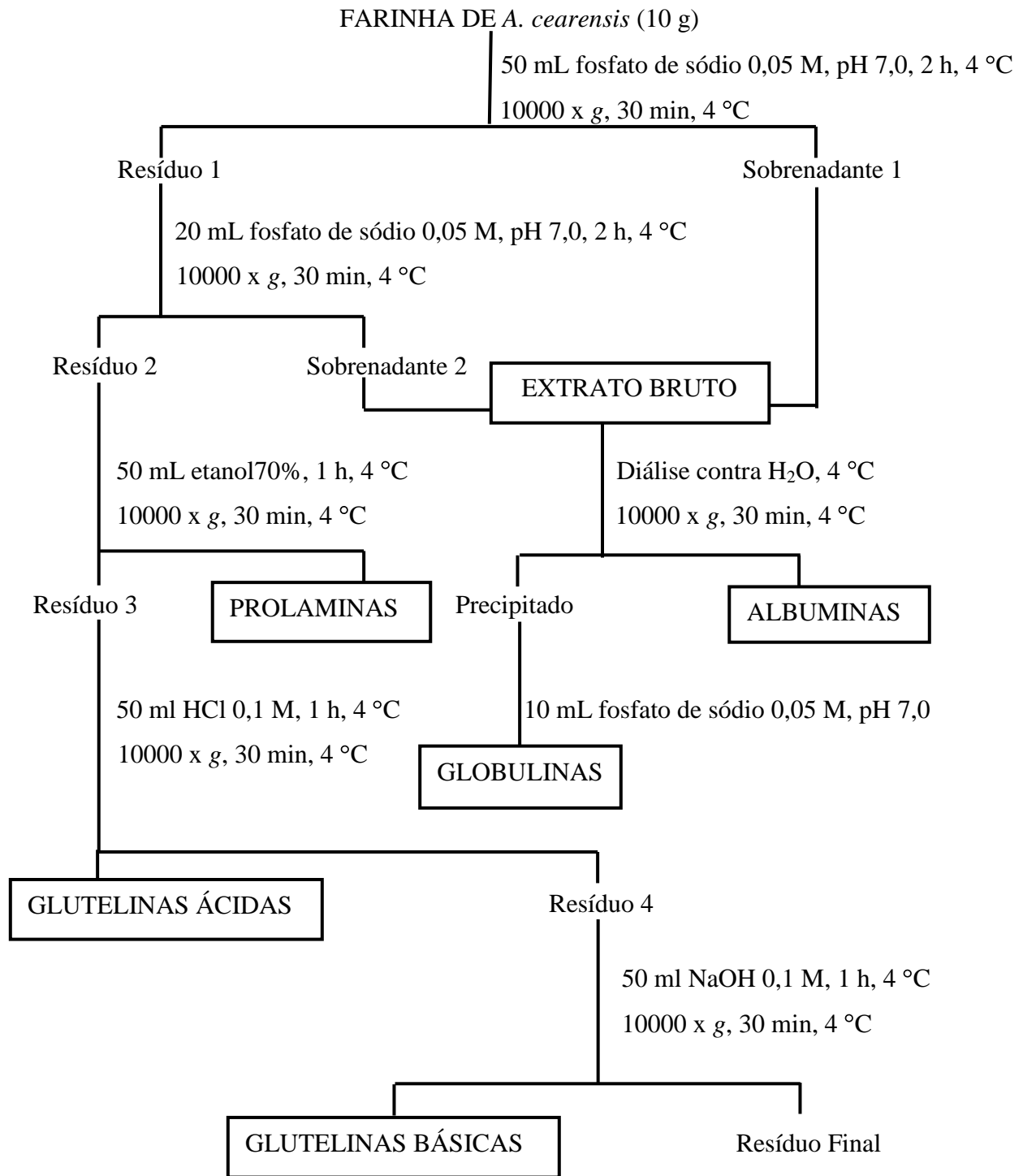


Figura 6. Esquema utilizado para separação das globulinas, albuminas e proteínas tipo prolaminas, glutelinas ácidas e glutelinas básicas de *Amburana cearensis*.

géis de aplicação e separação que encerravam 5% e 12,5% de acrilamida, respectivamente. A corrida foi conduzida a uma corrente constante de 20 mA por placa, durante 1,5 h. As bandas proteicas foram coradas com solução de “Coomassie Brilliant Blue” R-250 a 0,05%. A descoloração foi feita com solução de metanol, ácido acético gálcico e água (1: 3,5: 8, v/v/v). Como padrão de massa molecular foram usadas miosina (212 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), albumina do ovo (45,0 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa), inibidor de tripsina da soja (21,4/ 19,7 kDa) e lisozima (14,2 kDa) (AMRESCO Inc., Ohio, EEUU).

4.3.5. Composição em Aminoácidos

A composição em aminoácidos da farinha delipidada de sementes de *A. cearensis* foi realizada através de cromatografia de troca-iônica em HPLC (“High Performance Liquid Chromatography”), adaptada a partir do método descrito por Spackman *et al.* (1958). Em triplicata, 4 mg de farinha delipidada foi hidrolisada com 1 mL de HCl 6,0 M contendo 1% de fenol (p/v), por 22 h, a 110 °C, em ampolas de vidro fechadas, sob atmosfera de nitrogênio. Concluída a hidrólise, as ampolas foram abertas e o HCl/fenol removido por evaporação, em dessecador com pressão reduzida na presença de NaOH. A seguir, as amostras foram dissolvidas em tampão citrato de sódio pH 2,2, filtradas em membrana de 40 μ m (Millipore[®]) e submetidas a análise de aminoácidos.

O aminoácido aromático triptofano, sensível a hidrólise ácida, foi determinado pelo método descrito por Pintér-Szakács e Molnár-Perl (1990). Amostras contendo 12,5 mg de farinha foram colocadas em contato com 2,5 mL de reagente contendo ninhidrina a 1% dissolvida em HCl 37% + ácido fórmico 96% (2:3, v/v), por 2 h, a 35 °C. O branco foi realizado paralelamente em condições semelhantes, mas sem ninhidrina. A seguir, às amostras em solução foram adicionados 2,5 mL de uma mistura feita com as soluções HCl/ácido fórmico descritas e etanol absoluto (1:4, v/v). O teor de triptofano foi medido através de leitura espectrofotométrica a 380 nm, tendo como referência uma curva padrão feita com L-triptofano (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EEUU).

4.4. Detecção e/ou Dosagem de Fatores Tóxicos e/ou Antinutricionais

4.4.1. Lectinas

A presença de lectinas nas sementes de *A. cearensis* foi avaliada através de ensaios de atividade hemaglutinante do EB, seguindo a metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977), adaptada para o uso de tubos de ensaio. O EB foi diluído seriadamente com NaCl 0,9% (1:2; 1:4; 1:8; 1:16 etc) e cada diluição foi misturada (1:1) com uma suspensão a 2% de eritrócitos de camundongo, coelho e rato, nativos e tratados previamente com um “pool” de proteases de *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU). O tratamento com proteases foi feito através da mistura da solução de proteases (1 mg. mL⁻¹) com a suspensão de eritrócitos a 2%, na proporção 1:100 (v/v), por 1 h, a 4 °C. Em seguida, as proteases foram retiradas por centrifugações e lavagens com NaCl 0,9%. Portanto, os tubos contendo o EB e suas diluições foram incubados a 37 °C, durante 30 min, com o sangue nativo e tratado de cada espécie animal e, depois, por mais 30 min à temperatura ambiente. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 2000 x g, por 1 min, e a aglutinação visualizada a olho nu. Os resultados foram expressos como título de hemaglutinação, o qual foi definido como o recíproco da maior diluição que é capaz de provocar aglutinação visível, ou como quantidade mínima de proteína (µg /mL) capaz de induzir aglutinação visível. Essa concentração foi denotada como uma unidade de atividade hemaglutinante (UH).

4.4.2. Inibidores de Tripsina

A atividade inibitória de tripsina foi determinada de acordo com Kakade *et al.* (1969) com algumas modificações. A extração dos inibidores foi realizada agitando-se, durante 3 h, em temperatura ambiente, 20 mg da amostra de farinha delipidada de sementes de *A. cearensis* em 1 mL de NaOH 0,01 N. A suspensão foi então deixada em repouso por 30 min e, em seguida, uma alíquota de 0,5 mL desta suspensão foi adicionada a 0,5 mL de NaOH 0,01 N e centrifugada a 15.000 x g, por 5 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade dos inibidores de tripsina.

Para obtenção da curva padrão de inibidor de tripsina, volumes de 10, 15, 20, 25, 30 e 35 μL de SBTI – inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) dissolvido em NaOH 0,01 N, na concentração de 1 mg/mL, foram incubados com 100 μL tripsina de pâncreas bovino, dissolvido em HCl 0,001 N na concentração de 1 mg/mL, e 100 μL da solução de BAPNA – *N* α -Benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU), dissolvido em DMSO (dimetil-sulfóxido de sódio) e água destilada. O volume final de cada tubo foi ajustado para 1,6 ml com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,2, contendo CaCl_2 0,02 M. Após 5 min, os tubos foram incubados a 37 °C por 45 min. O procedimento do ensaio, realizado em triplicata, obedeceu à mesma seqüência de eventos da curva padrão, apenas substituindo o SBTI por 20 μL do sobrenadante da amostra. A reação foi interrompida pela adição de 200 μL de ácido acético 30 % (v/v) e a absorbância lida a 410 nm contra os brancos (aos quais a tripsina não foi adicionada). Os resultados foram expressos como UI (Unidades de Inibição), definida como a quantidade de tripsina (mg) inibida por grama de amostra.

4.4.3. Urease

A determinação da atividade ureásica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Kaplan (1969), com algumas modificações (VASCONCELOS *et al.*, 1997). Uma alíquota de 0,1 mL de uma solução de uréia 500 mM foi misturada com 0,7 mL de EDTA 2%, tamponando com uma solução de fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,5. Em seguida, 0,2 mL do EB da farinha delipidada de sementes de *A. cearensis* foi adicionado e a mistura foi incubada a 37 °C, por 15 min. Posteriormente, foram adicionados a mistura 1,0 mL da solução A (62 g de fenol + 0,25 g de nitroprussiato de sódio/L) e 1,0 mL da solução B (43 mL de hipoclorito de sódio + 20 g de hidróxido de sódio/L), sendo deixada a 37 °C, por 5 min. Após esse tempo, foram adicionados 7,0 mL de água deionizada aos tubos, sendo estes cobertos com filme de PVC e agitados vigorosamente. As leituras das absorbâncias foram feitas a 625 nm e a atividade enzimática foi avaliada em relação a uma curva padrão obtida com urease (EC 3.5.1.5, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EEUU).

4.4.4. Toxinas

A avaliação da toxicidade aguda do EB da farinha delipidada das sementes de *A. cearensis*, em diferentes concentrações, foi realizada através de injeção intraperitoneal (0,3 mL/10 g de peso corpóreo) em camundongos machos, seguindo metodologia descrita por Carvalho *et al.* (1987).

Após 48 h da inoculação do extrato, foram contados os indivíduos mortos, caso tenha ocorrido, para calcular medidas de dispersão como média, desvio padrão e coeficiente de variação. A DL_{50} foi calculada conforme descrita por Litchfield e Wilcoxon (1949). Foi utilizado como controle negativo o grupo de animais que recebeu apenas NaCl 0,9%.

4.4.5. Taninos

O teor de taninos da farinha das sementes de *A. cearensis* foi determinado de acordo com a metodologia de difusão radial (HAGERMAN, 1987). Inicialmente, foi preparada suspensão de agarose a 1 % (p/v) em tampão contendo ácido acético 50 mM, ácido ascórbico 60 mM, pH 5,0, e azida sódica 0,04 %. Essa suspensão foi aquecida a 100 °C e, logo em seguida, resfriada a 45 °C em banho-maria. Em seguida, foi adicionado 0,1 % de BSA (p/v). A solução foi distribuída em alíquotas de 50 mL em placas de Petri (15 cm de diâmetro) e resfriadas para solidificação da agarose. A extração de taninos da farinha foi realizada utilizando-se 1 g de farinha em contato com 2,5 mL de uma solução de HCl 1% em metanol (1:97, v/v), em agitação por 4 h e, depois, centrifugação a 14.000 x g, por 10 min. Em seguida, os extratos (32 µL) foram aplicados em poços no gel, sendo a placa incubada a 4 °C, por 96 h. O teor de taninos foi estimado através de comparação com uma curva padrão constituída por diferentes concentrações de ácido tânico.

4.4.6. Metabólitos Secundários

Para determinação qualitativa de metabólitos secundários, especialmente aqueles de importância como antinutrientes, foram utilizados os protocolos descritos por Matos (1999). Inicialmente, foi realizada uma extração alcóolica da farinha integral de sementes de *A. cearensis*

na proporção de 1:3 (p/v), por 72 h, com duas trocas consecutivas do álcool etílico 95 %. Entre as trocas, os sobrenadantes foram armazenados em frascos âmbar e, posteriormente, concentrados por rotaevaporação. O concentrado obtido foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo descongelados e ressuspensos em volume mínimo de álcool para a realização das análises. Os metabólitos secundários analisados foram: taninos; fenóis; alcalóides; saponinas; antocianinas e antocianidinas; flavonas, flavonóis e xantonas; chalconas e auronas; flavonóides; leucoantocianidinas; triterpenóides; catequinas; esteróides e flavononas.

4.5. Obtenção da Fração Proteica 0-90 ($F_{0/90}$) do EB de Sementes de *A. cearensis*

O EB da farinha delipidada de sementes de *A. cearensis* foi tratado com sulfato de amônio (Merck, Darmstadt, Alemanha) até 90% de saturação e deixado em repouso por 16 h à temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi centrifugado a $10.000 \times g$, por 30 min. O sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado foi submetido à diálise em membrana com porosidade de 6 – 8 kDa (Fisherbrand, Pittsburgh, EEUU), contra água destilada num volume 10 vezes maior do que aquele do extrato, em um total de dez trocas de água. O material dialisado foi transferido para balões de liofilização e congelado em N líquido para posterior liofilização. Em seguida, a fração proteica 0-90% de saturação de sulfato de amônio, denominada $F_{0/90}$, foi triturada em moinho para café e peneirada em malha de $1,0\text{ mm}^2$ para homogeneizar o material. O esquema de obtenção da $F_{0/90}$ pode ser observado na Figura 5, mostrada anteriormente.

4.5.1. Atividade Inibitória de Tripsina da $F_{0/90}$ e Tratamento Térmico

A presença de atividade inibitória de tripsina na $F_{0/90}$ foi avaliada como descrito anteriormente no item 4.4.2.

A fim de diminuir a atividade inibitória de tripsina da $F_{0/90}$, as amostras foram tratadas termicamente com calor úmido de acordo com o método descrito por (Egounlety e Aworh, 2003), com algumas modificações. Em duplicata e para cada tempo de exposição à fervura, 50 mg da $F_{0/90}$ foram misturados a 50 mL de água destilada e submetidos à fervura em chapa aquecedora (Biomixer, Modelo DB-IVAC Hot Plate, São Paulo, Brasil) durante 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. Em seguida, as amostras tratadas termicamente foram filtradas em papel de filtro e o

material retido secado à temperatura ambiente. A persistência da atividade inibitória de tripsina na F_{0/90} tratada termicamente foi avaliada como descrito anteriormente no item 4.4.2.

4.5.2. Perfil Eletroforético da F_{0/90} e da F_{0/90} Tratada Termicamente em Gel de Tricina em Condições Desnaturantes

O perfil eletroforético das proteínas, especialmente do inibidor de tripsina, 13,6 kDa (TANAKA *et al.*, 1989), da F_{0/90} e da F_{0/90} tratada termicamente foi observado por eletroforese em gel de Tricina-SDS segundo a técnica descrita por Schägger e Von Jagow (1987). A eletroforese foi realizada em gel vertical de 2 mm de espessura, composto por um gel de aplicação, um gel espaçador e por um gel de separação, encerrando 4, 10 e 16,5% de acrilamida, respectivamente, todos preparados em tampão tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo 0,3% de SDS. As amostras liofilizadas da F_{0/90} e da F_{0/90} tratada termicamente foram ressuspensas em tampão tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1% e β-mercaptoetanol 1% de forma que encerrassem concentrações semelhantes de proteínas (ca. 2,5 mg/mL). Em seguida, as amostras foram incubadas a 100 °C, por 10 min e centrifugadas a 14.000 x g, por 10 min. Aos sobrenadantes foram adicionados cristais de sacarose e azul de bromofenol. Alíquotas (20 µL) das amostras tratadas foram aplicadas no gel que, por sua vez, foi submetido a uma corrente de 20 mA. A coloração das bandas proteicas foi feita com “Coomassie Brilliant Blue” R-250 a 0,05 %, preparado em solução de metanol, ácido acético e água (1: 3,5: 8, v/v/v) por um período de 2 h. A descoloração do gel foi feita com solução de metanol, ácido acético e água (1: 3,5: 8, v/v/v). Como padrões de massa molecular foram usadas miosina (212 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), albumina do ovo (45,0 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa), inibidor de proteína da soja (21,4/ 19,7 kDa) e lisozima (14,2 kDa) como padrões (AMRESCO Inc., Ohio, EEUU).

4.6. Experimento de Alimentação I

4.6.1. Avaliação da Farinha de Sementes de *A. cearensis* como Fonte de Proteínas

4.6.1.1. Dietas Experimentais

Para o experimento de avaliação da farinha de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas foram preparadas quatro dietas distintas: uma dieta tendo as proteínas da clara do ovo (Egg Whites, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EEUU) como padrão de proteína de alta qualidade (Dieta Padrão); uma dieta isenta de proteínas (Dieta Aprotéica) como controle experimental não-proteico; uma dieta contendo farinha desidratada de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas (Dieta AC); e uma dieta contendo farinha desidratada processada de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas (Dieta ACP). A farinha desidratada processada de sementes de *A. cearensis* utilizada foi obtida a partir da imersão de 600 g de sementes de *A. cearensis* em 3,6 L de água destilada e deixadas, em repouso, por 16 h. Em seguida, as sementes foram retiradas da água e imersas em 3,0 L de água destilada, sendo submetidas à fervura por 90 min. Tanto a água do molho como as sementes com sua água de cocção foram concentradas em estufa a 42 °C, por 72 h. O concentrado obtido da água do molho das sementes foi analisado quanto à presença de antinutrientes como descrito no item 4.4.6. As sementes processadas foram moídas em moinho para grãos de café e peneiradas em malha de 1,0 mm². A farinha de sementes processadas foi analisada quanto ao teor de proteínas totais e de fibra alimentar de acordo com os itens 4.2.2 e 4.2.7, respectivamente.

Todas as dietas formuladas foram isocalóricas e isoproteicas, exceto para a Dieta Aprotéica, de modo a conter 100 g de proteína por Kg de dieta (100 g.Kg⁻¹), ou seja, 10 % de proteína, variando apenas a fonte proteica utilizada (Tabela 1). Além disso, as Dietas AC e ACP foram suplementadas com L-metionina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EEUU) na proporção de 5,2 g por Kg de dieta de acordo com os requerimentos estimados para ratos em crescimento (COATES *et al.*, 1969).

Tabela 1. Composição (g. Kg⁻¹) e densidade calórica (Kcal. g⁻¹) das dietas controle (Dieta padrão – DP e Dieta Aprotéica - DAp) e experimentais (Farinha crua de sementes de *Amburana cearensis* – DAC e Farinha processada termicamente de sementes de *A. cearensis* – DACP, ambas suplementadas com L-metionina)

INGREDIENTES	DIETAS			
	Padrão	Aprotéica	Farinha de <i>A. cearensis</i> crua	Farinha de <i>A. cearensis</i> processada [#]
Clara do ovo	114,95	-	-	-
<i>A. cearensis</i> crua	-	-	429,94	-
<i>A. cearensis</i> processada	-	-	-	415,85
Amido de milho	336,17	451,12	279,89	301,16
Glucose	147,51	147,51	146,33	146,53
Celulose	155,52	155,52	-	-
Óleo de milho	147,51	147,51	41,21	33,70
Mistura de vitaminas*	49,17	49,17	48,77	48,84
Mistura de minerais**	49,17	49,17	48,77	48,84
L-metionina	-	-	5,2	5,2
Densidade calórica	3,72	3,72	3,65	3,63

[#] As sementes de *Amburana cearensis* foram colocadas demolho em água de torneira, na proporção de 1:6 (p/v), por 12 h, sendo, posteriormente, levadas à fervura por 90 min e, finalmente, secas em estufa a 45 °C e moídas;

*Mistura de vitaminas (g. kg⁻¹): vitamina B₁₂ (100%) 0,5; ácido fólico 0,1; biotina (99%) 0,1; piridoxina HCl 0,2; tiamina HCl 0,2; riboflavina (99%) 0,2; pantotenato de cálcio (97,5%) 0,4; ácido nicotínico 0,6; inositol 8,0; *p*-amino-benzóico 0,2; cloreto de colina (50%) 16,0; vitamina A 0,24; vitamina D 0,25; vitamina E 1,2; vitamina K 0,02 e amido de milho 971,79;

** Mistura de minerais (g. kg⁻¹): Citrato de cálcio 296,1; fosfato de cálcio monobásico 108,2; fosfato de potássio dibásico 210,1; cloreto de sódio 74,0; cloreto de potássio 119,5; carbonato de cálcio (40 %) 65,8; carbonato de magnésio 34,3; carbonato de cobre 1,1; carbonato de zinco 0,48; fluoreto de sódio 0,48 e iodeto de potássio 0,1.

4.6.1.2. Procedimento Experimental

A avaliação da qualidade nutricional da farinha integral crua e processada de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas foi realizada de acordo com a técnica descrita por Miller e Bender (1955). Ratos machos da linhagem Wistar foram adquiridos do Biotério Central logo após o desmame (21 dias de idade) e com peso médio de $55,16 \pm 5,96$ g, sendo alimentados com dieta comercial peletizada (Biobase, Campinas, Brasil). Grupos homogêneos de animais foram selecionados para serem submetidos a um período de adaptação de 3 dias às gaiolas metabólicas de acrílico (Tecniplast, Buguggiate, Itália) e à dieta comercial pulverizada até atingirem um peso médio de $70,19 \pm 3,18$ g. Após o período de adaptação, grupos homogêneos de animais (6 animais/grupo) foram utilizados, sendo os animais distribuídos individualmente em gaiolas metabólicas (Figura 7), possibilitando a coleta separada de fezes, urina e água desperdiçadas. Para cada grupo de animais foram administrados as dietas experimentais, contendo farinha de sementes de *A. cearensis* crua e processada, e as dietas controles, uma à base de clara do ovo e a outra isenta de proteínas.

Para cada tratamento foram ofertados diariamente 15 g de dieta e água *ad libitum* durante 10 dias. A dieta consumida e o peso de cada rato foram mensurados diariamente. A partir do 5º dia de experimento, as fezes passaram a ser coletadas e congeladas. No último dia de experimento (10º dia), os animais foram deixados em jejum por 2 h e, passado esse tempo, foram levemente anestesiados com éter etílico e tiveram seu sangue retirado por punção do plexo retro-orbital, sendo coletados em tubos limpos e livres de anticoagulantes. O sangue foi centrifugado a $2000 \times g$, por 10 min, e soro foi coletado e armazenado a -20 °C para posterior determinação de parâmetros sorológicos. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para retirada e mensuração de seus órgãos internos [timo, coração, pulmões, baço, estômago, pâncreas, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso, rins e fígado]. A carcaça de cada animal foi pesada. Os órgãos foram congelados, liofilizados e pesados novamente. As carcaças foram colocadas em estufa a 100 °C, por 72 h, pesadas novamente e, finalmente, moídas para determinação do nitrogênio total (Baethgen e Alley, 1989). As fezes foram pesadas e, finalmente, moídas para a determinação do nitrogênio total pela mesma técnica descrita.

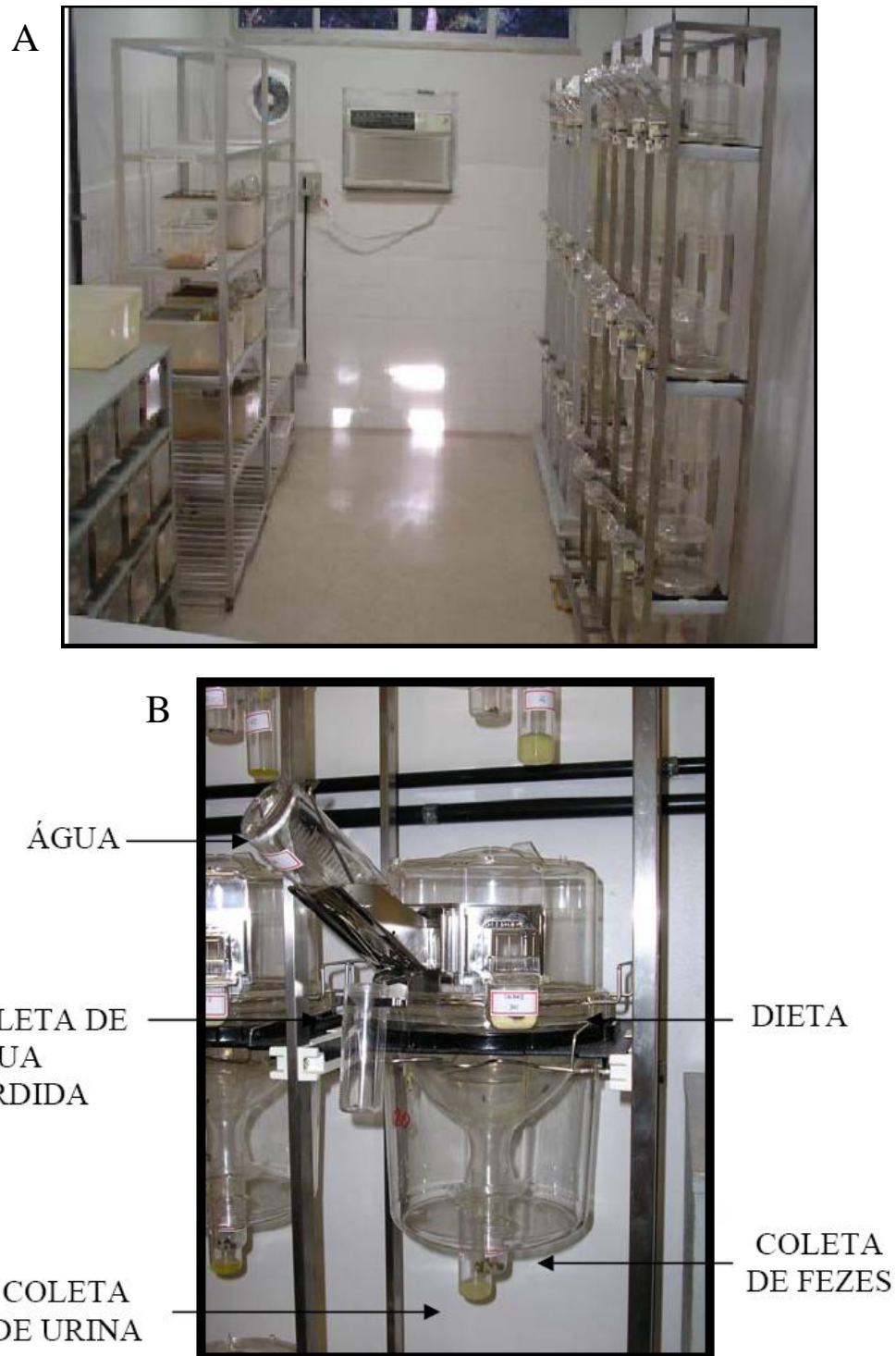


Figura 7. A. Imagem do Biotério experimental do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec), Departamento de Biologia da UFC, mostrando à direita as estantes com as gaiolas metabólicas utilizadas nos experimentos de alimentação. B. Gaiola metabólica utilizada nos experimentos de alimentação com coleta separada de fezes, urina, água e de dieta desperdiçadas.

4.6.1.3 Parâmetros Bioquímicos Sanguíneos

Os parâmetros bioquímicos analisados no soro coletado dos animais foram: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, uréia, proteína total, albumina e creatinina. As análises foram realizadas utilizando kits fotolorimétricos para diagnóstico clínico, seguindo as instruções do fabricante (Bioclin, Santa Branca, Brasil).

4.6.1.4. Peso Relativo dos Órgãos – Base Úmida e Base Seca

Foi calculada a relação ‘peso do órgão / peso da carcaça’ para cada órgão de cada animal, tanto em base úmida quanto em base seca. Em seguida, as médias de cada órgão para cada grupo foram comparadas e avaliadas quanto a possíveis diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos.

4.6.1.5. Índices para Avaliação da Qualidade Proteica

Os índices para avaliação da qualidade proteica foram a Razão Líquida de Proteínas (NPR), Utilização Líquida de Proteína (NPU), Digestibilidade (D) e Valor Biológico (VB). As equações utilizadas encontram-se a seguir:

$$\text{NPR} = \frac{\text{ganho de peso teste} + \text{ganho de peso aprotéico}}{\text{proteína ingerida teste}}$$

$$\text{NPU} = \frac{\text{N carcaça teste} - \text{N carcaça aprotéico}}{\text{N ingerido teste}} \times 100$$

$$\text{Dv} = \frac{\text{N ingerido} - (\text{N fecal} - \text{N fecal endógeno})}{\text{N ingerido}} \times 100$$

$$VB = \frac{NPU}{Dv}$$

Para o cálculo da digestibilidade verdadeira, foram utilizados os valores obtidos durante os últimos cinco dias de experimento. Para os cálculos dos parâmetros nutricionais NPU e NPR foram usados os valores dos dez dias de experimento.

4.7. Experimento de Alimentação II

4.7.1. Avaliação da F_{0/90} Obtida do EB de Sementes de *A. cearensis* como Fonte de Proteínas

Para o experimento de Avaliação da F_{0/90} obtida do EB de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas foram preparadas quatro dietas distintas: uma dieta contendo as proteínas da clara do ovo como padrão de proteína de alta qualidade (Dieta Padrão); uma dieta isenta de proteínas (Dieta Aprotéica) como controle experimental não-proteico; uma dieta contendo a F_{0/90} como fonte de proteínas (Dieta FP); e uma dieta contendo a F_{0/90} processada termicamente como fonte de proteínas (Dieta FPP). A F_{0/90} processada termicamente foi obtida a partir da mistura de 90 g de fração com 1,0 L de água destilada, sendo submetidas à fervura em chapa aquecedora por 180 min. Em seguida, todo o material fervido (fração + água) foi concentrado em estufa a 45 °C, por 24 h, e, logo em seguida, moído em moinho elétrico para garantir a homogeneidade da fração.

Todas as dietas formuladas foram isocalóricas e isoproteicas, exceto para a Dieta Aprotéica, de modo a conter 100 g de proteína por Kg de dieta (100 g.Kg⁻¹), ou seja, 10% de proteína, variando apenas a fonte proteica utilizada (Tabela 2). Além disso, as Dietas FP e FPP foram suplementadas com L-metionina e L-triptofano (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EEUU) na proporção de 5,2 e 0,69 g por Kg de dieta, respectivamente, de acordo com os requerimentos estimados para ratos em crescimento (Coates *et al.*, 1969).

Para o preparo de todas as dietas foi adicionado o correspondente a 5 % da massa total de cada dieta uma mistura de vitaminas e de minerais manufaturadas de acordo como mostrado na Tabela 1.

Tabela 2. Composição (g. Kg⁻¹) e densidade calórica (Kcal. g⁻¹) das dietas controle (Dieta padrão – DP e Dieta Aprroteica - DAp) e experimentais (Fração proteica F_{0/90} do extrato bruto de sementes de *Amburana cearensis* – DFP e Fração proteica F_{0/90} processada termicamente de sementes de *Amburana cearensis* – DFPP, ambas suplementadas com L-metionina e L-triptofano)

INGREDIENTES	DIETAS			
	Padrão	Aproteica	Fração Proteica	Fração Proteica Processada
Clara do ovo	114,95	-	-	-
F _{0/90} de <i>A. cearensis</i>	-	-	106,57	-
F _{0/90} processada de <i>A. cearensis</i>	-	-	-	106,57
Amido de milho	336,17	451,12	341,76	341,76
Glucose	147,51	147,51	148,91	148,91
Celulose	155,52	155,52	148,91	148,91
Óleo de milho	147,51	147,51	148,91	148,91
Mistura de vitaminas*	49,17	49,17	49,64	49,64
Mistura de minerais**	49,17	49,17	49,64	49,64
L-metionina	-	-	5,2	5,2
L-triptofano	-	-	0,69	0,69
Densidade calórica	3,72	3,72	3,75	3,75

A fração protéica foi submetida à fervura por 180 min e, posteriormente, seca em estufa a 45 °C, por 24 h;

*Mistura de vitaminas (g. kg⁻¹): vitamina B₁₂ (100%) 0,02; ácido fólico 0,04; biotina (99%) 4,0; piridoxina HCl 0,04; tiamina HCl 0,06; riboflavina (99%) 0,2; pantotenato de cálcio (45%) 1,2; ácido nicotínico 4,0; inositol 4,0; *p*-amino-benzóico 12,0; cloreto de colina (50%) 24,0; e amido de milho 950,43.

** Mistura de minerais (g. kg⁻¹): Citrato de cálcio 296,1; fosfato de cálcio monobásico 108,2; fosfato de potássio dibásico 210,1; cloreto de sódio 74,0; cloreto de potássio 119,5; carbonato de cálcio (40 %) 65,8; carbonato de magnésio 34,3; carbonato de cobre 1,1; carbonato de zinco 0,48; fluoreto de sódio 0,48 e iodeto de potássio 0,1.

O procedimento experimental adotado no experimento de alimentação II foi essencialmente similar ao procedimento empregado no I, exceto para o peso-médio dos animais no início do período experimental que foi de $68,18 \pm 0,48$ g e para as quantidades de dietas experimentais e controles ofertadas, diariamente, que foram de 12 g/animal.

As determinações dos parâmetros bioquímicos sanguíneos, do peso relativo dos órgãos e dos índices para avaliação da qualidade proteica da F_{0/90} como fonte de proteínas foram realizados como descrito anteriormente para o experimento de alimentação I.

PARTE II. BIOATIVIDADE DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE *A. cearensis* CONTRA PATÓGENOS E VETORES DE DOENÇAS

4.8. Obtenção de Globulinas e Albuminas de Sementes de *A. cearensis*

O esquema de obtenção das frações Globulina e Albumina derivadas do EB de sementes de *A. cearensis* está mostrado na Figura 8. As condições de extração mostradas geram uma fração Albumina com teor de proteínas solúveis por volta de 10 mg.mL^{-1} , uma concentração adequada para a realização dos ensaios de bioatividade. Posto isto, a fração Globulina foi ressuspensa na proporção de 1:90 (p/v), em tampão de extração, de forma que apresentasse um teor de proteínas solúveis semelhante àquele das Albuminas. O EB foi avaliado em sua concentração ($27,34 \pm 0,97$ mg de proteínas. mL^{-1}) pós-extração. O EB e as frações Globulina e Albumina foram avaliados quanto à presença de atividade inibitória do crescimento de bactérias e leveduras, inibitória da germinação de esporos e do crescimento de fungos fitopatogênicos e, ainda, atividade inibitória da eclosão de ovos, larvicida e pupicida contra *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*.

4.8.1. Atividade Inibitória do Crescimento Bacteriano em Meio Líquido

O ensaio de atividade inibitória do crescimento bacteriano em meio líquido do EB e das frações Globulina e Albumina, ambas com concentração proteica de aproximadamente 10 mg.mL^{-1} , foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Hissa *et al.* (2008). Foram utilizadas

as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e as Gram-negativas *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. Inicialmente, as bactérias foram repicadas da bacterioteca para placas estéreis de agar nutritivo e incubadas a 37 °C, por 24 h, sendo, então, utilizadas no experimento. O ensaio foi realizado em meio líquido da seguinte forma: placas de microtitulação de poliestireno (estéreis), contendo 96 poços, foram postas em câmara de fluxo laminar e a cada poço adicionados 100 µL de caldo nutritivo contendo células bacterianas numa concentração de 10^7 UFC. mL⁻¹ (absorbância entre 0,1 e 0,2, a 600 nm), seguidos de 100 µL de cada amostra estéril (esterilização em filtro Millipore® de 0,22 µm de poro), EB, globulinas, albuminas e os controles BSA (10 mg. mL⁻¹), tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH7,0 (controle negativo), NaCl 0,9% (controle negativo) e formol 0,4% (controle positivo). Para as amostras que apresentaram atividade foram feitas as diluições 1:2 e 1:4 (v/v), em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH7,0 ou NaCl 0,9 %. Em seguida, as placas de microtitulação foram submetidas a uma leitura inicial de absorbância a 600 nm em uma leitora de microplacas (Thermo Plate TP – Reader, São Paulo, Brasil), seguidas de novas leituras a cada 4 h, até um total de 24 h. Entre os intervalos de tempo, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C. Após decorrido o tempo de 24 h, foram retirados inóculos dos poços (20 µL) correspondentes a cada amostra e repicados para placas de agar-nutritivo e deixadas por mais 24 h, a 37 °C, para verificar se a inibição do crescimento foi devido a uma ação bactericida ou bacteriostática.

4.8.2. Atividade Inibitória do Crescimento de Leveduras em Meio Líquido

O ensaio de inibição do crescimento das leveduras *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *Pichia anomala* pelo EB e frações Globulina e Albumina, ambas com concentração proteica de aproximadamente 10 mg. mL⁻¹, foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (2007), com algumas modificações. Inicialmente, as leveduras foram repicadas para placas estéreis de agar saboraud e incubadas a 37 °C, por 24 - 48 h, sendo, então, utilizadas no experimento. Nas placas de microtitulação de poliestireno (estéreis), contendo 96 poços, foram adicionados, em cada poço, 100 µL de caldo BHI (Brain and Heart Infusion, Difco Co., EEUU), com ajustado para 5,0, contendo uma concentração de células leveduriformes correspondente a uma leitura de absorbância de 0,05, comprimento de onda de 600 nm, seguidos

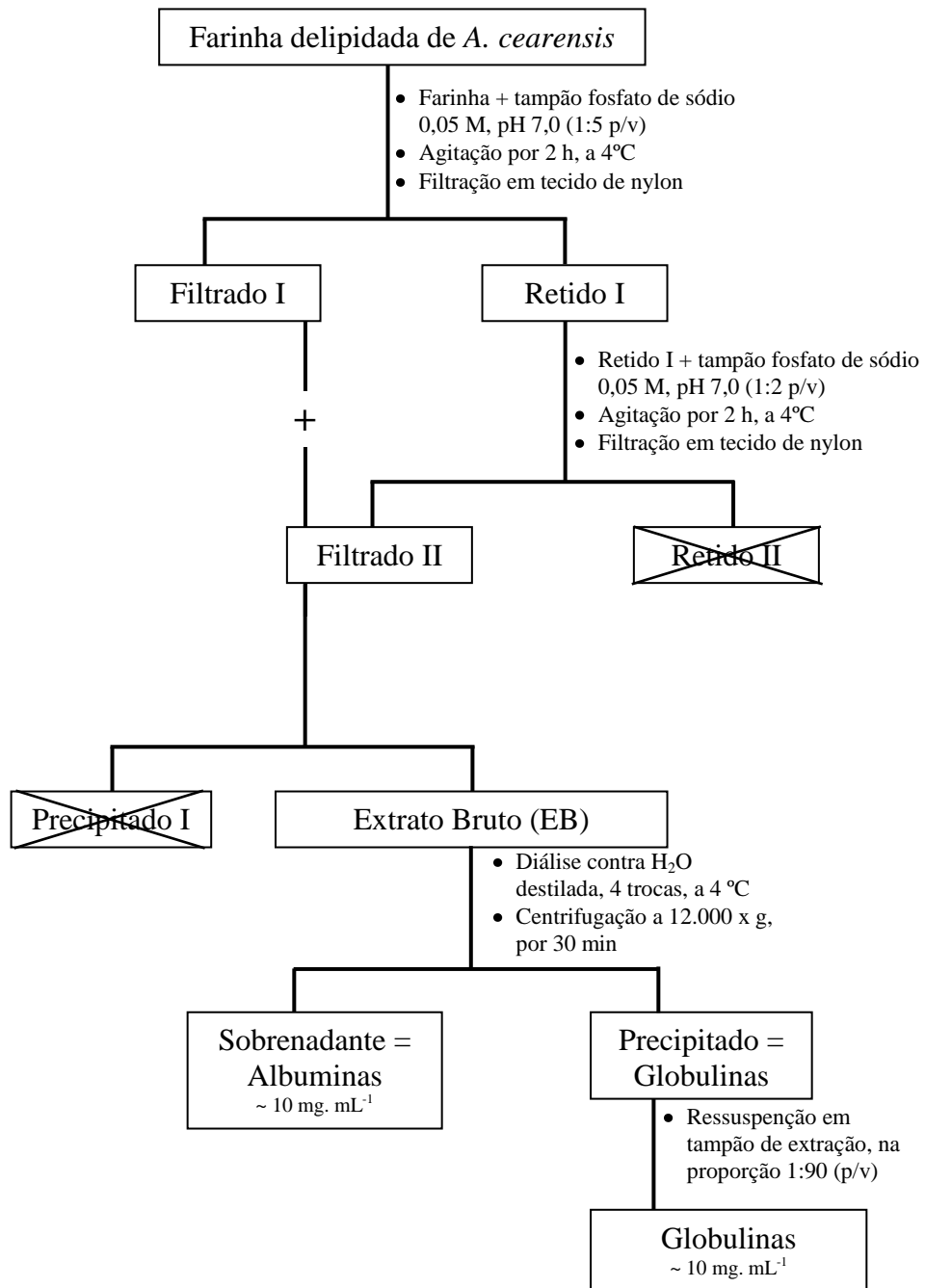


Figura 8. Esquema de obtenção do Extrato Bruto (EB) e das frações Globulina e Albumina da farinha desidratada e delipidada de sementes de *Amburana cereaensis*.

seguidos de 100 μL de cada amostra estéril (esterilização em filtro Millipore® de 0,22 μm de poro), EB, albuminas, globulinas e os controles BSA (10 mg. mL^{-1}), tampão fosfato de sódio 50 mM, pH7,0 (controle negativo), NaCl 0,9 % (controle negativo) e formol 0,4 % (controle positivo). Para as amostras que apresentaram atividade foram feitas as diluições 1:2 e 1:4 (v/v), em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, ou em NaCl 0,9%. Em seguida, as placas de microtitulação foram submetidas a uma leitura inicial de absorbância a 600 nm em uma leitora de microplacas, seguidas de novas leituras a cada 6 h, até um total de 48 h. Entre os intervalos de tempo, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C. Após decorrido o tempo de 48 h, foram retirados inóculos dos poços (μL) correspondentes a cada amostra e repicados para placas de agar saboraud e deixadas por mais 48 h a 37 °C para verificar se a inibição do crescimento foi devido a uma ação fungicida ou fungistática.

4.8.3. Atividade Inibitória da Germinação dos Esporos de Fungos Filamentosos – “Ensaio da Gota”

O ensaio de inibição da germinação dos esporos de fungos filamentosos fitopatogênicos pelo EB e frações Globulina e Albumina, ambas com concentração proteica de aproximadamente 10 mg. mL^{-1} , foi realizado de acordo com o método descrito por Ji e Kúc (1996), com algumas modificações. Para o ensaio foram utilizados esporos dos seguintes fungos fitopatogênicos: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Penicillium herguei* e *Rhizoctonia solani*. Inicialmente, "pellets" com micélio fúngico foram retirados da micoteca e repicados em placas estéreis de agar batata, em condições de esterilidade. Após os fungos terem tomado todo o diâmetro da placa de Petri, cerca de 15 dias após o repique, essas foram abertas em capela de fluxo laminar e adicionadas de 10 mL de água estéril ou uma solução estéril de NaCl-Glucose 0,15 M para os fungos *A. niger* e *P. herguei*. Com a utilização de uma alça de Drigalski, manuseada suavemente sobre a superfície do micélio, foi produzida uma suspensão de esporos. Esta foi imediatamente filtrada em malha de nylon, para a remoção de resquícios de hifas, e denominada de solução padrão de esporos. Da solução padrão, foi promovido o ajuste das concentrações para $2,0 \times 10^5$ esporos. mL^{-1} , usados no ensaio. Uma alíquota de 10 μL da suspensão de esporos ($2,0 \times 10^5$ esporos. mL^{-1}) foi incubada com 10 μL de cada amostra estéril

(esterilização em filtro Millipore® de 0,22 µm de poro), EB, albuminas, globulinas e os controles BSA (10 mg. mL⁻¹), tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 (controle negativo), NaCl 0,9% (controle negativo) e peróxido de hidrogênio 0,1 M (controle positivo). As placas de germinação foram mantidas a 37 °C, por 12 h, na ausência de luz, conservando a umidade do local por meio de um papel de filtro embebido de água. Decorrido o tempo de germinação, o material foi visualizado em microscópio óptico ("Olimpus System Microscope BX 60"). Foram considerados germinados os esporos que apresentaram tubo germinativo de, ao menos, duas vezes o seu comprimento.

4.8.4. Atividade Inibitória do Crescimento de Fungos Filamentosos em Meio Líquido

O ensaio de inibição do crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos pelo EB e das frações Globulina e Albumina, ambas com concentração proteica de aproximadamente 10 mg. mL⁻¹, em meio líquido foi realizado seguindo a metodologia descrita por Freire *et al.* (2002), com algumas modificações. Para o ensaio foram utilizados os seguintes fungos fitopatogênicos: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Penicillium herguei* e *Rhizoctonia solani*. Inicialmente, os fungos filamentosos foram repicados da micoteca para placas estéreis de agar batata e incubadas a 37 °C, por uma semana, sendo, então, utilizados no experimento. Placas de microtitulação de poliestireno (estéreis), contendo 96 poços, foram postas em câmara de fluxo laminar e a cada poço adicionados 100 µL de meio YPD ("Yeast Peptone Dextrose", Difco Co., EEUU) estéril, seguidos de 10 µL da suspensão de esporos (2 x 10⁵ esporos. mL⁻¹) e 100 µL de cada amostra estéril (esterilização em filtro Millipore® de 0,22 µm de poro), EB, albuminas, globulinas e os controles BSA (10 mg. mL⁻¹), tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 (controle negativo), NaCl 0,9% (controle negativo) e peróxido de hidrogênio 0,1 M (controle positivo). Em seguida, as placas de microtitulação foram submetidas a uma leitura inicial de absorbância a 600 nm em leitor de microplacas, seguidas de novas leituras a cada 12 h, até um total de 72 h. Entre os intervalos de tempo, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C.

4.8.5. Atividade Inibitória do Crescimento de Fungos Filamentosos em Meio Sólido

O ensaio de inibição do crescimento de fungos filamentosos fitopatogênicos pelo EB e das frações Globulina e Albumina, ambas com concentração proteica de aproximadamente 10 mg. mL⁻¹), em meio sólido foi realizado seguindo a metodologia descrita por Roberts e Selitrennikoff (1990), com algumas modificações. Foram utilizados os seguinte fungos filamentosos: *Aspergillus niger*, *A. Fumigatus*, *Colletotrichum gloesporioides*, *C. musae*, *C. truncatum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. virguliformes*, *Lasioidiplodia theobromae*, *Mucor* sp., *Neurospora* sp., *Pithium oligandrum*, *Phomopsis* sp. e *Rhizoctonia solani*. As culturas de fungos foram inoculadas como “pellets” de 8 mm no centro de placas de ágar batata. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 48 h ou mais, dependendo da velocidade de crescimento de cada fungo. Discos de papel de filtro com 3 cm de diâmetro foram colcados aproximadamente 5 mm da borda da placa de Petri. Foram injetados nos discos 300 µL de cada amostra estéril (esterilização em filtro Millipore® de 0,22 µm de poro), EB, albuminas, globulinas e os controles BSA (10 mg. mL⁻¹), tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH7,0 (controle negativo), NaCl 0,9% (controle negativo) e nistatina 100.000 UI.mL⁻¹ (EMS, Hortolândia, São Paulo) (controle positivo). As placas foram novamente incubadas à temperatura ambiente até o crescimento restante dos fungos em presença das amostras. A formação de halos ao redor dos poços indicou inibição do crescimento fúngico.

4.8.6. Atividade Inibitória da Eclosão dos Ovos de *Aedes aegypti* e *Ae. Albopictus*

O ensaio de atividade inibitória da eclosão dos ovos de *Aedes aegypti* e *Ae. Albopictus* pelo EB e frações Globulina e Albumina, ambas com concentração proteica de aproximadamente 10 mg. mL⁻¹), foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ramos *et al.* (2006), com algumas modificações. Em triplicata para cada espécie e para cada amostra, tiras de papel contendo 100 ovos, contados em um estereomicroscópio (Tecnival), foram mergulhadas em 25 mL de cada amostra, EB, albuminas, globulinas e os controles BSA (10 mg. mL⁻¹), tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 (controle negativo), NaCl 0,9% (controle negativo), todas contendo 1% de álcool etílico absoluto. Após, 72 h, à temperatura ambiente, foram contadas o

número de larvas vivas ou mortas em cada amostra e, a partir disso, foram calculados o número de ovos não-eclodidos e, por fim, o percentual de inibição da eclosão dos ovos.

4.8.7. Atividade Larvicida contra *Aedes aegypti* e *Ae. Albopictus*

O ensaio de avaliação da atividade larvicida contra *Aedes aegypti* e *Ae. Albopictus* pelo EB e das frações Globulina e Albumina, ambas com concentração proteica de aproximadamente 10 mg. mL⁻¹, foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ramos *et al.* (2006), com algumas modificações. Em triplicata para cada espécie e para cada amostra, 20 larvas em 3º estágio foram mergulhadas, com o auxílio de um pincel, em 25 mL de cada amostra, EB, albuminas, globulinas e os controles BSA (10 mg. mL⁻¹), tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH7,0 (controle negativo), NaCl 0,9% (controle negativo), todas contendo 1% de álcool etílico absoluto. Após, 72 h, à temperatura ambiente, foram contados o número de larvas mortas em cada amostra. Para as amostras que causaram 100 % de mortalidade das larvas e/ou pupas foram feitas diluições das amostras (1:2; 1:4; 1:8; 1:10; 1:20; 1:25; 1:30; 1:35; 1:40, v/v, em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0; NaCl 0,9 % ou água) a fim de calcular a CL₅₀, concentração letal para 50 % dos indivíduos, a partir de análises de “probit”.

4.9. Obtenção das Frações Proteicas 0-70 (F_{0/70}) e F 70-90 (F_{70/90}) das Albuminas de Sementes de *A. cearensis*

O esquema de obtenção das frações proteicas 0-70 e 70-90% de saturação de sulfato de amônio das albuminas derivadas do EB de sementes de *A. cearensis* está mostrado na Figura 9. De acordo com os resultados obtidos do ensaio de inibição do crescimento de fungos filamentosos (item 4.8.4.), as albuminas foram fracionadas em gradiente de saturação de sulfato de amônio na fração proteica 0-70%, chamada de F_{0/70}, e fração 70-90%, chamada de F_{70/90}, e foram avaliadas quanto a sua atividade inibitória do crescimento dos fungos filamentosos fitopatogênicos em meio líquido.

4.9.1. Atividade Inibitória do Crescimento de Fungos Filamentosos pela F_{0/70} e F_{70/90} em Meio Líquido

A avaliação da atividade inibitória do crescimento de fungos filamentosos pela F_{0/70} e F_{70/90} em meio líquido foi realizada como descrito no item 4.8.4. Em triplicata, as frações F_{0/70} e F_{70/90} foram ensaiadas na concentração de 1 mg. mL⁻¹, sendo utilizados como controles: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 (controle negativo) e peróxido de hidrogênio 0,1 M (controle positivo).

4.9.2. Perfil Eletroforético da F_{0/70} e da F_{70/90} em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)

Os perfis proteicos das frações 0-70 (F_{0/70}) e 70-90% (F_{70/90}) de saturação de sulfato de amônio das albuminas derivadas do EB de sementes de *A. cearensis* foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS (2,0%) como descrito no item 4.3.4. Ambas as frações foram ressuspensas em tampão de amostra e ajustadas as concentrações de proteínas para 2,5 mg. mL⁻¹, sendo aplicados 20 µL de cada fração nos poços feitos no gel de poliacrilamida.

4.9.3. Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de Resource Q Acoplada a Sistema de FPLC

A fim de dar continuidade às etapas de purificação da(s) proteína(s) bioativa(s) contra os fitopatógenos, a fração 70/90 foi submetida a um primeiro passo cromatográfico. Uma massa correspondente a 10 mgP da F70/90 foi solubilizada em 700 µL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, e submetida a centrifugação a 12000 x g, por 10 min, a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante injetado na coluna aniônica Resource Q (6,4 x 30 mm, Pharmacia Biotech, Piscataway, EEUU) acoplada ao sistema de FPLC (“*Fast Protein Liquid Chromatography*”), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0. A coluna foi percolada com o tampão de equilíbrio até que as proteínas não retidas (PNR) fossem completamente removidas. Os materiais retidos foram eluídos com tampão de equilíbrio acrescido com um gradiente de NaCl 1,0M (0-10; 10-20 e 20-100%), sob um fluxo contínuo de

1,5 mL.min⁻¹, sendo coletadas alíquotas de 1,5 mL/tubo. A aplicação de NaCl resultou em três materiais denominados respectivamente de PR1, PR2 e PR3. A presença de proteínas nas frações coletadas nos tubos de ensaio foi avaliada através de leituras de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm. As frações contendo as proteínas eluídas foram dialisadas e liofilizadas para elucidação do perfil eletroforético.

4.9.4. Perfil Eletroforético dos Picos Obtidos da Cromatografia de Troca Iônica em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)

O perfis proteicos dos picos obtidos (PNR, PR1, PR2 e PR3) obtidos da cromatografia de troca iônica em coluna de resource Q acoplada a sistema de FPLC foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS (2,0%) como descrito no item 4.3.4. Todos os picos foram ajustados em tampão de amostra para a concentração de proteínas de 2,5 mg. mL⁻¹, sendo aplicados 20 µL de cada amostra nos poços feitos no gel de poliacrilamida.

4.10. Análise Estatística

Foram calculadas média, desvio padrão e coeficiente de variação de todos os valores obtidos. Para avaliar o grau de similaridade entre as variáveis foram realizados testes de comparações simples (*t*-Student) e de comparações múltiplas (ANOVA seguida de Teste de Tukey ou Teste de Tukey-Kramer). O nível de confiança das inferências foi de 95 % ($\alpha = 0.05$).

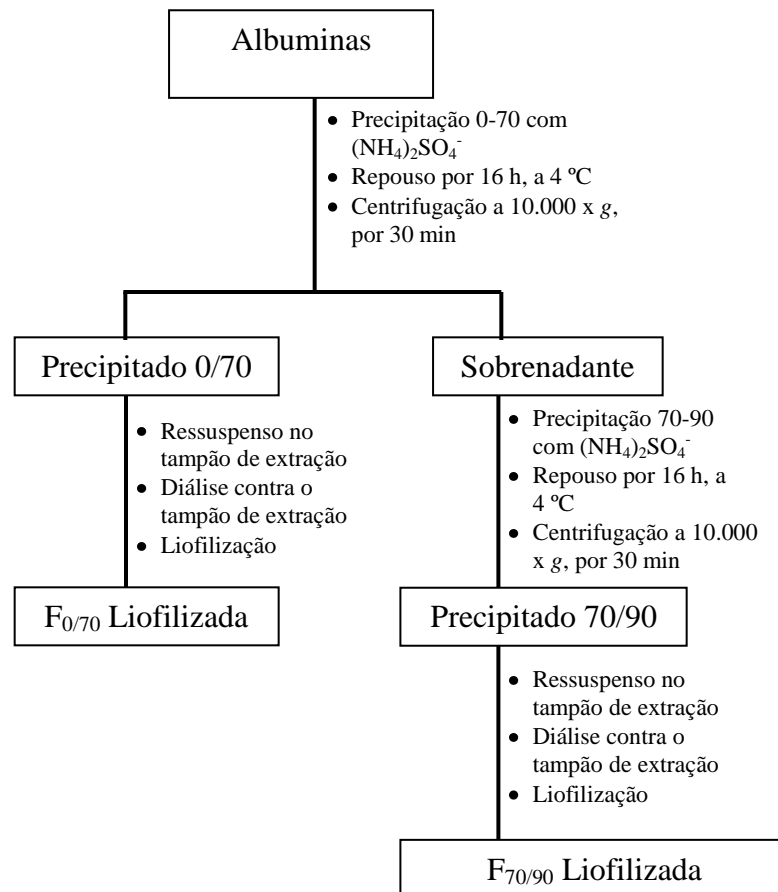


Figura 9. Esquema de obtenção das frações protéicas 0-70 ($F_{0/70}$) e 70-90 % ($F_{70/90}$) de saturação de sulfato de amônio das albuminas obtidas do extrato bruto de sementes de *Amburana cearensis*.

5. RESULTADOS

PARTE I. VALOR NUTRICIONAL DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE *A. cearensis*

5.1. Composição Química Elementar das Sementes

A farinha integral de sementes de *A. cearensis* apresentou um teor de umidade de $13,52 \pm 0,26$ g.100 gFarinha⁻¹. A Tabela 3 apresenta a composição química elementar (proteínas totais, lipídios totais, matéria mineral, fibra alimentar total, açúcares totais e amido), em base seca, da farinha integral de sementes de *A. cearensis*. As sementes apresentam uma composição extremamente balanceada, mostrando um elevado teor de proteínas totais ($22,69 \pm 0,81$ g.100 gF⁻¹), de lipídios totais ($24,45 \pm 2,02$ g.100gF⁻¹) e, ainda, de fibra alimentar ($34,75 \pm 1,78$ g. 100gF⁻¹). Secundariamente, as sementes são compostas de carboidratos digeríveis, amido ($11,43 \pm 0,18$ g.100g⁻¹) e açúcares totais ($5,60 \pm 0,09$ g.100gF⁻¹), e de minerais ($4,51 \pm 0,21$ g.100gF⁻¹). Devido ao elevado teor de proteico e lipídico e, ainda, a um moderado teor de carboidratos digeríveis, as sementes de *A. cearensis* são uma excelente fonte energética, fornecendo 378,93 Kcal em uma porção de 100 g.

5.2. Caracterização Bioquímica das Proteínas das Sementes de *A. cearensis*

5.2.1. Seleção da Melhor Solução Tampão para Extração de Proteínas Solúveis

Quando a farinha delipidada de sementes de *A. cearensis* foi submetida à extração com soluções-tampão a diferentes valores de pH (2,6 a 9,0), foi observado (Tabela 4) que as soluções-tampão com pH entre a faixa neutra e a alcalina (7,0 a 9,0) obtiveram o melhor resultado na extração de proteínas. As soluções-tampão Fosfato de Sódio pH 7,0, Tris-HCl pH 8,0 e Tris-HCl pH 9,0, todas na concentração de 50 mM, extraíram $27,34 \pm 0,97$; $28,34 \pm 0,67$ e $27,14 \pm 1,04$ mg Proteínas.mL⁻¹, respectivamente. As soluções-tampão Glicina-HCl pH 2,6 e Fosfato de Sódio pH 5,8, ambos na concentração de 50 mM, extraíram $15,65 \pm 0,12$ e $18,61 \pm 1,39$ mgP.mL⁻¹, respectivamente. Devido ao baixo custo de aquisição e eficiência extratora em pH fisiológico, a solução-tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, foi selecionada como tampão de trabalho para

Tabela 3. Composição química elementar (g. 100g⁻¹) e energia (Kcal. 100g⁻¹) da farinha integral de sementes de *Amburana cearensis* em base seca*

Parâmetros analisados	Sementes de <i>Amburana cearensis</i>
Constituintes	
Proteínas totais**	22,69 ± 0,81
Lipídios totais	24,45 ± 2,02
Material mineral	4,51 ± 0,21
Fibra alimentar	34,75 ± 1,78
Amido	11,43 ± 0,18
Açúcares totais	5,60 ± 0,09
Energia***	378,93

* Os valores são médias ± desvio padrão de uma triplicata;

** N total x 6,25;

*** g de carboidrato x 4,0 Kcal + g de proteína x 4,0 Kcal + g de lipídio x 9,0 Kcal (MAHAN; SCOTT-STUMP, 1996).

Tabela 4. Extração (n = 3) de proteínas (mg. mL⁻¹) da farinha delipidada de sementes de *Amburana cearensis* expostas a diferentes soluções-tampão com diferentes pH*

Solução-tampão	Proteínas Solúveis
Glicina HCl 0,05 M, pH 2,6	15,65 ± 0,12 ^a
Fosfato de Sódio 0,05 M, pH 5,8	18,61 ± 1,39 ^b
Fosfato de Sódio 0,05 M, pH 7,0	27,34 ± 0,97 ^c
Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0	28,34 ± 0,67 ^c
Tris-HCl 0,05 M, pH 9,0	27,14 ± 1,04 ^c

*Os valores são média ± desvio padrão de uma triplicata;

Letras sobrescritas na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa (Teste de Tukey; p < 0,05).

Tabela 5. Teores das proteínas (N x 6,25) das frações proteicas presentes nas sementes de *Amburana cearensis* obtidas com diferentes soluções de extração

Classes de Proteínas	Teor de proteínas no EB de sementes de <i>A. cearensis</i>		
	g. 100 g ^{-1*}	gP. gFP ^{-1**}	gP. 100 gP ^{-1***}
Globulina	11,20	11,09	74,43
Albumina	2,70	2,12	14,23
Prolamina	0,30	0,18	1,20
Glutelina Ácida	0,15	0,01	0,07
Glutelina Básica	3,60	1,50	10,07

* Grama de fração proteica por 100 g de farinha das sementes;

** Grama de proteínas (N x 6,25) por grama de fração proteica;

*** Grama de proteína por 100 g de proteínas totais da semente.

5.2.3. Eletroforese em Condições Desnaturantes do Extrato Bruto e das Classes de Proteínas

O perfil eletroforético obtido em condições desnaturantes (presença de SDS e β -mercaptoetanol) do extrato bruto (EB) da farinha das sementes de *A. cearensis* está mostrado na Figura 10. Há predominância de bandas proteicas de alta massa molecular ($> 45,0$ kDa) e de algumas outras banda de massa moleculares menores.

Na Figura 11, estão mostrados os perfis eletroforéticos das frações proteicas (globulinas, albuminas, glutelinas ácidas, glutelinas básicas e prolaminas) obtidas da farinha de sementes de *A. cearensis* de acordo com sua solubilidade frente a diferentes soluções extratoras. Pode ser visto que as proteínas de alta massa molecular ($> 45,0$ kDa) são globulinas (raia 2), com outras poucas bandas proteicas de baixa massa molecular. Na raia 3, estão mostradas as albuminas com uma grande variedade de proteínas com diferentes massas moleculares, ocupando toda a extensão do gel. Apesar de a fração proteica glutelinas básicas (raia 4) deter a terceira melhor concentração de proteínas quando comparada as demais frações (Tabela 4), na mesma não foi possível visualizar bandas proteicas, somente um forte “arrastado” no gel, provavelmente devido a baixa interação entre o corante e as glutelinas básicas. Na fração glutelinas ácidas (raia 5) são bem visualizadas quatro bandas proteicas com massas moleculares aparentes em torno de 21,4, 31,0 e 66,2 kDa. Já na fração prolamina (raia 6) são bem visualizadas duas bandas proteicas com massas moleculares aparentes em torno de 21,4 e 31,0 kDa

5.2.4. Composição de Aminoácidos

A Tabela 6 apresenta a composição de aminoácidos da farinha de sementes de *A. cearensis*. Analisando os aminoácidos essenciais, há predominância de isoleucina ($91,16$ g. kg Proteína⁻¹), lisina ($75,39$ g. kg Proteína⁻¹) e valina ($56,72$ g. kg Proteína⁻¹). O teor de fenilalanina + tirosina ($111,76$ g. kg Proteína⁻¹) também foi bastante expressivo. Por outro lado, é notória a deficiência nos aminoácidos sulfurados (metionina + $\frac{1}{2}$ cys = $7,83$ g. kg Proteína⁻¹). Quanto à composição de aminoácidos não-essenciais ou semi-essenciais, destacaram-se os elevados teores de ácido glutâmico/ glutamato ($126,74$ g. kg Proteína⁻¹) e arginina ($129,57$ g. kg Proteína⁻¹).

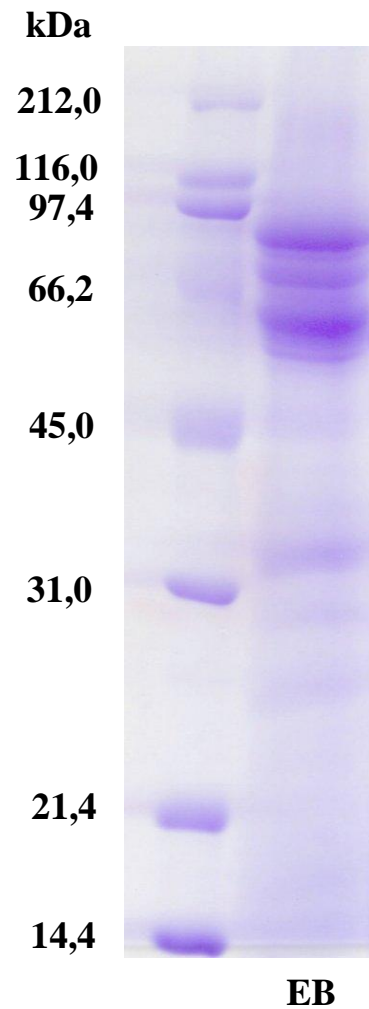


Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS (2%) e β -mercaptoetanol (2,5%) do extrato bruto - EB (50 μ gP) obtido da farinha de sementes de *Amburana cearensis*. À esquerda, os marcadores de massa molecular: lisozima (14,4 kDa); inibidor de tripsina da soja (21,4 kDa); anidrase carbônica (31,0 kDa); ovalbumina (45,0 kDa); albumina sérica bovina (66,2 kDa); fosforilase B (97,4 kDa); β -galactosidase (116 kDa) e miosina (216 kDa). À direita, o extrato bruto (EB).

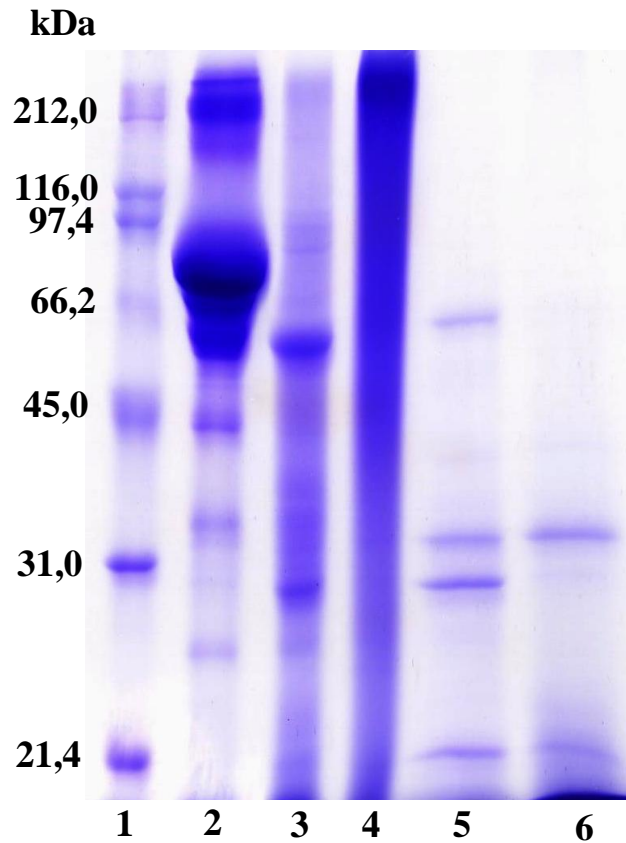


Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS (2,0%) e β -mercaptoetanol (2,5%) das principais classes de proteínas obtidas a partir da farinha de sementes de *Amburana cearensis*. Em cada poço foram aplicados 50 μ gP. 1). Marcadores de massa molecular: lisozima (14,4 kDa), inibidor de tripsina da soja (21,4 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), β -galactosidase (116 kDa) e miosina (216 kDa); 2). Globulina; 3) Albumina; 4) Glutelina básica; 5) Glutelina ácida; e, 6) Prolamina.

Tabela 6. Composição de aminoácidos (g. Kg de proteína⁻¹) da farinha delipidada de sementes de *Amburana cearensis* comparada aos requerimentos estabelecidos pela FAO/WHO/UNU para crianças e aos requerimentos estabelecidos para ratos em crescimento

Aminoácidos	Sementes de <i>A. cearensis</i>	Clara do ovo	Crianças ^a		Ratos em crescimento ^b
			2 – 5 anos	6 – 12 anos	
Essenciais					
Thr	37,76	48,32	34	28	41
Val	56,72	54,24	35	25	58
Leu	49,20	56,21	28	28	78
Ile	91,16	75,94	66	44	48
Lys	75,39	108,48	58	44	77
Phe + Tyr	111,76	131,16	63	44	97
Met + Cys	7,83	73,96	25	22	52
Trp ^c	10,1	39,45	11	9	12
Não-essenciais					
Asx	78,52	60,16			
Glx	126,74	84,81			
Ser	50,40	53,25			
Gly	49,39	31,56			
Ala	66,73	57,20			
His	56,52	22,68	19	19	25
Arg	129,57	102,56		50	51
Pro	12,95	60,16			
Total	1001,65	1000,00			

Valores médios da composição de aminoácidos da farinha de sementes de *A. cearensis* obtidos de duas repetições. ^aRequerimentos de aminoácidos para crianças em diferentes faixas etárias estabelecidos pela FAO/WHO/UNU (1985); ^bRequerimentos de aminoácidos para ratos em crescimento (Coates *et al.*, 1969); ^cDeterminado pelo método ninhidrina-ácido (Pintér-Szakács e Molnár-Perl, 1990).

5.3. Presença de Fatores Tóxicos e/ou Antinutricionais

Os resultados da análise quantitativa da presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais estão mostrados na Tabela 7. Não foram detectadas lectinas, toxinas e taninos. No entanto, foi detectado um elevado nível de atividade inibitória de tripsina ($27,41 \pm 0,03$ g TI. Kg Farinha⁻¹) e de atividade ureásica ($434,0 \pm 34,0$ U. Kg Farinha⁻¹). A Tabela 8 mostra os resultados da análise qualitativa da detecção de metabólitos secundários a partir do extrato etanólico das sementes de *A. cearensis*. Foi detectada a presença de taninos, fenóis, flavonas, flavonóis e xantonas.

5.4. Obtenção da F_{0/90}, Proteínas Totais, Teor de Trp, Tratamento Térmico e Dosagem da Atividade Inibitória de Tripsina

A partir de 30 g de farinha delipidada de sementes de *A. cearensis* foram obtidas em média 4,0 g de F_{0/90}. Portanto, para os experimentos de alimentação e demais ensaios com a F_{0/90} foram preparados 230 g de fração a partir de quase 2,0 Kg de farinha delipidada de sementes de *A. cearensis*. O teor de proteínas totais da F_{0/90} foi de $93,15 \pm 4,27$ g.100g⁻¹, ou seja, a fração é essencialmente composta por proteínas. O teor de triptofano na fração caiu pela metade ($5,09$ g.Kg Proteína⁻¹) quando comparado ao teor detectado na farinha das sementes ($10,1$ g. Kg Proteína⁻¹). Quanto à dosagem da atividade inibitória de tripsina da F_{0/90} (Tabela 9), foi observado que a fração detém integralmente ($27,61 \pm 0,09$ gTI.Kg Fração⁻¹) a atividade detectada na farinha integral ($27,41 \pm 0,03$ gTI.Kg Farinha⁻¹). Portanto, a fração F_{0/90} foi submetida a vários tratamentos térmicos, sendo exposta à água fervente por diferentes tempos para diminuir a interferência deste antinutriente no aproveitamento da dieta. Na Tabela 9, é possível observar que somente após 120 min de fervura a atividade inibitória de tripsina da F_{0/90} ($20,96 \pm 0,77$ gTI.Kg Fração⁻¹) tem uma queda significativa ($p < 0,05$), ficando estável até 150 min ($19,69 \pm 0,55$ gTI. Kg Fração⁻¹) com uma redução de atividade de 28,69%. Aos 180 min de fervura, a atividade inibitória de tripsina reduziu quase à metade ($15,44 \pm 0,94$ gTI.Kg Fração⁻¹) do valor inicial, obtendo uma redução de atividade de 44,08%. Portanto, 180 min de fervura foi o tratamento de escolha para fração F_{0/90}.

Tabela 7. Análise quantitativa da presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais nas sementes de *Amburana cearensis*

Fator tóxico e/ou antinutricional	Semente de <i>Amburana cearensis</i>
Inibidor de tripsina	27,41 ± 0,03 ^a
Lectinas	ND ^b
Urease	434,0 ± 34,0 ^c
Toxinas	NL ^d
Taninos	ND

^a A atividade inibitória de tripsina é expressa como g de tripsina inibida por Kg de farinha;

^b Não detectado quando usado sangue de camundongo, coelho e rato, nativo e tratado com proteases de *Bacillus licheniformis*;

^c A atividade ureásica é expressa em unidades de enzima por kg de farinha. As unidades foram calculadas segundo informação da Sigma que 1g de enzima pura contém 870,000 unidades;

^d Não letal na dose de 1g por kg de peso corpóreo de camundongo por via IP.

Tabela 8. Análise qualitativa da presença de metabólitos secundários no extrato etanólico de sementes de *Amburana cearensis*

Metabólitos Secundários*	Presença (+) ou Ausência (-)
Taninos	+
Fenóis	+
Alcalóides	-
Saponinas	-
Antocianinas e Antocianidinas	-
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	+
Chalconas e Auronas	-
Flavonóides	-
Leucoantocianidinas	-
Triterpenóides	-
Catequinas	-
Esteróides	+
Flavononas	-

* Detecção baseada em observação visual da modificação de cores ou formação de precipitados, após à adição de reagentes específicos segundo Matos (1999).

5.4.1. Eletroforese da F_{0/90} e da F_{0/90} Tratada Termicamente em Condições Desnaturantes

Na Figura 12, estão mostrados os perfis eletroforéticos em gel de tricina, sob condições desnaturantes, do extrato bruto (EB) obtido da farinha de sementes de *A. cearensis* e sua fração F_{0/90} não-tratada e tratada termicamente em água fervente, por 180 min. Como mostrado anteriormente, no EB (raia 2) há uma predominância de bandas proteicas de alta massa molecular (> 45,0 kDa) e algumas outras bandas de massa moleculares relativas menores. Na F_{0/90} (raia 3), há uma nítida concentração proteica, podendo ser bem visualizadas, além das bandas de alta massa molecular (> 45,0 kDa), várias outras bandas de baixa massa molecular. O próprio inibidor de tripsina de sementes de *A. cearensis*, com massa molecular aparente de 13,6 kDa (Tanaka *et al.*, 1986), deve figurar entre as duas bandas proteicas situadas abaixo do marcador de massa molecular de 14,4 kDa. A F_{0/90} tratada termicamente (raia 4) apresenta uma clara perda de visualização das bandas de alta massa molecular, certamente globulinas (Figura 11). Esta ausência das proteínas de alta massa molecular no gel pode ser devido à perda de solubilidade decorrente de sua desnaturação em altas temperaturas, conseqüentemente, não sendo ressuspendidas no tampão de amostra da corrida eletroforética, deixando, assim, de serem visualizadas na corrida eletroforética.

5.5. Experimento de Alimentação I

5.5.1. Farinha de Sementes de *A. cearensis* como Fonte de Proteínas

O experimento de avaliação da qualidade da farinha de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas foi composto de quatro dietas, sendo duas controles (Dieta Padrão – DP, clara do ovo como fonte de proteínas; Dieta Aprroteica – Dieta DAp, isenta de proteínas) e duas experimentais (Dieta AC, à base da farinha crua de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas; Dieta ACP, à base da farinha processada de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteína). O processamento das sementes foi feito através de demolho de 12 h, com posterior fervura por 90 min, desidratação a 45 °C, por 24 h, e moagem. A imersão das sementes de *A. cearensis* utilizadas na composição da Dieta ACP em água foi eficiente em remover taninos, flavonas, flavonóis, xantonas e saponinas.

Tabela 9. Atividade inibitória de tripsina* na F_{0,90} e na F_{0,90} submetida à fervura por diferentes tempos

Tempo (Minutos)	Atividade Inibitória de Tripsina	Redução da Atividade Inibitória de Tripsina (%)**
0	27,61 ± 0,09 ^a	0
5	27,41 ± 0,03 ^a	0,72
15	27,38 ± 0,07 ^a	0,83
30	27,37 ± 0,09 ^a	0,87
60	26,22 ± 0,09 ^a	5,03
90	26,13 ± 0,01 ^a	5,36
120	20,96 ± 0,77 ^b	24,09
150	19,69 ± 0,55 ^b	28,69
180	15,44 ± 0,94 ^c	44,08

* A atividade inibitória de tripsina é expressa como g de tripsina inibida por Kg de farinha;

** Redução da atividade inibitória de tripsina calculada em relação à amostra não tratada termicamente;

Letras sobrescritas na mesma coluna representam diferença estatisticamente significante (Teste de Tukey; p < 0,05)

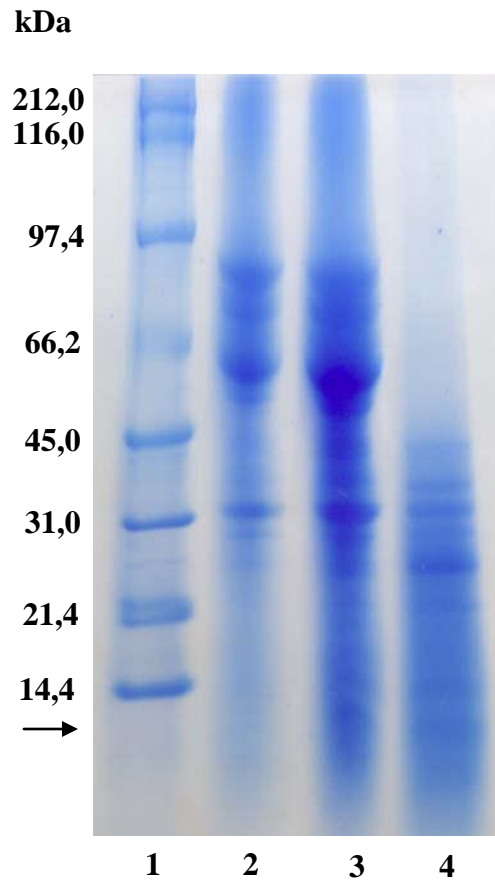


Figura 12. Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS (1%) e β -mercaptoetanol (0,7%) do extrato bruto (EB) obtido da farinha de sementes de *Amburana cearensis* e sua fração $F_{0/90}$ não-tratada e tratada termicamente em água fervente, por 180 min. Em cada poço foi injetado 50 μ gP de cada amostra. 1) Marcadores de massa molecular: lisozima (14,4 kDa), inibidor de tripsina da soja (21,4 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), β -galactosidase (116 kDa) e miosina (216 kDa); 2) Extrato Bruto (EB); 3) $F_{0/90}$; e, 4) $F_{0/90}$ tratada termicamente. A seta indica a altura da banda protéica referente ao inibidor de tripsina de *A. cearensis*.

O experimento teve que ser interrompido no 4º dia de andamento, devido à morte precoce de dois animais alimentados com a Dieta AC, a provável morte de mais animais e, ainda, de acordo com os dados biológicos obtidos até o referido momento. O ganho de peso e a ingestão diária dos animais, durante os quatro dias de experimento, serão apresentados, em seguida, a fim de compreendermos a resposta dos animais perante as dietas experimentais. Na Figura 13, estão mostradas as curvas de crescimento dos animais do grupo Dieta Padrão, do grupo Dieta Aproteica, do grupo Dieta AC e do grupo Dieta ACP. O único grupo que apresentou curva de crescimento positiva foi o grupo alimentado com a dieta à base de proteínas da clara do ovo (Dieta Padrão), sendo bastante superior àquela dos demais grupos. De acordo com o previsto, a curva de crescimento dos animais alimentados com a Dieta Aproteica aparece bem abaixo daquela do grupo Dieta Padrão. As curvas de crescimento dos grupos alimentados com as dietas à base da farinha integral de sementes de *A. cearensis* crua e processada aparecem bem abaixo até daquela do grupo Dieta Aproteica, sendo o pior desempenho aquele do grupo Dieta AC. Na Figura 14, estão mostrados ratos dos grupos experimentais e do grupo Dieta Aproteica comparados a ratos do grupo Dieta Padrão.

A Tabela 10 apresenta os valores de ganho de peso e de dieta ingerida médios dos grupos controles e experimentais. É notória a baixa ingestão alimentar dos grupos experimentais (Dieta AC = < 0,50 g/ rato e Dieta ACP = < 1,0 g/ rato) que consumiram aproximadamente 10x menos do que o grupo DP ($10,18 \pm 1,02$ g) e 4x menos do que o grupo DAp ($4,35 \pm 0,53$ g). Essa baixa ingestão alimentar nos grupos experimentais resultou em uma drástica perda de peso (Dieta AC = $- 24,85 \pm 3,56$ g e Dieta ACP = $- 18,54 \pm 2,05$ g). Já a DAp perdeu bastante peso também ($- 10,20 \pm 0,76$ g).

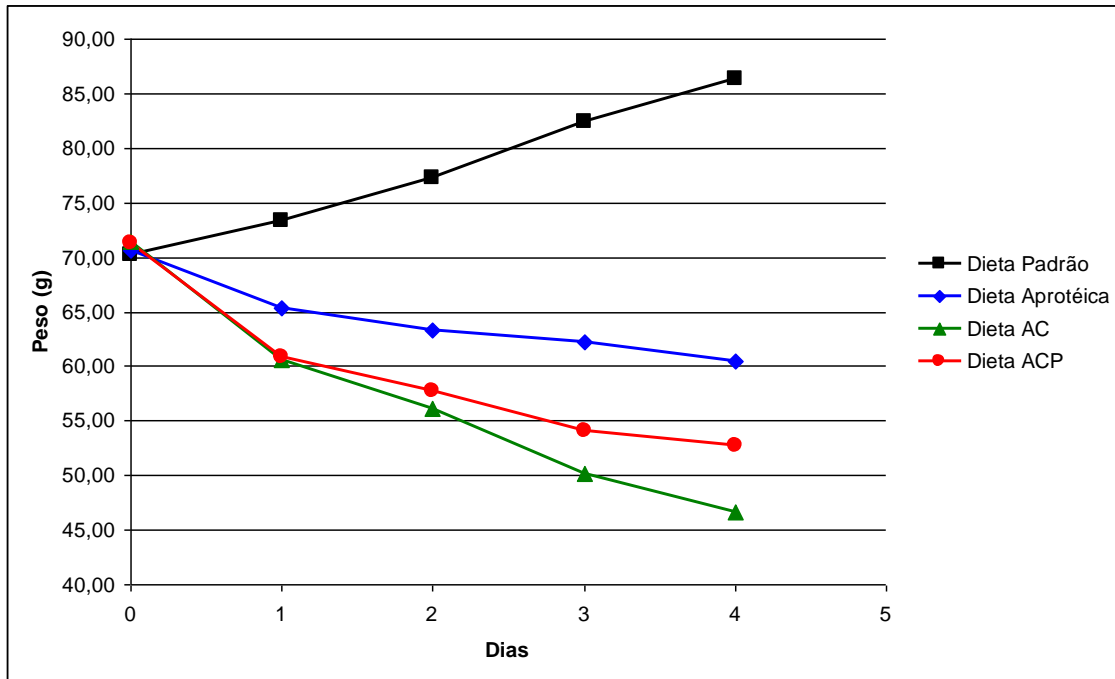


Figura 13. Curva de crescimento dos ratos alimentados ($n = 6/\text{grupo}$) durante 4 dias com uma dieta á base da farinha integral de sementes de *Amburana cearensis* crua (Dieta AC) e processada termicamente, demolho e fervura por 90 min, (Dieta ACP) como fonte de proteínas; uma dieta padrão (Dieta DP), com a proteína da clara do ovo como fonte de proteica; e uma dieta aprotéica (Dieta DAp), isenta de proteínas.

Tabela 10. Ganho de peso (g) e ingestão diária (g/ rato) dos ratos (n = 6/ grupo) alimentados com a Dieta Padrão – Dieta DP (clara do ovo como fonte de proteínas), grupo Dieta Aproveita – Dieta DAp (isenta de proteínas), grupo Dieta AC (à base da farinha de sementes de *A. cearensis* crua como fonte de proteínas) e do grupo Dieta ACP (à base da farinha de sementes de *A. cearensis* processada, demolho e fervura por 90 min, como fonte de proteínas).

Dieta	Dieta Ingerida	Ganho de Peso
DP	10,18 ± 1,02 ^a	16,13 ± 1,64 ^a
DAp	4,35 ± 0,53 ^b	- 10,20 ± 0,76 ^b
AC	< 0,50 ^c	- 24,85 ± 3,56 ^c
ACP	< 1,0 ^d	- 18,54 ± 2,05 ^d

Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa (Teste de Tukey-Kramer; $p < 0,05$).

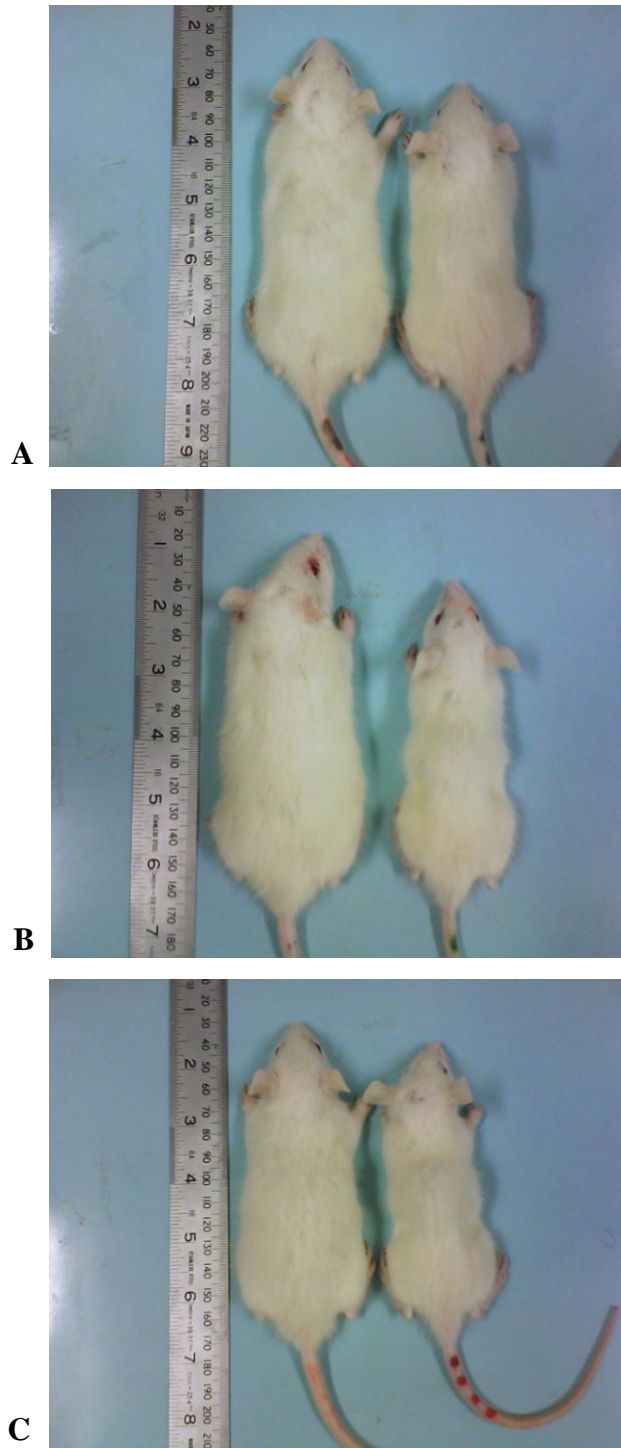


Figura 14. À esquerda, rato alimentado com dieta à base da clara do ovo (Dieta Padrão) comparado aos demais ratos alimentados com a dieta isenta de proteínas – Dieta Aprroteica (A), com a dieta à base da farinha integral crua – Dieta AC (B) e processada, demolho e fervura por 90 min, – Dieta ACP (C) de sementes de *A. cearensis*.

A fim de esclarecer a rejeição dos animais às dietas experimentais (à base da farinha crua e processada de sementes de *A. cearensis*), procedeu-se a exsanguinação para averiguação dos parâmetros séricos e, posterior, dissecação dos animais para a obtenção dos pesos úmido e seco relativos dos órgãos mesmo com apenas quatro dias de experimento realizado. Desta forma, procurou-se avaliar se o consumo das dietas experimentais foi capaz de causar alguma injúria aos animais, mesmo com a baixa ingestão apresentada (Dieta AC = < 0,50 g/ rato e Dieta ACP = < 1,0 g/ rato) e, ainda, com os moderados níveis de fatores tóxicos e/ou antinutricionais detectados nas sementes de *A. cearensis* (Tabela 7).

Na Tabela 11, estão mostrados os valores encontrados para o peso úmido relativo dos órgãos dos animais alimentados com as dietas controle (Dieta Padrão e Dieta Aproveica) e com as dietas experimentais (Dieta AC e Dieta ACP). Em geral, para o peso úmido, os animais dos grupos experimentais tiveram involuções do timo, baço e fígado semelhantemente aos animais do grupo Dieta Aproveica ($p > 0,05$). Foi observado também aumento relativo do estômago, intestino grosso e rins dos grupos experimentais quando comparados especialmente aos órgãos dos animais alimentados com a Dieta Padrão ($p < 0,05$). Já na Tabela 12, estão mostrados o peso seco relativo dos órgãos dos mesmos grupos controles e experimentais. O peso seco relativo do estômago e dos rins confirmou o aumento detectado anteriormente no peso úmido relativo, além de aumento do fígado, do coração e dos pulmões quando comparados aos pesos para o grupo Dieta Padrão ($p < 0,05$). As involuções mostradas anteriormente no peso úmido relativo do timo, baço e fígado foram confirmadas na análise do peso seco relativo desses órgãos quando comparados também a Dieta Padrão ($p < 0,05$). Portanto, os animais apresentaram reduções e aumentos relativos, tanto para o peso úmido quanto para o peso seco relativo dos órgãos, típicas de quadros de inanição, e nenhuma alteração acentuada de órgãos marcadores de toxicidade como os rins e o fígado.

A Tabela 13 apresenta os valores dos parâmetros séricos dos ratos alimentados com as dietas controles (DP e DAp) e experimentais (DAC e DAp). Quanto aos valores de proteínas totais e albumina, os animais alimentados com as dietas AC e ACP apresentaram aumento em relação aos grupos controles ($p < 0,05$). Por outro lado, os animais apresentaram elevados níveis de uréia plasmática, sendo maiores para os animais alimentados com a Dieta AC ($73,65 \pm 4,62$ mg.dL⁻¹), seguidos da Dieta ACP ($58,67 \pm 4,87$ mg.dL⁻¹), dieta DAp ($38,49 \pm 3,65$ mg.dL⁻¹) e da dieta DP ($6,87 \pm 0,47$ mg.dL⁻¹), sendo maiores de acordo com o estado de desnutrição dos

animais. Os níveis das enzimas marcadoras de toxicidade hepática (Fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT) estavam inalterados.

Enfim, os resultados dos parâmetros biológicos (ganho de peso e dieta ingerida), bem como aqueles das análises dos pesos úmido e seco relativos dos órgãos e dos parâmetros séricos apontam para um quadro de inanição dos animais alimentados com as dietas experimentais. Essa inanição é oriunda da rejeição da dieta que resultou num consumo de dieta extremamente abaixo das necessidades para a manutenção dos processos metabólicos dos animais. As causas da rejeição serão abordadas na seção Discussão.

Tabela 11. Peso úmido relativo (%) dos órgãos dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas experimentais à base da farinha integral crua (Dieta AC) e processada, demolho e fervura por 90 min, (Dieta ACP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas comparadas às dietas controles, uma com a clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão) e outra isenta de proteínas (Dieta Aproveiteica)

Órgãos	Dietas			
	Padrão	Aproveiteica	AC	ACP
Timo	0,50 ± 0,07 ^a	0,35 ± 0,07 ^b	0,16 ± 0,07 ^c	0,24 ± 0,09 ^{bc}
Coração	0,58 ± 0,08 ^a	0,55 ± 0,06 ^a	0,60 ± 0,06 ^a	0,57 ± 0,03 ^a
Pulmões	0,86 ± 0,06 ^a	0,93 ± 0,07 ^a	0,96 ± 0,03 ^a	1,00 ± 0,13 ^a
Baço	0,35 ± 0,22 ^a	0,30 ± 0,22 ^b	0,15 ± 0,03 ^c	0,30 ± 0,04 ^b
Estômago	1,08 ± 0,09 ^a	1,12 ± 0,06 ^a	1,33 ± 0,22 ^b	1,22 ± 0,07 ^{ab}
Duodeno	1,63 ± 0,23 ^a	1,91 ± 0,28 ^a	1,89 ± 0,58 ^a	1,82 ± 0,35 ^a
Jejuno	1,55 ± 0,23 ^a	1,68 ± 0,34 ^a	1,38 ± 0,38 ^a	1,60 ± 0,29 ^a
Íleo	1,68 ± 0,40 ^a	1,72 ± 0,32 ^a	1,03 ± 0,17 ^b	1,59 ± 0,17 ^a
Intestino Grosso	1,80 ± 0,29 ^a	1,67 ± 0,08 ^a	2,72 ± 0,51 ^b	1,95 ± 0,26 ^{ab}
Pâncreas	0,42 ± 0,06 ^a	0,43 ± 0,21 ^a	0,42 ± 0,13 ^a	0,43 ± 0,16 ^a
Fígado	4,95 ± 0,42 ^a	4,21 ± 0,30 ^a	4,45 ± 0,73 ^a	4,85 ± 0,31 ^a
Rins	1,21 ± 0,05 ^a	1,28 ± 0,08 ^a	1,62 ± 0,16 ^b	1,57 ± 0,06 ^b

Os valores são médias ± desvio padrão;

Letras sobrescritas iguais, na mesma linha, referem-se a valores não significativamente diferentes (p>0,05; Teste de Tukey-Kramer).

Tabela 12. Peso seco relativo (%) dos órgãos dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas experimentais à base da farinha integral crua (Dieta AC) e processada, demolho e fervura por 90 min, (Dieta ACP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas comparadas com as dietas controles, uma com a clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão) e outra isenta de proteínas (Dieta Aprroteica)

Órgãos	Dietas			
	Padrão	Aproteica	AC	ACP
Timo	0,37 ± 0,05 ^a	0,28 ± 0,06 ^{ac}	0,15 ± 0,06 ^b	0,21 ± 0,08 ^{bc}
Coração	0,42 ± 0,04 ^a	0,44 ± 0,05 ^{ab}	0,51 ± 0,04 ^b	0,50 ± 0,00 ^b
Pulmões	0,64 ± 0,05 ^a	0,72 ± 0,05 ^{ab}	0,85 ± 0,07 ^{bc}	0,86 ± 0,11 ^c
Baço	0,30 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,02 ^a	0,21 ± 0,05 ^b	0,31 ± 0,03 ^a
Estômago	0,77 ± 0,08 ^a	0,80 ± 0,02 ^a	0,96 ± 0,06 ^b	0,96 ± 0,09 ^b
Duodeno	1,03 ± 0,18 ^a	1,12 ± 0,12 ^a	1,15 ± 0,40 ^a	1,28 ± 0,18 ^a
Jejuno	0,99 ± 0,14 ^a	0,97 ± 0,12 ^a	0,82 ± 0,27 ^a	1,10 ± 0,12 ^a
Íleo	1,10 ± 0,31 ^a	1,02 ± 0,21 ^{ab}	0,66 ± 0,11 ^b	1,00 ± 0,09 ^{ab}
Intestino Grosso	1,18 ± 0,10 ^a	1,17 ± 0,06 ^a	1,58 ± 0,36 ^a	1,26 ± 0,12 ^a
Pâncreas	0,45 ± 0,09 ^a	0,47 ± 0,22 ^a	0,46 ± 0,10 ^a	0,48 ± 0,15 ^a
Fígado	4,74 ± 0,34 ^{ab}	4,09 ± 0,41 ^a	4,66 ± 0,98 ^{ab}	5,31 ± 0,44 ^b
Rins	0,94 ± 0,05 ^a	1,09 ± 0,06 ^b	1,49 ± 0,09 ^c	1,50 ± 0,05 ^c

Os valores são médias ± desvio padrão;

Letras sobrescritas iguais, na mesma linha, referem-se a valores não significativamente diferentes (p>0,05; Teste de Tukey-Kramer).

Tabela 13. Parâmetros séricos dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas experimentais à base da farinha integral de sementes de *A. cearensis* crua (Dieta AC) e processada, demolho e fervura por 90 min, (Dieta ACP) como fonte de proteínas, comparadas com as dietas controles, uma com a clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão) e outra isenta de proteínas (Dieta Aprroteica) por um período de 4 dias

Parâmetros analisados	Dietas			
	Padrão	Aproteica	AC	ACP
Proteínas totais (g. dL ⁻¹)	5,04 ± 0,37 ^a	4,85 ± 0,25 ^a	5,74 ± 0,41 ^b	5,24 ± 0,11 ^{ab}
Albumina (g. dL ⁻¹)	3,60 ± 0,45 ^{ab}	3,16 ± 0,25 ^a	3,68 ± 0,21 ^{ab}	3,70 ± 0,23 ^b
Uréia (mg. dL ⁻¹)	6,87 ± 0,47 ^a	38,49 ± 3,65 ^b	73,65 ± 4,62 ^c	58,67 ± 4,87 ^d
Fosfatase Alcalina (U. L ⁻¹)	201,24 ± 11,56 ^a	214,33 ± 12,17 ^a	224,14 ± 22,72 ^a	224,56 ± 30,55 ^a
AST* (U. mL ⁻¹)	28,09 ± 2,17 ^a	28,19 ± 1,33 ^a	30,39 ± 3,29 ^a	29,57 ± 1,54 ^a
ALT** (U. mL ⁻¹)	141,95 ± 15,52 ^a	128,26 ± 4,51 ^a	124,27 ± 9,28 ^a	134,93 ± 11,27 ^a

Os valores são médias ± desvio padrão;

Letras sobrescritas iguais, na mesma linha, referem-se a valores não significativamente diferentes (p>0,05; Teste de Tukey-Kramer).

* AST: Aspartato aminotransferase.

** ALT: Alanina aminotransferase.

5.6. Experimento de Alimentação II

5.6.1. Fração Proteica F_{0/90} de Sementes de *A. cearensis* como Fonte de Proteínas

No Experimento de Alimentação I, foi constatado que os animais rejeitaram as dietas contendo a farinha integral de sementes de *A. cearensis* crua e processada, mesmo apresentando uma boa composição de aminoácidos e, ainda, suplementada com metionina e tendo um moderado teor de fatores tóxicos e/ou antinutricionais, especialmente aqueles de natureza proteica. Provavelmente, o motivo da rejeição deve estar relacionado ao elevado teor de cumarina, um alcalóide típico de *A. cearensis* que conferiu cheiro forte às dietas, e de outros metabólitos secundários que não foram reduzidos a níveis aceitáveis nem mesmo com o processamento (lavagem e cocção), afastando os animais do consumo da dieta. Por este motivo, as proteínas das sementes deveriam ser isoladas dos demais constituintes, especialmente dos antinutrientes de baixa massa molecular para, efetivamente, serem avaliadas quanto ao seu valor biológico para ratos em crescimento. Para tanto, as proteínas solúveis em tampão de extração de sementes de *A. cearensis* foram concentradas por precipitação 0-90 % de saturação de sulfato de amônio, sendo então obtidas a F_{0/90} e F_{0/90} processada termicamente para diminuir a atividade inibitória de tripsina.

O ensaio de avaliação da qualidade da fração proteica F_{0/90} e F_{0/90} processada termicamente de sementes de *A. cearensis* foi composto de quatro dietas, sendo duas controles (Dieta Padrão – DP, clara do ovo como fonte de proteínas; Dieta Aprroteica – Dieta DAp, isenta de proteínas) e duas experimentais (Dieta FP, à base da F_{0/90} como fonte de proteínas; Dieta FPP, à base da F_{0/90} processada termicamente como fonte de proteína). Os resultados obtidos no ensaio são mostrados a seguir.

5.6.1.1. Crescimento dos animais

Na Figura 15, estão mostradas as curvas de crescimento dos animais do grupo Dieta Padrão, do grupo Dieta Aprroteica, do grupo Dieta FP e do grupo Dieta FPP. Os animais alimentados com a dieta à base da clara do ovo como fonte de proteínas mostraram o melhor desempenho, apresentando ganho de peso ao longo do experimento. Logo abaixo, aparece a

curva de crescimento dos animais alimentados com a $F_{0/90}$ processada termicamente, refletindo um ganho de peso constante ao longo do experimento. Em seguida, aparece a curva dos animais alimentados com a fração proteica $F_{0/90}$, apresentando também um crescimento linear derivado de um ganho de peso constante, mas inferior ao do grupo DP e do grupo Dieta FPP. De acordo com o previsto, a curva de crescimento negativa dos animais alimentados com a Dieta Aproteica aparece bem abaixo daquela apresentada pelos demais grupos.

5.6.1.2. Ganho de Peso e Dieta Ingerida

Na Figura 16, está mostrada a relação entre o ganho de peso e a quantidade de dieta ingerida pelos animais alimentados com as dietas experimentais (Dieta FP e Dieta FPP) e com as dietas controles (Dieta Padrão - DP e Dieta Aproteica - DAp). Inicialmente, é importante salientar que os animais aceitaram muito bem a fração proteica $F_{0/90}$, apresentando altos valores de ingestão e confirmando que a rejeição das dietas à base da farinha de *A. cearensis* pelos animais foi provavelmente provocada por antinutrientes de natureza secundária e não por proteínas que representam a maior parte da fração (> 90 %). Os animais que ganharam mais peso foram aqueles alimentados com a dieta à base da clara do ovo ($39,77 \pm 6,74$ g), sendo também o grupo que mais consumiu dieta ($110,15 \pm 5,64$ g). Apesar da elevada ingestão de dieta pelos animais do grupo Dieta FP ($92,11 \pm 9,02$ g), o ganho de peso desses animais ($12,24 \pm 3,28$ g) foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) àquele apresentado pelos animais do grupo Dieta Padrão. O grupo Dieta FPP apresentou ingestão ($94,22 \pm 9,21$ g) similar a do grupo Dieta FP ($p > 0,05$), contudo o ganho de peso desses animais ($17,60 \pm 5,03$ g) foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) àqueles do grupo Dieta FP e inferior àqueles do grupo Dieta Padrão. Os animais alimentados com a Dieta Aproteica apresentaram a menor ingestão de dieta ($54,43 \pm 8,01$ g) e apenas perderam peso ($- 13,22 \pm 1,56$ g), sendo estatisticamente inferior a todos os outros grupos para os dois parâmetros analisados ($p < 0,05$).

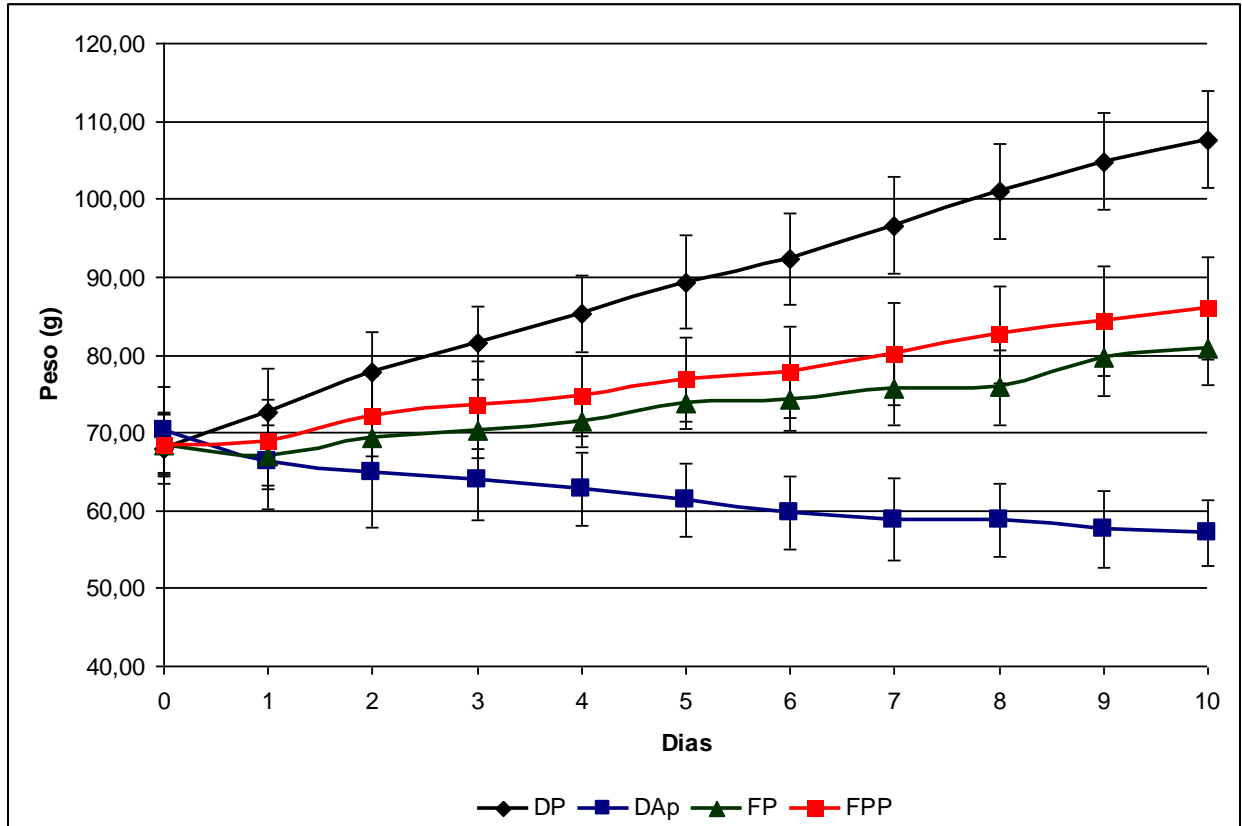


Figura 15. Curvas de crescimento dos ratos alimentados ($n = 6/\text{grupo}$) durante 10 dias com uma dieta à base da fração proteica $F_{0/90}$ obtida por precipitação com sulfato de amônio do EB da farinha delipidada de sementes de *Amburana cearensis* como fonte de proteínas (Dieta FP); outra dieta à base da fração proteica $F_{0/90}$ processada termicamente (Dieta FPP); uma dieta padrão, com a proteína da clara do ovo como fonte de proteína (Dieta DP); e uma dieta aprótica, isenta de proteínas (Dieta DAp).

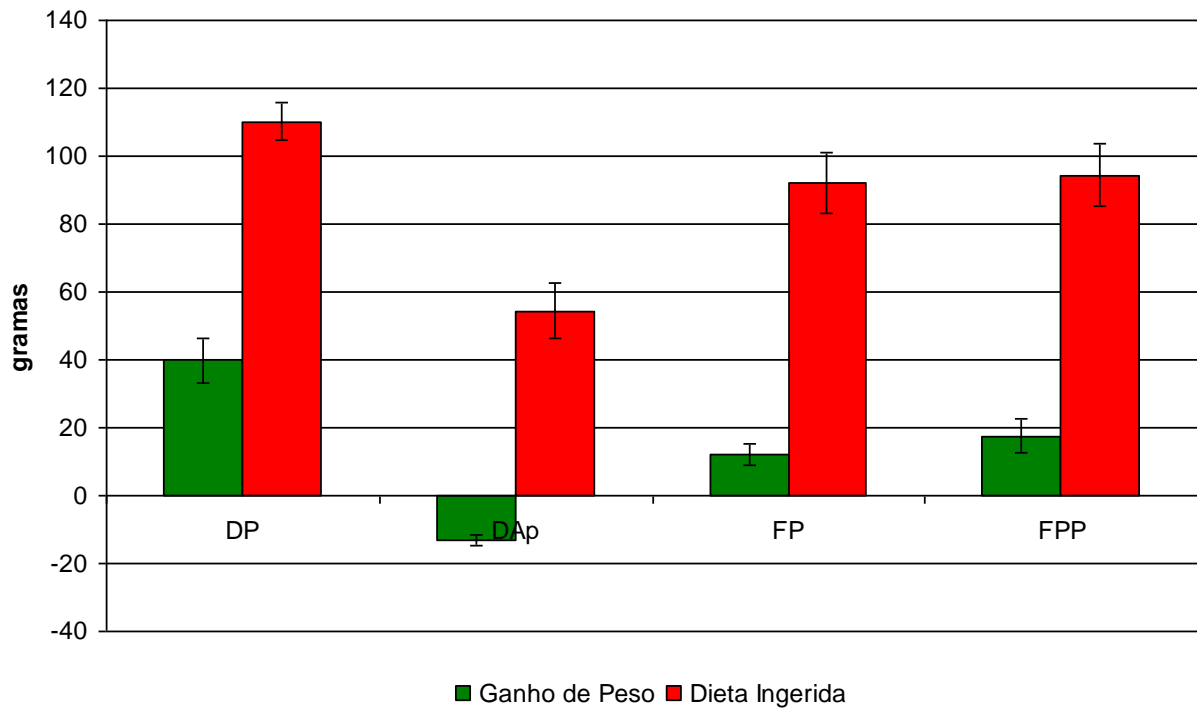


Figura 16. Relação ganho de peso e dieta ingerida dos ratos alimentados ($n = 6/\text{grupo}$) durante 10 dias com uma dieta à base da fração proteica $F_{0/90}$ obtida do EB da farinha delipidada de sementes de *Amburana cearensis* como fonte de proteínas (Dieta FP) e outra dieta à base da fração proteica $F_{0/90}$ processada termicamente (Dieta FPP), comparadas a uma dieta padrão, com a proteína da clara do ovo como fonte de proteína (Dieta DP) e uma dieta aprroteica (Dieta DAp).

5.6.1.3. Balanço Nitrogenado e Parâmetros Nutricionais

Os resultados referentes à quantidade de dieta ingerida, nitrogênio ingerido, excreção fecal e nitrogênio fecal estão mostrados na Tabela 14. Os animais alimentados com a dieta contendo clara do ovo como fonte de proteínas apresentaram o maior consumo de dieta nos últimos cinco dias de experimento ($55,90 \pm 3,19$ g). As ingestões dietéticas dos ratos alimentados com as dietas experimentais (Dieta FP, à base da F_{0/90} como fonte de proteínas; Dieta FPP, à base da F_{0/90} processada termicamente como fonte de proteínas) foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) àquela verificada para o grupo Dieta Padrão. Apesar de apresentar diferença significativa entre a quantidade de dieta ingerida pelo grupo controle (Dieta Padrão) e pelos grupos experimentais, esta diferença não ultrapassou 15% do total ingerido pelo grupo Dieta Padrão. Mesmo com esta diferença de quantidade de dieta ingerida entre o grupo controle e os grupos experimentais, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos para a excreção fecal.

Quanto à quantidade de nitrogênio ingerido durante os últimos cinco dias de experimento pelos animais, o grupo Dieta Padrão ($0,89 \pm 0,05$ g) apresentou uma ingestão de N estatisticamente superior ($p < 0,05$) àquela apresentada pelos grupos Dieta FP ($0,78 \pm 0,07$ g) e Dieta FPP ($0,77 \pm 0,08$ g). No que concerne à quantidade de N excretada nas fezes, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a quantidade excretada pelo grupo Dieta Padrão e pelo grupo Dieta FP. A relação entre a quantidade de fezes excretada e a quantidade de dieta ingerida demonstrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos Dieta Padrão ($18,09 \pm 1,56\%$), Dieta FP ($19,00 \pm 2,54\%$) e Dieta FPP ($18,24 \pm 1,05\%$). Para a relação entre a quantidade de N encontrado nas fezes e a quantidade de N ingerido foi encontrada a mesma semelhança ($p > 0,05$) descrita anteriormente, tendo os grupos Dieta Padrão ($49,28 \pm 4,71\%$), Dieta FP ($51,45 \pm 6,61\%$) e Dieta FPP ($36,73 \pm 2,76$ g) apresentado valores equivalentes ($p > 0,05$). Os ratos alimentados com as dietas experimentais tiveram uma ingestão dietética e, conseqüentemente, de N inferior àquela dos animais alimentados com a dieta padrão, mas perderam N de forma igual nas fezes. Portanto, os animais dos grupos experimentais retiveram menos N no organismo do que os animais do grupo controle.

Na Tabela 15, estão apresentados os valores de digestibilidade, NPU (utilização líquida de proteína) e valor biológico obtidos a partir do ensaio de dez dias de avaliação da qualidade da

fração proteica $F_{0/90}$. Quanto aos valores de digestibilidade, ou seja, a quantidade de proteína obtida da dieta que ficou retida no organismo, o grupo Dieta Padrão ($73,76 \pm 1,42\%$) e o grupo Dieta FPP ($72,50 \pm 2,41\%$) apresentaram valores similares ($p < 0,05$), enquanto o grupo Dieta FP apresentou uma digestibilidade 20% menor do aquela apresentada pelos outros dois grupos. É notório o quanto o tratamento térmico da $F_{0/90}$ melhorou a digestibilidade da dieta à base da fração proteica, igualando-se ($p < 0,05$) àquela apresentada pelos animais alimentados com a dieta à base da proteína animal. Já o NPU traduz para o percentual de nitrogênio, obtido pela dieta, que ficou retido no organismo. O valor de NPU do grupo Dieta Padrão ($73,10 \pm 3,49\%$) foi superior ($p < 0,05$) ao do grupo Dieta FP ($42,70 \pm 2,58\%$) e ao do grupo Dieta FPP ($34,93 \pm 2,44\%$). Apesar da dieta FPP apresentar elevada digestibilidade, a mesma é pouco retida no organismo e aproveitada na síntese biológica de tecidos. O índice valor biológico quantifica e expressa, percentualmente, a fração de nitrogênio absorvida que foi retida pelo organismo consumidor, para o seu crescimento e manutenção. O grupo Dieta Padrão apresentou valor biológico ($99,13 \pm 4,95\%$) superior ($p < 0,05$) ao obtido pelo grupo Dieta FP ($75,10 \pm 10,84\%$) e pelo grupo Dieta FPP ($48,18 \pm 3,01\%$). É notável o elevado valor biológico da dieta FP mesmo que inferior ao da dieta padrão. Embora a dieta FP tenha obtido um baixo valor de digestibilidade e de NPU, foi confirmado pelo valor biológico que este pouco que é digerido é aproveitado pelo organismo em seu crescimento e manutenção.

5.6.1.4. Peso Úmido e Seco Relativo dos Órgãos e Parâmetros Séricos

Na Tabela 16, estão mostrados os valores encontrados para o peso úmido relativo dos órgãos dos animais alimentados com as dietas controles (Dieta Padrão e Dieta Aproteica) e com as dietas experimentais (Dieta FP e Dieta FPP). Os animais do grupo Dieta FP tiveram redução relativa do baço e os do grupo Dieta FPP tiveram redução somente do baço, sendo as involuções descritas semelhantes às detectadas nos animais do grupo Dieta Aproteica ($p > 0,05$). Foi observada também aumento relativo do jejuno e do duodeno do grupo Dieta FP, além de aumento do timo do grupo Dieta FPP, sendo todas as alterações diferentes das mesmas medidas do grupo Dieta Padrão. Já na Tabela 17 está mostrado o peso seco relativo dos órgãos dos mesmos grupos controles e experimentais. Os animais dos grupos experimentais tiveram diminuição do baço semelhantemente aos animais do grupo Dieta Aproteica ($p > 0,05$). Os animais do grupo Dieta FP

tiveram aumento do jejuno semelhantemente aos do grupo Dieta Aprotéica ($p > 0,05$). Portanto, os animais apresentaram reduções e aumentos em alguns órgãos, tanto para o peso úmido quanto para o peso seco relativo, mas nenhuma alteração acentuada foi verificada.

A Tabela 18 apresenta os valores dos parâmetros séricos dos ratos alimentados com as dietas controles (Dieta Padrão e Dieta Aprotéica) e experimentais (Dieta FP e Dieta FPP). Quanto aos valores de proteínas totais, os animais alimentados com as dietas FP ($4,37 \pm 0,17 \text{ g.dL}^{-1}$) e FPP ($4,34 \pm 0,19 \text{ g.dL}^{-1}$) apresentaram valores semelhantes ($p > 0,05$) entre si, mas superiores aos encontrados para o grupo Dieta Aprotéica ($3,94 \pm 0,12 \text{ g.dL}^{-1}$). No entanto, os animais apresentaram um déficit ($p < 0,05$) em relação ao grupo Dieta Padrão ($4,84 \pm 0,21 \text{ g. dL}^{-1}$). Já os níveis de albumina permaneceram similares ($p > 0,05$) tanto para os grupos experimentais (Dieta FP = $3,41 \pm 0,23 \text{ g.dL}^{-1}$ e Dieta FPP = $3,41 \pm 0,15 \text{ g.dL}^{-1}$) quanto para o grupo Dieta Padrão ($3,80 \pm 0,18 \text{ g. dL}^{-1}$). Os animais alimentados com a dieta isenta de proteínas apresentaram níveis de albumina ($2,87 \pm 0,22 \text{ g.dL}^{-1}$) mais baixos ($p < 0,05$) do que o dos demais grupos. Os nível de uréia plasmática dos animais do grupo Dieta Padrão ($10,56 \pm 0,63 \text{ mg.dL}^{-1}$) foi duas vezes menor do que aquele encontrado para o grupo Dieta Aprotéica ($19,35 \pm 1,84 \text{ mg.dL}^{-1}$) e para o grupo Dieta FP ($20,66 \pm 2,71 \text{ mg.dL}^{-1}$), e quase três vezes menor do que aquele do grupo Dieta FPP ($26,36 \pm 3,43 \text{ mg.dL}^{-1}$). Já os níveis de creatinina dos grupos experimentais (Dieta FP = $0,61 \pm 0,06 \text{ mg.dL}^{-1}$ e Dieta FPP = $0,63 \pm 0,03 \text{ mg.dL}^{-1}$) e do grupo Dieta Aprotéica ($0,67 \pm 0,06 \text{ mg.dL}^{-1}$) foram superiores ($p < 0,05$) àqueles dos animais alimentados com dieta à base da clara do ovo ($0,55 \pm 0,03 \text{ mg.dL}^{-1}$). Os níveis das enzimas marcadoras especialmente de toxicidade hepática (Fosfatase alcalina, AST e ALT) estavam para os grupos experimentais em quantidade inferior ou semelhante aos níveis detectados para o grupo Dieta Padrão. Portanto, os parâmetros séricos analisados apontam para diferenças entre os grupos no que diz respeito ao nível de proteínas plasmáticas, creatinina e níveis normais de fosfatase alcalina, AST e ALT. Os níveis aumentados de uréia nos grupos experimentais e no grupo com dieta isenta de proteínas apontam para uma taxa catabólica aumentada.

Tabela 14. Balanço de nitrogênio* dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas experimentais à base da fração proteica F_{0/90} (Dieta FP) e da F_{0/90} processada termicamente, demolho e fervura por 90 min, (Dieta FPP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas, comparados a dieta padrão à base da clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão), calculados para os últimos cinco dias de experimento

Índices	Dietas		
	Padrão	FP	FPP
Dieta Ingerida (D)	55,90 ± 3,19 ^a	48,97 ± 4,67 ^b	47,85 ± 5,29 ^b
Nitrogênio Ingerido (N)	0,89 ± 0,05 ^a	0,78 ± 0,07 ^b	0,77 ± 0,08 ^b
Excreção Fecal (F)	10,11 ± 0,99 ^a	9,33 ± 1,69 ^a	8,70 ± 0,75 ^a
Nitrogênio Fecal (FN)	0,39 ± 0,01 ^a	0,40 ± 0,06 ^a	0,28 ± 0,03 ^b
F/D x 100	18,09 ± 1,56 ^a	19,00 ± 2,54 ^a	18,24 ± 1,05 ^a
FN/N x 100	44,18 ± 2,40 ^a	51,45 ± 6,61 ^a	36,73 ± 2,76 ^a

Média ± desvio padrão. Letras iguais na vertical referem-se a resultados não estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), Teste de Tukey;

* Os valores estão expressos em g/ rato.

Tabela 15. Parâmetros nutricionais obtidos da alimentação de ratos (n=6/grupo) com dietas experimentais à base da fração proteica F_{0/90} (Dieta FP) e da F_{0/90} processada termicamente, demolho e fervura por 90 min, (Dieta FPP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas, comparados a dieta padrão à base da clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão)

Dietas	Digestibilidade (%)	NPU (%)	Valor Biológico (%)
Padrão	73,76 ± 1,42 ^a	73,10 ± 3,49 ^a	99,13 ± 4,95 ^a
FP	57,56 ± 6,61 ^b	42,70 ± 2,58 ^b	75,10 ± 10,84 ^b
FPP	72,50 ± 2,41 ^a	34,93 ± 2,44 ^c	48,18 ± 3,01 ^c

Média ± desvio padrão. Letras iguais na vertical referem-se a resultados não estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), Teste de Tukey.

Tabela 16. Peso úmido relativo (%) dos órgãos dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas experimentais à base da fração proteica F_{0/90} (Dieta FP) e da F_{0/90} processada termicamente, demolho e fervura por 90 min, (Dieta FPP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas e com as dietas controles, uma com a clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão) e outra isenta de proteínas (Dieta Aprroteica)

Órgãos	Dietas			
	Padrão	Aproteica	FP	FPP
Timo	0,41 ± 0,04 ^a	0,23 ± 0,09 ^b	0,34 ± 0,05 ^a	0,57 ± 0,06 ^c
Coração	0,57 ± 0,14 ^a	0,58 ± 0,05 ^a	0,55 ± 0,05 ^a	0,57 ± 0,06 ^a
Pulmões	0,91 ± 0,09 ^a	0,97 ± 0,07 ^a	0,92 ± 0,08 ^a	0,99 ± 0,14 ^a
Baço	0,32 ± 0,03 ^a	0,25 ± 0,02 ^b	0,28 ± 0,02 ^b	0,28 ± 0,02 ^b
Estômago	1,06 ± 0,04 ^a	1,24 ± 0,11 ^b	1,13 ± 0,10 ^{ab}	1,08 ± 0,12 ^a
Duodeno	1,39 ± 0,35 ^a	2,13 ± 0,38 ^b	1,96 ± 0,54 ^{ab}	1,47 ± 0,34 ^a
Jejuno	1,13 ± 0,31 ^a	1,77 ± 0,22 ^b	1,89 ± 0,18 ^b	1,12 ± 0,32 ^a
Íleo	1,28 ± 0,57 ^a	1,27 ± 0,29 ^a	1,45 ± 0,34 ^a	1,16 ± 0,19 ^a
Intestino Grosso	1,42 ± 0,31 ^a	1,73 ± 0,25 ^a	1,42 ± 0,23 ^a	1,57 ± 0,19 ^a
Pâncreas	0,39 ± 0,08 ^a	0,45 ± 0,08 ^a	0,53 ± 0,11 ^a	0,42 ± 0,09 ^a
Fígado	4,95 ± 0,33 ^a	4,72 ± 0,29 ^a	5,01 ± 0,22 ^a	4,82 ± 0,22 ^a
Rins	1,16 ± 0,05 ^a	1,30 ± 0,06 ^b	1,23 ± 0,05 ^{ab}	1,24 ± 0,09 ^{ab}

Os valores são médias ± desvio padrão;

Letras sobrescritas iguais, na mesma linha, referem-se a valores não significativamente diferentes (p>0,05; Teste de Tukey).

Tabela 17. Peso seco relativo (%) dos órgãos dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas experimentais à base da fração proteica F_{0/90} (Dieta FP) e da F_{0/90} processada termicamente, demolho e fervura por 90 min, (Dieta FPP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas e com as dietas controles, uma com a clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão) e outra isenta de proteínas (Dieta Aprroteica).

Órgãos	Dietas			
	Padrão	Aproteica	FP	FPP
Timo	0,28 ± 0,02 ^a	0,19 ± 0,07 ^b	0,25 ± 0,05 ^{ab}	0,25 ± 0,05 ^{ab}
Coração	0,38 ± 0,08 ^a	0,43 ± 0,04 ^a	0,37 ± 0,04 ^a	0,39 ± 0,05 ^a
Pulmões	0,58 ± 0,05 ^a	0,70 ± 0,05 ^b	0,58 ± 0,07 ^a	0,61 ± 0,07 ^{ab}
Baço	0,24 ± 0,03 ^a	0,21 ± 0,01 ^b	0,20 ± 0,01 ^b	0,20 ± 0,02 ^b
Estômago	0,70 ± 0,06 ^a	0,70 ± 0,11 ^a	0,72 ± 0,14 ^a	0,69 ± 0,10 ^a
Duodeno	0,83 ± 0,18 ^a	1,10 ± 0,12 ^a	1,01 ± 0,20 ^a	0,87 ± 0,22 ^a
Jejuno	0,79 ± 0,19 ^a	0,95 ± 0,10 ^{ab}	1,06 ± 0,08 ^b	0,76 ± 0,18 ^a
Íleo	0,77 ± 0,25 ^a	0,72 ± 0,14 ^a	0,76 ± 0,12 ^a	0,76 ± 0,07 ^a
Intestino Grosso	0,91 ± 0,18 ^a	0,97 ± 0,14 ^a	0,83 ± 0,11 ^a	0,95 ± 0,14 ^a
Pâncreas	0,38 ± 0,08 ^a	0,42 ± 0,06 ^a	0,49 ± 0,12 ^a	0,43 ± 0,12 ^a
Fígado	4,77 ± 0,34 ^a	4,51 ± 0,31 ^a	4,79 ± 0,22 ^a	4,64 ± 0,11 ^a
Rins	0,92 ± 0,08 ^a	1,02 ± 0,05 ^a	0,97 ± 0,06 ^a	0,98 ± 0,07 ^a

Os valores são médias ± desvio padrão;

Letras sobrescritas iguais, na mesma linha, referem-se a valores não significativamente diferentes (p>0,05; Teste de Tukey).

Tabela 18. Parâmetros séricos dos ratos (n=6/grupo) alimentados com dietas experimentais à base da fração proteica F_{0/90} (Dieta FP) e da F_{0/90} processada termicamente, demolho e fervura por 90 min, (Dieta FPP) de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas e com as dietas controles, uma com a clara do ovo como fonte de proteínas (Dieta Padrão) e outra isenta de proteínas (Dieta Aprroteica) por um período de 10 dias

Parâmetros analisados	Dietas			
	Padrão	Aprroteica	FP	FPP
Proteínas totais (g. dL ⁻¹)	4,84 ± 0,21 ^a	3,94 ± 0,12 ^b	4,37 ± 0,17 ^c	4,34 ± 0,19 ^c
Albumina (g. dL ⁻¹)	3,80 ± 0,18 ^a	2,87 ± 0,22 ^b	3,41 ± 0,23 ^a	3,41 ± 0,15 ^a
Uréia (mg. dL ⁻¹)	10,56 ± 0,63 ^a	19,35 ± 1,84 ^b	20,66 ± 2,71 ^b	26,36 ± 3,43 ^c
Creatinina (mg. dL ⁻¹)	0,55 ± 0,03 ^a	0,67 ± 0,06 ^b	0,61 ± 0,06 ^c	0,63 ± 0,03 ^c
Fosfatase Alcalina (U. L ⁻¹)	133,36 ± 13,03 ^a	181,97 ± 16,29 ^b	111,49 ± 9,89 ^c	102,81 ± 9,90 ^c
AST* (U. mL ⁻¹)	218,07 ± 5,12 ^a	180,97 ± 19,59 ^b	210,21 ± 11,23 ^a	195,88 ± 16,72 ^{ab}
ALT** (U. mL ⁻¹)	114,73 ± 5,33 ^a	104,53 ± 8,20 ^b	112,08 ± 5,37 ^a	105,73 ± 4,79 ^a

Os valores são médias ± desvio padrão;

Letras sobrescritas iguais, na mesma linha, referem-se a valores não significativamente diferentes (p>0,05; Teste de Tukey).

* AST: Aspartato aminotransferase.

** ALT: Alanina aminotransferase.

PARTE II. BIOATIVIDADE DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE *A. cearensis* CONTRA PATÓGENOS E VETORES DE DOENÇAS

5.7. Bioatividade do EB, das Globulinas e das Albuminas

De acordo com o resultado de obtenção das principais classes de proteínas das sementes de *A. cearensis* mostrado anteriormente na Tabela 5 e na Figura 11, globulinas e albuminas caracterizam-se como as classes de maior abundância e diversidade de proteínas. Devido a estas características e conhecendo-se determinadas funções metabólicas destas classes proteicas no vegetal, globulinas e albuminas juntamente ao extrato bruto (EB) foram avaliados quanto à presença de atividade inibitória do crescimento bacteriano (5 cepas), inibitória do crescimento de leveduras (4 cepas), inibitória da germinação de esporos e do crescimento de fungos fitopatogênicos (11 espécies) e, ainda, atividade inibitória da eclosão de ovos e larvicida contra *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*. As globulinas e as albuminas foram avaliadas em concentração única de 10 mg de proteínas. mL⁻¹ e o EB foi avaliado na concentração de 27,34 ± 0,97 mg de proteínas. mL⁻¹.

5.7.1. Atividade Inibitória do Crescimento Bacteriano em Meio Líquido

Na Figura 17, estão mostradas as curvas de crescimento das cepas Gram-positivas, *B. subtilis* e *S. aureus*, e das Gram-negativas, *K. pneumoniae*, *P. Aeruginosa* e *S. choleraesuis*, na presença do EB (2,73 mg de proteínas), das globulinas (1,0 mgP) e das albuminas (1,0 mgP), de BSA (1,0 mgP), do controle negativo (C -) e do controle positivo (C +). O EB estimulou o crescimento de todas as cepas bacterianas, apresentando leituras de absorbâncias maiores do que aquelas do C -. A BSA proporcionou um crescimento das cepas similarmente ao promovido pelo C-. Por outro lado, as globulinas, da mesma forma que o C +, inibiram completamente o crescimento de *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Já as albuminas inibiram eficientemente o crescimento das cepas Gram-negativas, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, também igual ao C +. Provavelmente, proteínas antibacterianas atuaram na inibição do crescimento das cepas susceptíveis às classes proteicas. Somente o C + inibiu o crescimento de *S. choleraesuis*.

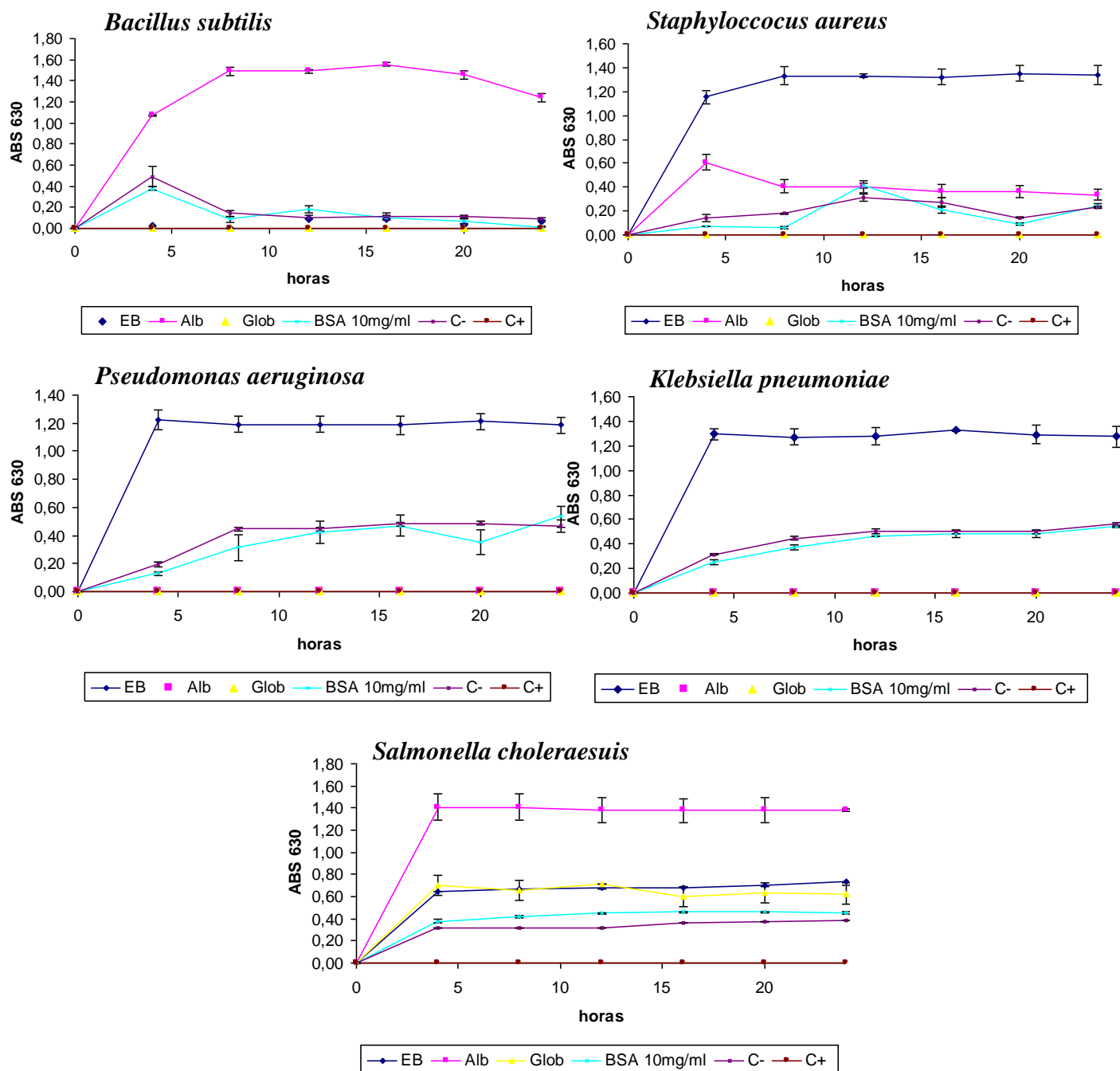


Figura 17. Curvas de crescimento de cinco cepas bacterianas crescidas em caldo nutritivo, contendo o extrato bruto de sementes de *Amburana cearensis* (EB = 2,73 mgP), albuminas (Alb = 1,0 mgP), globulinas (Glob = 1,0 mgP), BSA (1,0 mgP), água (C -) e formol 0,4 % (C +). Os valores do coeficiente de variação para cada ponto foram $\leq 10\%$.

5.7.2. Atividade Inibitória do Crescimento de Leveduras em Meio Líquido

Na Figura 18, estão mostradas as curvas de crescimento das leveduras *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *P. anomala* na presença do EB (2,73 mg de proteínas), das globulinas (1,0 mgP) e das albuminas (1,0 mgP), de BSA (1,0 mgP), do controle negativo (C -) e do controle positivo (C +). O EB inibiu apenas o crescimento de *C. tropicalis*, enquanto as globulinas e as albuminas inibiram de forma bastante eficaz o crescimento de todas as leveduras, por vezes de forma semelhante ao C+. No geral, a BSA proporcionou crescimento às leveduras de forma semelhante ao C -. Portanto, há fortes indícios para a presença de atividade inibitória do crescimento de leveduras de natureza proteica nas sementes de *A. cearensis*.

5.7.3. Atividade Inibitória da Germinação dos Esporos de Fungos Filamentosos – “Ensaio da Gota”

As classes proteicas obtidas de sementes de *A. cearensis*, as globulinas (0,2 mgP) e as albuminas (0,2 mgP) não inibiram a germinação dos esporos de nenhum dos seguintes fungos fitopatogênicos: *A. fumigatus*, *A. niger*, *C. musae*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *P. herguei* e *R. solani*. No entanto, como mostrado na Figura 19, somente o EB inibiu a germinação dos esporos de *P. herguei* até uma concentração de 0,62 mgSST. mL⁻¹, apontando para uma atividade de natureza não-proteica.

5.7.4. Atividade Inibitória do Crescimento de Fungos Filamentosos em Meio Líquido

Na Figura 20, estão mostradas as curvas de crescimento dos fungos filamentosos *A. fumigatus*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *P. herguei* e *R. solani* crescidos na presença do EB (2,73 mgP), das albuminas (1,0 mgP), das globulinas (1,0 mgP), de BSA (1,0 mgP), do controle negativo (C -) e do controle positivo (C +). No geral, o EB inibiu o crescimento dos fungos apenas nas primeiras 24 h, permitindo e, muitas vezes, estimulando o crescimento dos fungos após este período. Em alguma magnitude, as globulinas foram capazes de inibir o crescimento de todos os fungos avaliados. Já as albuminas foram eficientes em inibir o crescimento de *A.*

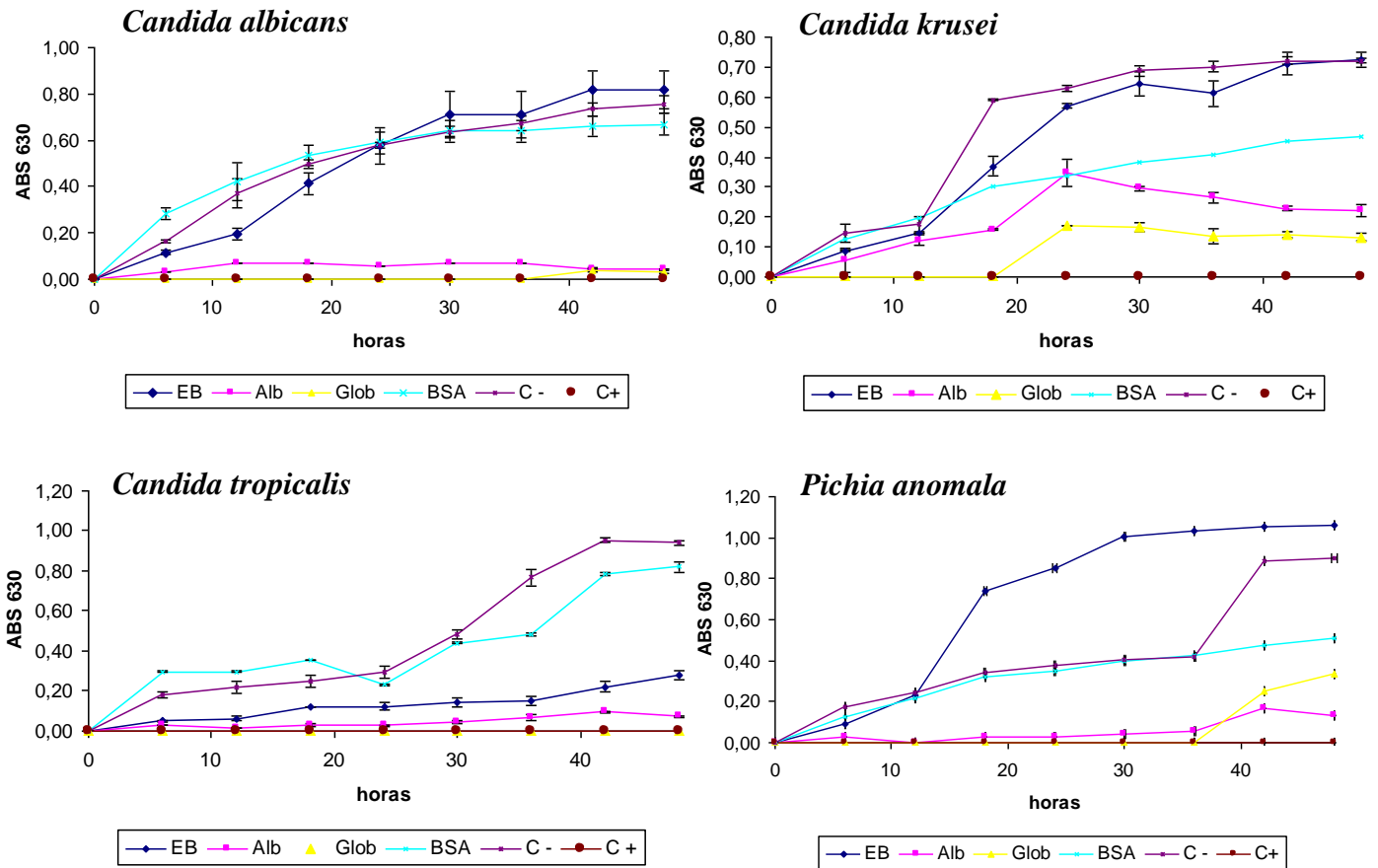


Figura 18. Curvas de crescimento de quatro leveduras crescidas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), pH 5,0, contendo o extrato bruto de sementes de *Amburana cearensis* (EB = 2,73 mgP), albuminas (Alb = 1,0 mgP), globulinas (Glob = 1,0 mgP), BSA (1,0 mgP), água (C -) e formol 0,4 % (C +). Os valores do Coeficiente de Variação para cada ponto foram $\leq 10\%$.

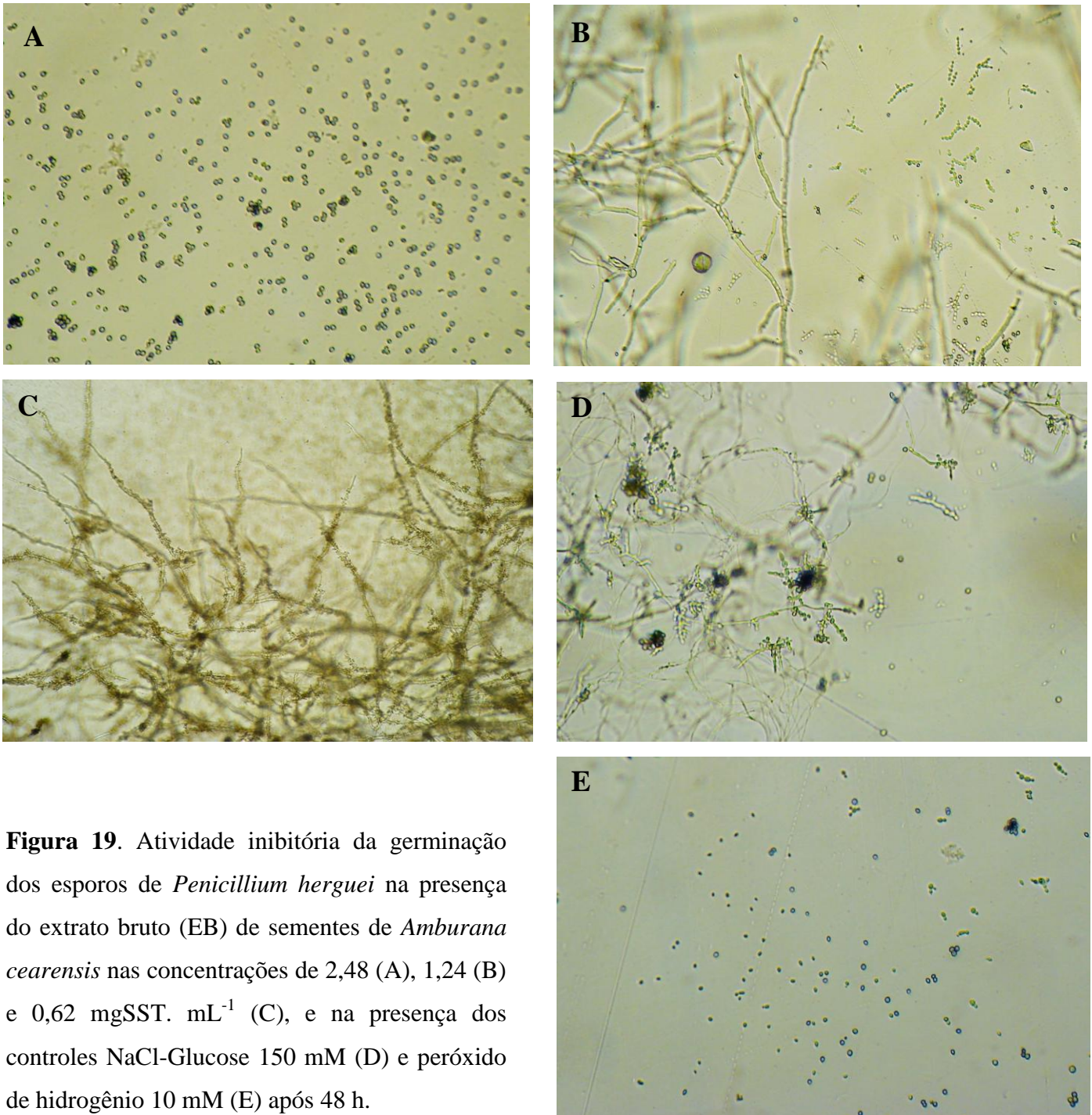


Figura 19. Atividade inibitória da germinação dos esporos de *Penicillium herquei* na presença do extrato bruto (EB) de sementes de *Amburana cearensis* nas concentrações de 2,48 (A), 1,24 (B) e 0,62 mgSST. mL⁻¹ (C), e na presença dos controles NaCl-Glucose 150 mM (D) e peróxido de hidrogênio 10 mM (E) após 48 h.

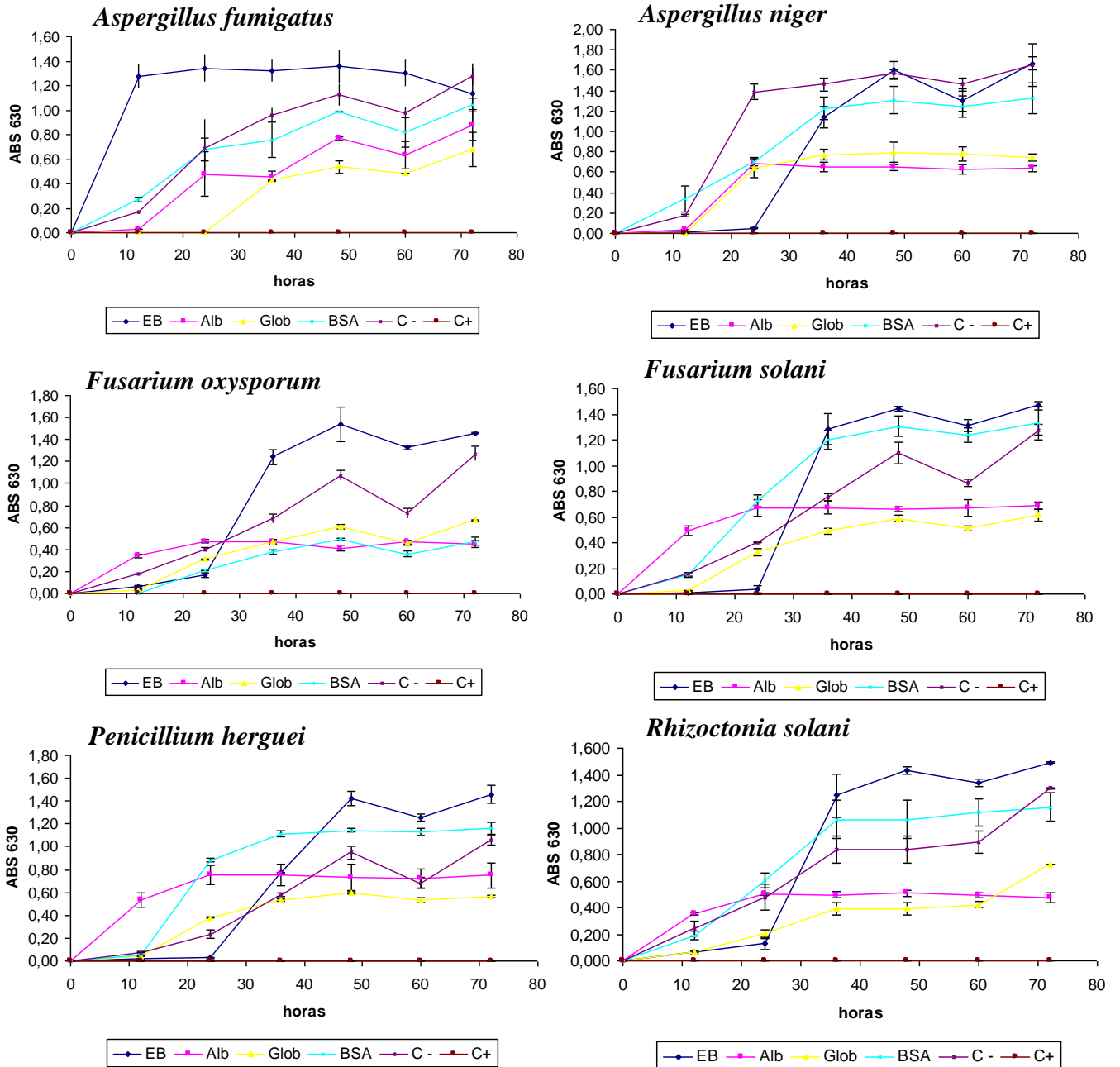


Figura 20. Curvas de crescimento de seis fungos filamentosos crescidos em caldo YPD (*Yeast Potato Dextrose*), contendo o extrato bruto de sementes de *Amburana cearensis* (EB = 2,73 mgP), albuminas (Alb = 1,0 mgP), globulinas (Glob = 1,0 mgP), BSA (1,0 mgP), água (C -) e peróxido de hidrogênio 10 mM (C +). Os valores do coeficiente de variação para cada ponto foram $\leq 10\%$.

fumigatus, *A. niger*, *F. oxysporum* e *R. solani*. A BSA proporcionou crescimento aos fungos de forma semelhante ao C -. Mais uma vez, proteínas de sementes de *A. cearensis* estão potencialmente envolvidas em inibir o crescimento de microorganismos, neste caso de fungos filamentosos.

5.7.5. Atividade Inibitória do Crescimento de Fungos Filamentosos em Meio Sólido

Ao contrário dos resultados apresentados para o ensaio de inibição do crescimento de fungos filamentosos em meio líquido, as classes proteicas obtidas de sementes de *A. cearensis*, as globulinas (3,0 mgP) e as albuminas (3,0 mgP), não inibiram o crescimento de nenhum dos seguintes fungos filamentosos: *A. niger*, *A. fumigatus*, *C. gloesporioides*, *C. musae*, *C. truncatum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. virguliformes*, *L. theobromae*, *Mucor* sp., *Neurospora* sp., *P. oligandrum*, *Phomopsis* sp. e *R. solani*. O EB (8,24 mgP) tampouco inibiu o crescimento de nenhuma das espécies mencionadas. Na Figura 21, está mostrada a ausência de atividade do EB, das globulinas e das albuminas e o halo de inibição do C + (nistatina) perante o crescimento micelial de *A. niger*.

5.7.6 Atividade Inibitória da Eclosão dos Ovos de *Aedes aegypti* e *Ae. Albopictus*

Nas Tabelas 19 e 20, estão mostrados os efeitos do EB (27,34 mgP. mL⁻¹) e das classes proteicas, albumina (10 mgP. mL⁻¹) e globulina (10 mgP. mL⁻¹), de sementes de *A. cearensis* e do controle negativo sobre a eclosão dos ovos e sobrevivência de larvas em 1º estágio de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* respectivamente. Somente o EB foi capaz de inibir significativamente ($p < 0,05$) a eclosão dos ovos de *A. aegypti* ($44,0 \pm 2,0$ %) e *Ae. albopictus* ($24,0 \pm 3,61$ %). Além das albuminas e globulinas não inibirem a eclosão dos ovos de *Ae. aegypti*, estas fizeram foi estimular significativamente ($p < 0,05$) a eclosão dos ovos de *Ae. albopictus*. Apesar das albuminas não inibirem a eclosão dos ovos de ambas as espécies, estas conseguiram causar 100 % de mortalidade das larvas que emergiram dos ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, sendo o mesmo resultado apresentado pelo EB. Já as globulinas causaram apenas uma baixa mortalidade das larvas em 1º estágio de *Ae. aegypti* ($8,11 \pm 1,64$ %) e *Ae. albopictus* ($13,33 \pm 2,31$ %).

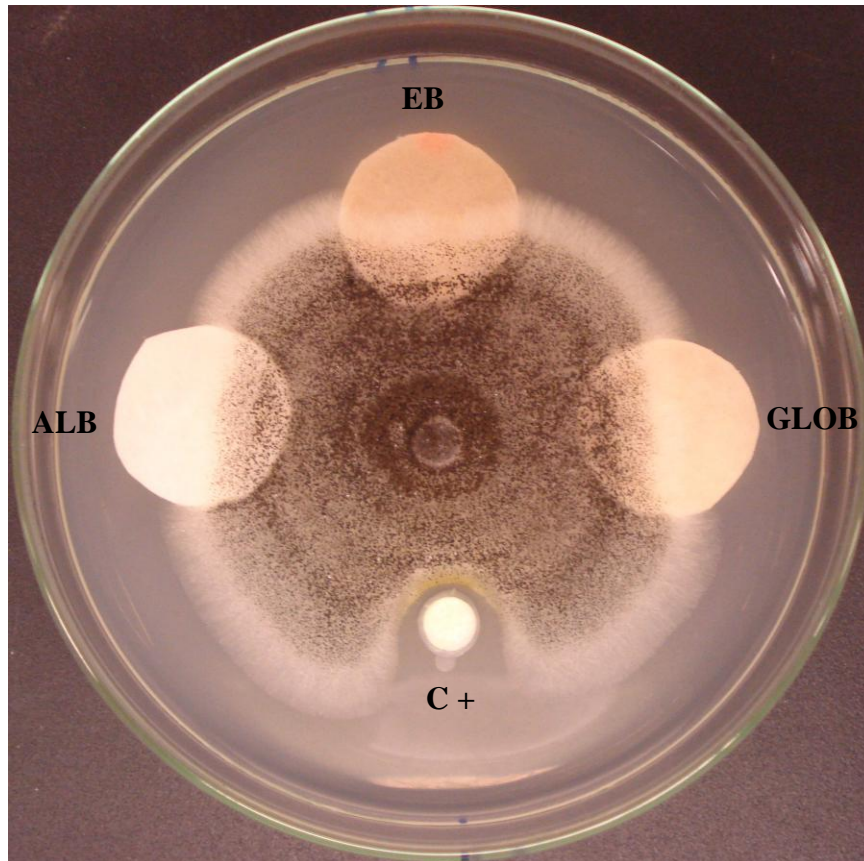


Figura 21. Crescimento em agar batata do fungo filamentoso fitopatogênico *Aspergillus niger* na presença do extrato bruto (EB) de sementes de *Amburana cearensis* (EB = 8,24 mgP), albuminas (Alb = 3,0 mgP), globulinas (Glob = 3,0 mgP) e nistatina (C+) após 24 h.

5.7.7. Atividade Larvicida contra *Aedes aegypti* e *Ae. Albopictus*

Na Tabela 21, estão mostrados os resultados do ensaio de atividade larvicida contra *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* do EB (27,34 mgP. mL⁻¹) e das classes proteicas, albumina (10 mgP. mL⁻¹) e globulina (10 mgP. mL⁻¹), de sementes de *A. cearensis* e do controle negativo. Somente o EB foi capaz de causar 100 % de mortalidade das larvas em 3º estágio de *A. aegypti* (CL₅₀ 0,84 ± 0,03 mg. mL⁻¹) e *Ae. albopictus* (CL₅₀ 0,84 ± 0,03 mg. mL⁻¹). As albuminas foram capazes de causar apenas 18,33 ± 2,89 % de mortalidade das larvas em 3º estágio de *Ae. aegypti*, não causando nenhuma mortalidade das larvas de *Ae. albopictus*. As globulinas não causaram mortalidade das larvas em 3º estágio de nenhuma das espécies utilizadas.

5.8. Obtenção e Bioatividade das Frações Proteicas 0-70 (F_{0/70}) e F 70-90 (F_{70/90})

De acordo com resultados obtidos dos ensaios de bioatividade do EB e das classes proteicas, globulina e albumina, contra os microorganismos patogênicos, as albuminas foram selecionadas devido a sua boa atividade contra as leveduras e contra os fungos filamentosos em meio líquido e, ainda, seu menor número de bandas proteicas (Figura 11) e, aparentemente, maior facilidade para prosseguir na purificação da(s) proteína(s) bioativa(s). O esquema de obtenção das frações proteicas 0-70 e 70-90 % de saturação de sulfato de amônio das albuminas derivadas do EB de sementes de *A. cearensis* está mostrado na Figura 9. A partir de 25 mL do EB foram obtidos 0,35 g de F_{0/70} e 0,05 g de F_{70/90}. Ambas as frações foram ressuspendidas com o tampão de extração (Fosfato de Sódio 50 mM, pH 7,0) para uma concentração de 1,0 mg. mL⁻¹ e avaliadas juntamente as albuminas (10 mg de proteínas. mL⁻¹) nos ensaios de inibição do crescimento em meio líquido contra leveduras e fungos filamentosos.

Tabela 19. Efeitos do extrato aquoso bruto e das frações proteicas albumina e globulina das sementes de *Amburana cearensis* sobre a eclosão dos ovos e sobrevivência de larvas em 1º estágio de *Aedes aegypti* após 72 h de exposição.

Amostras	Número de ovos	Número de eclosões	% Eclosão*	Número de larvas vivas	Número de larvas mortas	% Mortalidade**
Tampão Fosfato de Sódio	100	85		85	0	
50 mM, pH 7,0 +	100	90	85,00 ± 5,00 ^{a,c}	90	0	-
1% etanol	100	80		80	0	
Extrato Bruto	100	46		0	46	
(27,34 mg proteínas. mL ⁻¹)	100	44	44,00 ± 2,00 ^b	0	44	100,00 ± 0,00 ^a
¹⁾	100	42		0	42	
Albuminas	100	83		0	83	
(~10 mg proteínas. mL ⁻¹)	100	78	78,33 ± 4,51 ^c	0	78	100,00 ± 0,00 ^a
	100	74		0	74	
Globulinas	100	90		84	6	
(~10 mg proteínas. mL ⁻¹)	100	90	90,33 ± 0,58 ^a	83	7	8,11 ± 1,64 ^b
	100	91		82	9	

* Média ± desvio padrão do número de eclosões;

** Média ± desvio padrão do número de larvas mortas/ número de eclosões x 100;

Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa (Teste de Tukey; p < 0,05).

Tabela 20. Efeitos do extrato bruto e das frações proteicas albumina e globulina de sementes de *Amburana cearensis* sobre a eclosão dos ovos e sobrevivência de larvas em 1º estágio de *Aedes albopictus* após 72 h de exposição.

Amostras	Número de ovos	Número de eclosões	% Eclosão*	Número de larvas vivas	Número de larvas mortas	% Mortalidade**
Tampão Fosfato de Sódio	100	51		51	0	
50 mM, pH 7,0 +	100	40	44,67 ± 5,69 ^a	40	0	-
1% etanol	100	43		43	0	
Extrato Bruto	100	27		0	27	
(27,34 mg proteínas. mL ⁻¹)	100	20	24,00 ± 3,61 ^b	0	20	100,00 ± 0,00 ^a
1)	100	25		0	25	
Albuminas	100	61		0	61	
(~10 mg proteínas. mL ⁻¹)	100	85	72,12 ± 7,50 ^c	0	85	100,00 ± 0,00 ^a
	100	70		0	70	
Globulinas	100	67		51	16	
(~10 mg proteínas. mL ⁻¹)	100	61	64,33 ± 3,06 ^c	49	12	13,33 ± 2,31 ^b
	100	65		53	12	

* Média ± desvio padrão do número de eclosões;

** Média do número de larvas mortas/ número de eclosões x 100;

Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa (Teste de Tukey; p < 0,05).

Tabela 21. Efeitos do extrato bruto e das frações proteicas albumina e globulina das sementes de *Amburana cearensis* sobre larvas em 3º estágio de *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* após 24 h de exposição.

Amostras	<i>Aedes aegypti</i>				<i>Aedes albopictus</i>			
	Número de larvas	Larvas mortas	% Mortalidade *	CL ₅₀ (mg. mL ⁻¹)	Número de larvas	Larvas mortas	% Mortalidade	CL ₅₀ (mg. mL ⁻¹)
Tampão Fosfato de Sódio 50 mM, pH 7,0	20	0			20	0		
	20	0	-	-	20	0	-	-
	20	0			20	0		
	20	20			20	20		
Extrato Bruto (27,34 mg proteínas. mL ⁻¹)	20	20	100,00 ± 0,00 ^a	0,84 ± 0,02	20	20	100,00 ± 0,00 ^a	0,84 ± 0,03
	20	20			20	20		
Albuminas (~10 mg proteína. mL ⁻¹)	20	4			20	0		
	20	4	18,33 ± 2,89 ^b	-	20	0	-	-
	20	3			20	0		
Globulinas (~10 mg proteína. mL ⁻¹)	20	0			20	0		
	20	0	-	-	20	0	-	-
	20	0			20	0		

* Média ± desvio padrão do número de larvas mortas/ número de larvas x 100;

Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa (*t*-Student; $p < 0,05$).

5.9. Atividade Inibitória do Crescimento de Leveduras e Fungos Filamentosos pela F_{0/70} e F_{70/90} em Meio Líquido

Na Figura 22, estão mostradas as curvas de crescimento dos fungos filamentosos *A. fumigatus*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *P. herguei* e *R. solani* crescidos na presença das albuminas (1,0 mgP), da F_{0/70} (0,33 mgP), da F_{70/90} (0,28 mgP), do controle negativo (C -) e do controle positivo (C +). As albuminas persistiram em sua atividade inibitória do crescimento contra todos os fungos filamentosos avaliados, sendo um pouco menos ativa contra *A. fumigatus*. A F_{70/90} apresentou potente atividade inibitória do crescimento de todos os fungos filamentosos avaliados. Já F_{0/70} inibiu apenas de forma discreta o crescimento de *A. niger*, *A. fumigatus* e *R. solani*.

Na Figura 23, estão mostradas as curvas de crescimento das leveduras *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *P. anomala* crescidos na presença das albuminas (1,0 mgP), da F_{0/70} (0,33 mgP), da F_{70/90} (0,28 mgP), do controle negativo (C -) e do controle positivo (C +). No geral, as albuminas persistiram em sua excelente atividade inibitória do crescimento das leveduras utilizadas. A F_{70/90} inibiu, em menor magnitude do que as albuminas, o crescimento de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *P. anomala*. A F_{0/70} inibiu, de forma semelhante a F_{70/90}, as leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis* e *P. anomala*. Portanto, o fracionamento das albuminas em F_{0/70} e F_{70/90} não foi vantajoso em concentrar o princípio responsável pela atividade inibitória do crescimento de leveduras. Por outro lado, este fracionamento das albuminas potencializou a atividade inibitória do crescimento dos fungos filamentosos na F_{70/90}, apontando para esta fração como fonte de proteína(s) antifúngica(s).

5.10. Perfil Eletroforético da F_{0/70} e da F_{70/90} em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)

Na Figura 24, estão mostrados os perfis eletroforéticos obtido em condições desnaturantes (presença de SDS 2% e β -mercaptoetanol 2,5%) do extrato bruto (EB), da F_{0/70} e da F_{70/90} obtidas das albuminas de sementes de *A. cearensis*. No EB, como já mostrado anteriormente, há uma predominância de bandas proteicas de alta massa molecular (> 45,0 kDa) A F_{0/70} apresenta uma grande diversidade de bandas proteicas, apresentando bandas majoritárias com massas moleculares relativas em torno de 66,2 e 31,0 kDa. A F_{70/90} repete este padrão, apresentando

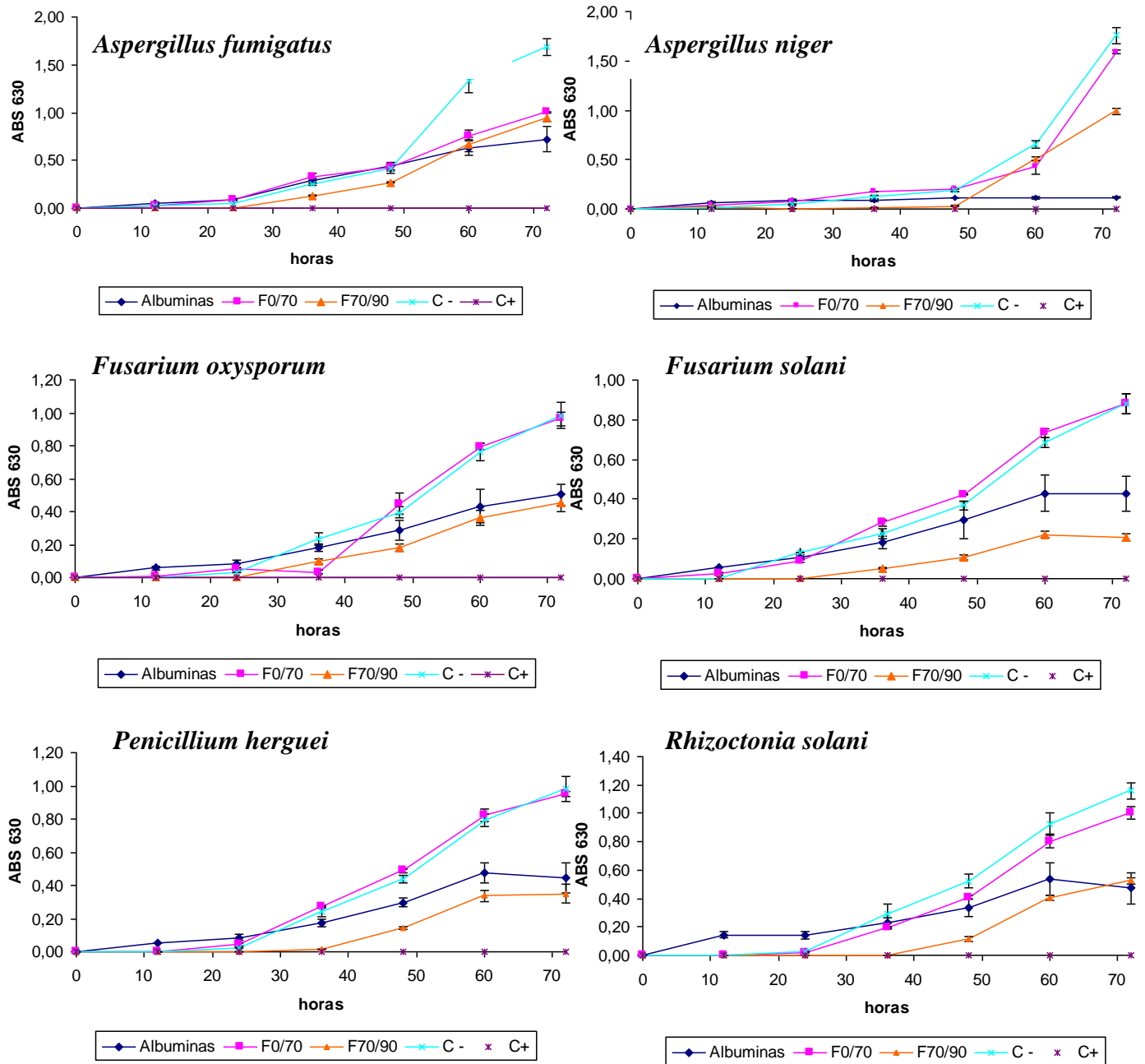


Figura 22. Curvas de crescimento de seis fungos filamentosos crescidos em caldo YPD (*Yeast Potato Dextrose*), contendo as albuminas (1,0 mgP) obtidas do EB de sementes de *Amburana cearensis*, a F_{0/70} (0,33 mgP), F_{70/90} (0,28 mgP), solução-tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 (C -) e peróxido de hidrogênio 10 mM (C +). Os valores do coeficiente de variação para cada ponto foram $\leq 10\%$.

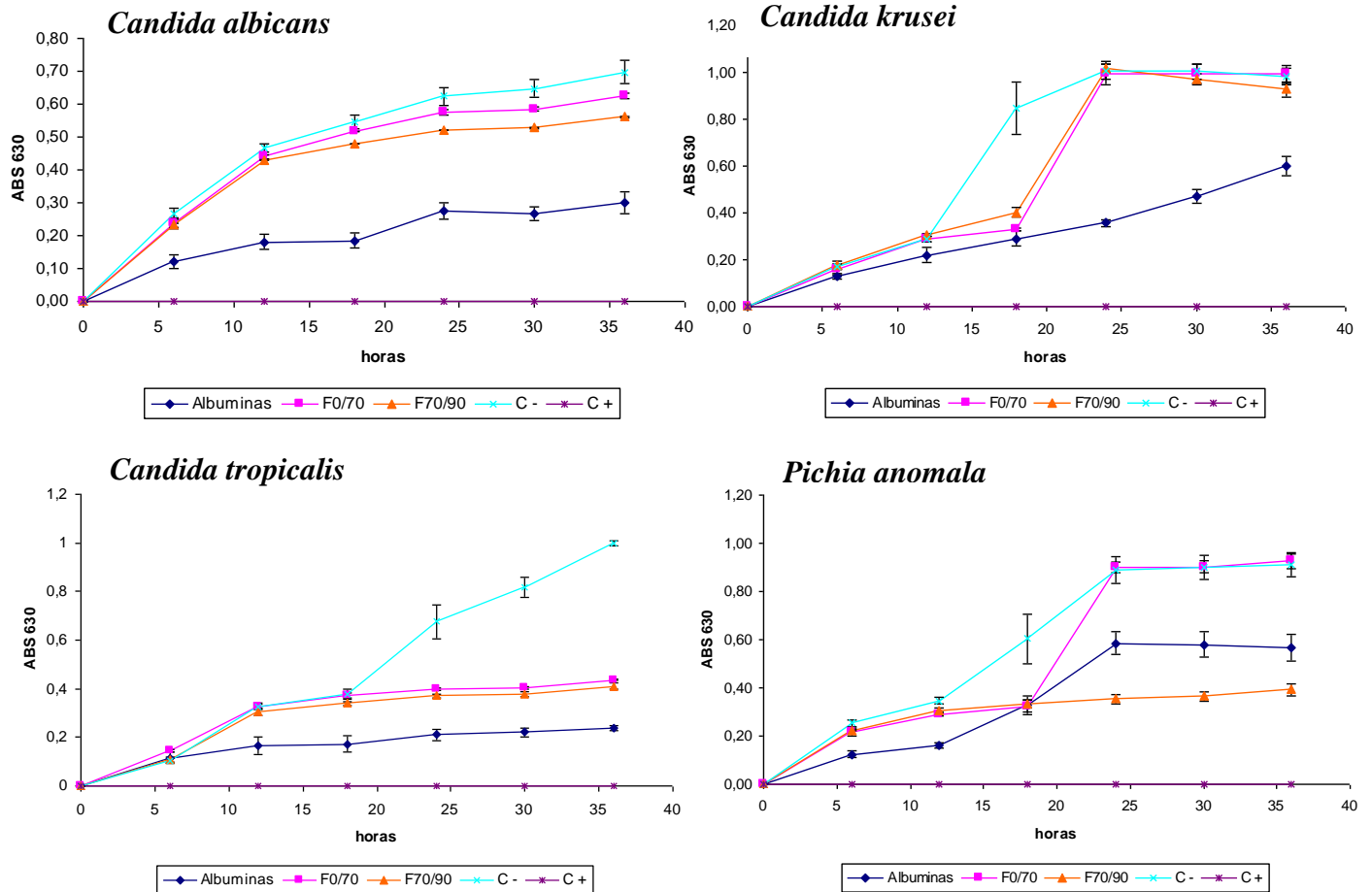


Figura 23. Curvas de crescimento de quatro leveduras crescidas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), pH 5,0, contendo as albuminas (1,0 mgP) obtidas do EB de sementes de *Amburana cearensis*, a F_{0/70} (0,33 mgP), F_{70/90} (0,28 mgP), solução-tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 (C -) e formol 0,4 % (C +). Os valores do Coeficiente de Variação para cada ponto foram \leq 10%.

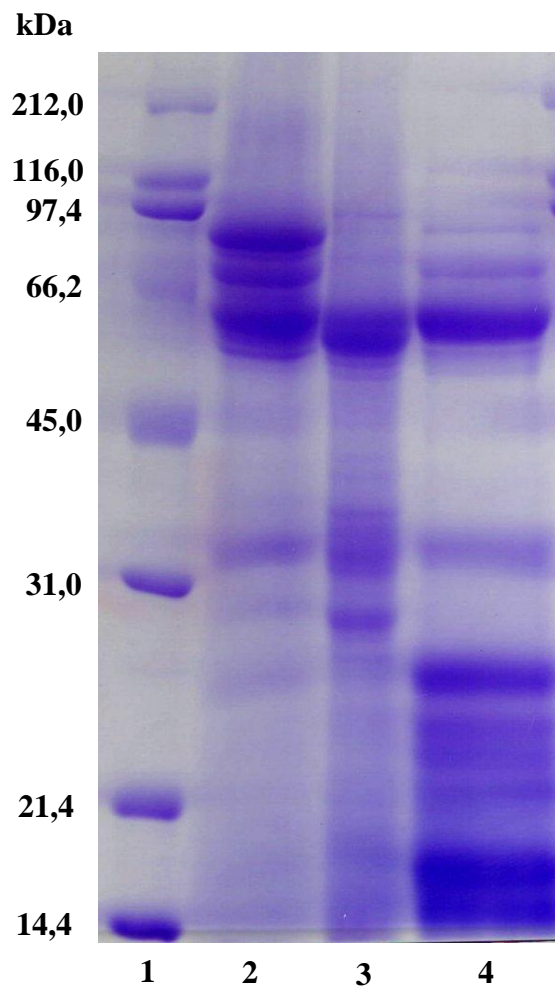


Figura 24. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS (2,0%) e β -mercaptoetanol (2,5%) do extrato bruto (EB) e das frações proteicas F_{0/70} e F_{70/90} derivadas das albuminas obtidas a partir da farinha de sementes de *Amburana cearensis*. Em cada poço foram aplicados 50 μ gP de cada amostra. 1). Marcadores de massa molecular: lisozima (14,4 kDa), inibidor de tripsina da soja (21,4 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), β -galactosidase (116 kDa) e miosina (216 kDa); 2) EB; 3) F_{0/70}; e 4) F_{70/90}.

bandas proteicas com massas moleculares relativas em torno de 66,2 e 31,0 kDa e, ainda, bandas de baixa massa (< 31,0 kDa) bem mais concentradas.

5.11. Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de Resource Q Acoplada a Sistema de FPLC

A fração proteica F_{70/90} obtida por precipitação com sulfato de amônio das albuminas de sementes de *A. cearensis* foi injetada em coluna aniônica (Resource Q) acoplada a sistema de FPLC, resultando em quatro frações proteicas. O PNR (pico não-retido) corresponde ao material que não se ligou a matriz aniônica, provavelmente proteínas peculiarmente ricas em cargas positivas. PRI (pico retido I), PRII (pico retido II) e PRIII (pico retido III) correspondem ao material eluído com tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0), contendo 0,1 M, 0,2 e 1,0 M de NaCl, respectivamente. O perfil de eluição destes picos está mostrado na Figura 25.

5.11.1. Perfil Eletroforético dos Picos Obtidos da Cromatografia de Troca Iônica em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)

Os perfis eletroforéticos das proteínas presentes nos picos obtidos com a coluna aniônica estão mostrados na Figura 26. Para todos os picos obtidos há predominância de bandas proteicas, com massas moleculares por volta de 45,0 a 66,2 kDa. Além disso, no PNR é visualizada fracamente uma banda com massa molecular por volta de 21,4 kDa e no PRII uma banda com massa molecular logo acima de 31,0 kDa.

|

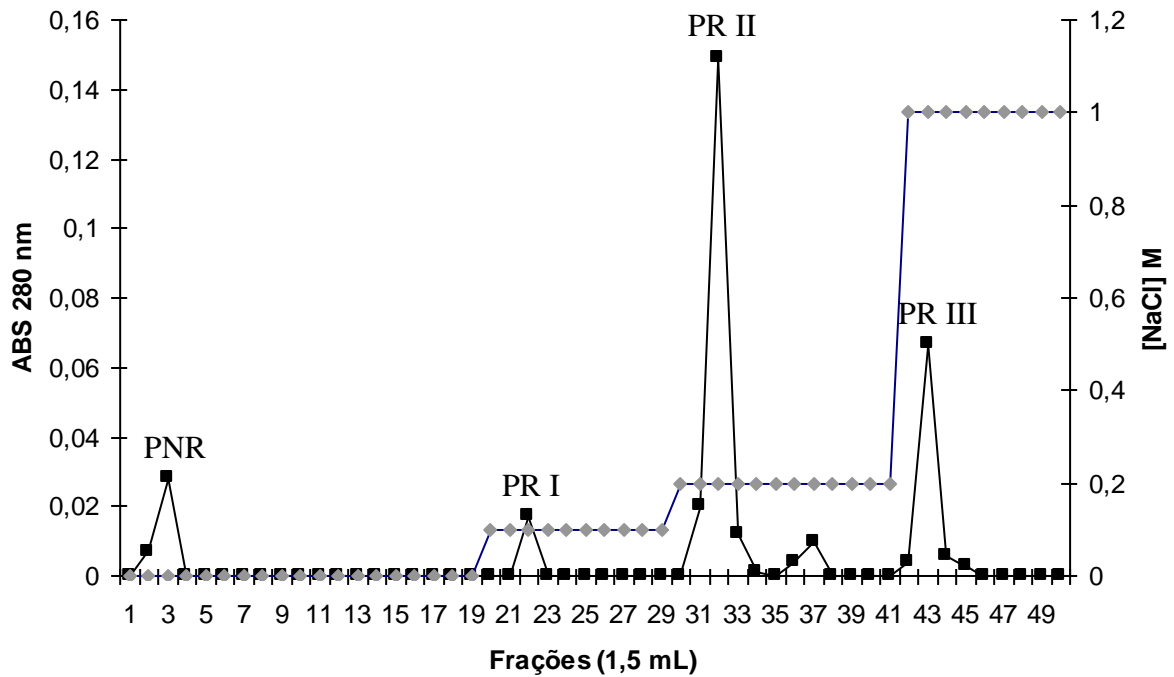


Figura 25. Cromatografia de troca-iônica em coluna aniônica (Resource Q) da fração 70/90 (10 mgP) obtida por precipitação com sulfato de amônio das albuminas das sementes de *Amburana cearensis*. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. O material que não interagiu com a coluna está contido no PNR (pico não-retido). PRI, PRII e PRIII foram eluídos com tampão de equilíbrio contendo 0,1 M, 0,2 M e 1,0 M de NaCl, respectivamente.

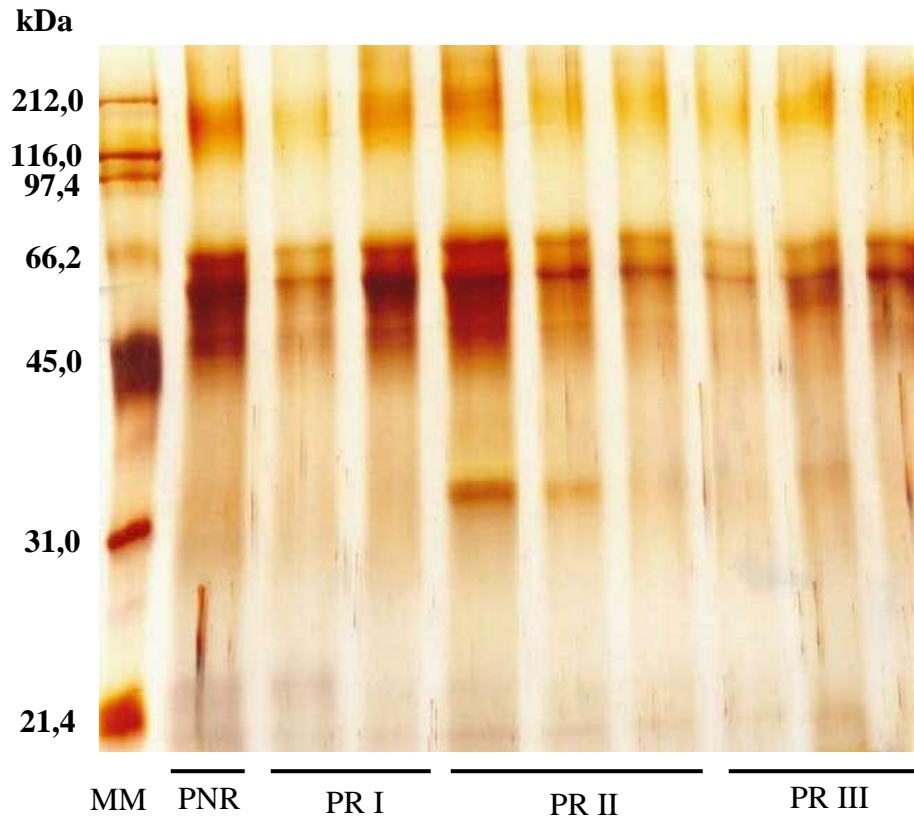


Figura 26. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS (2,0%) e β -mercaptoetanol (2,5%) revelada com nitrato de prata das frações proteicas obtidas de F_{70/90} em coluna de Resource Q. Em cada poço foram aplicados 5 μ gP de cada amostra. MM = marcadores de massa molecular: lisozima - 14,0 kDa, inibidor de tripsina da soja - 21,4/19,7 kDa (duplo), anidrase carbônica - 31,0 kDa, ovalbumina - 45,0 kDa, albumina sérica bovina - 66,2 kDa, fosforilase B - 97,4, β -galactosidase - 116 kDa, miosina - 212 kDa; PNR: pico não-retido; PRI: pico retido I eluído com NaCl 0,1 M; PII: pico retido II eluído com NaCl 0,2 M; PRIII: pico retido III com NaCl 1,0 M.

6. DISCUSSÃO

As sementes de *A. cearensis*, obtidas a partir do banco de sementes encontrado no solo da Caatinga, apresentaram umidade residual de $13,52 \pm 0,26 \text{ g.100g}^{-1}$. Onwuliri e Obu (2002) encontraram valores de umidade para sementes de *Vigna unguiculata* ($6,14 \pm 0,29$ a $8,92 \pm 2,20 \text{ g.100g}^{-1}$) e *Phaseolus vulgaris* ($4,23 \pm 0,74$ e $4,42 \pm 0,70 \text{ g.100g}^{-1}$) bem inferiores aos detectados para *A. cearensis*. Senna, Sridhar, Jung (2005) detectaram umidade de $9,18 \pm 0,13 \text{ g.100g}^{-1}$ nas sementes de *Canavalia cathartica*, um legume indiano não-cultivado. Apesar da elevada umidade apresentada pelas sementes de *A. cearensis* quando comparada a outras leguminosas, isto não parece comprometer a qualidade das sementes caso sejam submetidas a longos períodos de estocagem. De acordo com Puzzi (2000) e Weber (2001), sementes de soja devem ser estocadas com umidade variando de 11 a 14% a fim de não promover a proliferação de microrganismos e ocorrência de reações hidrolíticas que possam levar à perda do valor nutritivo das sementes. Visto que *A. cearensis* também é uma leguminosa, pode-se inferir que esse valor de umidade não comprometeu a estabilidade dos componentes químicos da própria semente durante o período de estudo.

Quanto à composição química elementar da farinha desidratada de sementes de *A. cearensis*, esta se apresentou quantitativamente bem balanceada, apresentando elevadas quantidades de proteínas, de óleo e de carboidratos. As sementes possuem elevado teor de proteínas totais ($22,69 \pm 0,81 \text{ g.100g}^{-1}$), sendo superior a outros três legumes indianos selvagens, *Cassia floribunda*, *C. obtusifolia* e *Mucuna monosperma* que apresentaram $21,7 \pm 0,6$; $20,3 \pm 0,3$ e $21,2 \pm 0,6 \text{ g.100g}^{-1}$ (VANDIVEL; JANARDHANAN, 2000), respectivamente. O teor de proteínas totais de *A. cearensis* é próximo daquele encontrado no feijão *P. vulgaris* ($26,6 \pm 0,4 \text{ g.100g}^{-1}$) comercializado no Brasil (MECHI; CANIATTI-BRAZACA; ARTHUR, 2005) e, ainda, por vezes superior a 32 cultivares de feijão caupi (*V. unguiculata*) produzidos que variaram em seus teores proteicos de 16,4 a 27,3 g.100g^{-1} (ASANTHE; ADU-DAPAAH; ADDISON, 2006). As sementes de *A. cearensis* detêm elevado teor de lipídios totais ($24,45 \pm 2,02 \text{ g.100g}^{-1}$), sendo superior ao de nove cultivares de *Glycine max* ($20,1 \pm 0,12$ a $23,2 \pm 0,47 \text{ g.100g}^{-1}$) produzidas no Brasil (VASCONCELOS *et al.*, 2006). Este óleo é composto principalmente do glicerídio dos ácidos: palmítico (18,6%), linoléico (7,1%), oléico (53,1%), esteárico (8,0%) e 4% de cumarina com um pouco de 6-hidroxycumarina (LORENZI; MATOS, 2002). Portanto, o óleo de *A.*

cearensis apresenta em sua composição mais de 60 % de ácidos graxos insaturados, sendo próximo ao encontrado no óleo de soja (MAHAN; SCOTT-STUMP, 1996). O teor de fibra alimentar total da farinha de sementes de *A. cearensis* ($34,75 \pm 1,78 \text{ g.100g}^{-1}$) é próximo daquele detectado por Mechi, Caniatti-Brazaca, Arthur (2005) para o feijão *P. vulgaris* ($38,6 \pm 1,6 \text{ g.100g}^{-1}$), uma das mais importantes fontes de fibras da dieta do povo Brasileiro. Secundariamente, as sementes de *A. cearensis* são compostas de carboidratos digeríveis, amido ($11,43 \pm 0,18 \text{ g.100g}^{-1}$) e açúcares totais ($5,60 \pm 0,09 \text{ g.100g}^{-1}$), que podem funcionar prontamente como fontes de energia logo após a ingestão. Os carboidratos digeríveis de *A. cearensis* perfazem menor parte da semente do que no feijão-preto, *P. vulgaris* ($27,3 \text{ g.100g}^{-1}$), estudado por Mechi, Caniatti-Brazaca, Arthur (2005). A quantidade de matéria mineral encontrada em *A. cearensis* ($4,51 \pm 0,21 \text{ g.100g}^{-1}$) é próxima do valor encontrado para duas leguminosas selvagens, *Styphonolobium burseroides* ($3,3 \text{ g.100g}^{-1}$) e *Acacia bilimekii* ($5,3 \text{ g.100g}^{-1}$), estudadas por Sotelo *et al.* (1999), similar ainda aos valores encontrados por Oloyo (2004) para *Cajanus cajan* ($4,60 \text{ g.100g}^{-1}$) e aos valores encontrados por Ruiz e Oloyo (2001) em sete espécies de *Lupinus* spp. ($3,30$ a $4,20 \text{ g.100g}^{-1}$). Devido ao elevado teor proteico e lipídico e, ainda, a um moderado teor de carboidratos digeríveis, as sementes de *A. cearensis* são uma excelente fonte energética, fornecendo 378,93 Kcal em uma porção de 100 g, enquanto uma mesma quantidade do feijão *P. vulgaris* detém 228,16 kcal (MECHI, CANIATTI-BRAZACA, ARTHUR, 2005). Portanto, a composição química elementar das sementes de *A. cearensis* assemelha-se e, muitas vezes, sobrepõe-se à das leguminosas mais consumidas pelo homem e/ou animais, a soja e os feijões, sendo uma fonte rica em proteínas, óleo e fibra alimentar, com quantidades menores de carboidratos e matéria mineral, fornecendo um elevado aporte energético.

A fim de extrair o máximo possível de proteínas das sementes de *A. cearensis* para, então, estudar a composição e as atividades biológicas inerentes aos compostos proteicos, a farinha delipidada das sementes foi exposta a diferentes soluções-tampões com pH variando de 2,6 a 9,0 e com concentração fixa de 50 mM. A exemplo dos resultados obtidos por Moreira *et al.* (1983), em estudo com sementes da leguminosa *Canavalia brasiliensis*, a solubilidade das proteínas de *A. cearensis* mostrou-se crescente com o pH até chegar a região de neutralidade, não ocorrendo aumentos significativos na faixa alcalina. Portanto, a solução de escolha para extração das proteínas de sementes de *A. cearensis* para o isolamento, fracionamento e atividades biológicas

foi a solução-tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, devido tanto a sua excelente capacidade extratora como a sua faixa de atuação em pH fisiológico. O extrato bruto (EB) de sementes de *A. cearensis* obtido a partir de extração com o tampão selecionado apresentou $27,34 \pm 0,97$ mgP.mL⁻¹, sendo bem maior do que aquele detectado por Maia (1996) e Matos (1997) para diferentes cultivares de *V. unguiculata* e por Erme, Turgut-Balik, Sahin (2007) para 17 espécies de legumes do gênero *Lathirus* (20,67 a 22,53 mgP.mL⁻¹). Este elevado teor de proteínas solúveis nas sementes de *A. cearensis* foi que viabilizou a realização dos ensaios biológicos com a fração proteica F_{0,90} que será comentado posteriormente.

Não há relatos de trabalhos com as proteínas de sementes de *A. cearensis*. Portanto, faz-se necessário conhecer características básicas deste legume nunca estudado, especialmente quanto à sua composição proteica e, conseqüente, valor nutricional e potencial bioativo. Baseando-se na solubilidade da farinha de sementes de *A. cearensis* frente a diferentes soluções extradoras, é possível quantificar as suas principais classes proteicas (globulinas, albuminas, prolaminas, proteínas do tipo glutelinas ácidas e do tipo glutelinas básicas) e, desta forma, buscar similaridade com outras leguminosas já bem estudadas e compreender sobre o papel fisiológico que cada fração desempenha, mesmo que as funções muitas vezes sobreponham-se entre as frações. No entanto, já está bem estabelecido que algumas frações estão envolvidas na nutrição do embrião em desenvolvimento, na sua defesa contra patógenos e na manutenção metabólica e estrutural do organismo. Além disso, a caracterização da própria fração proteica a partir da avaliação de sua composição de aminoácidos e da presença de lectinas, inibidores de proteases e inibidores de alfa-amilase pode fornecer indícios de seu potencial e de suas limitações como fonte de proteínas para alimentação ou, mesmo, como fonte de proteínas bioativas de interesse biotecnológico. É sabido que as leguminosas contêm grande número de substâncias bioativas que não podem ser consideradas nutrientes, mas que exercem efeitos metabólicos no homem e animais que as consomem. Esses efeitos, que são geralmente observados quando leguminosas são consumidas regularmente podem ser considerados positivos, negativos ou ambos (CHAMP, 2002).

As classes proteicas globulina (74,43 g.100gP⁻¹), albumina (14,23 g.100gP⁻¹), glutelina ácida (0,07 g. 100gP⁻¹), glutelina básica (10,07 g.100gP⁻¹) e prolamina (1,20 g.100gP⁻¹) estão presentes em sementes de *A. cearensis* de forma bastante semelhante ao encontrado para outras leguminosas selvagens e cultivadas. Senna, Sridhar, Jung (2005) mostraram que em sementes de *C. cathartica* as globulinas também são majoritárias ($64,0 \pm 0,96$ g.100gP⁻¹), sendo seguidas

pelas albuminas ($25,5 \pm 0,56 \text{ g.100gP}^{-1}$), pelas glutelinas ($9,53 \pm 0,19 \text{ g.100gP}^{-1}$) e, aparecendo em menores quantidades, as prolaminas ($1,05 \pm 0,05 \text{ g.100gP}^{-1}$). Nas proteínas solúveis totais de nove cultivares de *V. unguiculata* foram detectados 65,6 a 79,7 g.100gP^{-1} de globulinas, 4,0 a 12,0 g.100gP^{-1} de albuminas, 2,3 a 5,9 g.100gP^{-1} de glutelinas, 1,4 a 2,2 g.100gP^{-1} de prolaminas e de 9,1 a 14,0 g.100gP^{-1} de gluteninas (GAAFAR; EL TINAY, 1997). Portanto, os níveis, especialmente, de globulinas e de albuminas detectados em *A. cearensis* são muito semelhantes àqueles encontrados numa leguminosa tão importante quanto *V. unguiculata*.

O perfil eletroforético em condições desnaturantes do EB de sementes de *A. cearensis* foi semelhante ao apresentado por Vasconcelos *et al.* (2006) para nove cultivares de soja produzidas no Brasil e para *Lathirus* spp. (Erme; Turgut-Balik; Sahin, 2007), há predominância de bandas proteicas de alta massa molecular ($> 45,0 \text{ kDa}$) e algumas outras bandas de massas moleculares menores. Já o perfil eletroforético das classes proteicas (globulinas, albuminas, glutelinas ácidas, glutelinas básicas e prolaminas) obtidas da farinha de sementes de *A. cearensis* apresenta uma boa separação das bandas proteicas de acordo com a sua solubilidade frente às diferentes soluções extratoras utilizadas. A grande maioria das proteínas de alta massa molecular ($> 45,0 \text{ kDa}$) é globulinas, ou seja, proteínas solúveis em solução salina e insolúveis em água. Um perfil eletroforético semelhante ao da fração globulina de *A. cearensis* foi mostrado para *V. unguiculata* (PEDALINO *et al.*, 1990; MAIA, 1996), com muitas bandas proteicas de alta massa molecular e poucas de baixa massa molecular. As albuminas de *A. cearensis* possuem um grande número de bandas proteicas, mas com poucas bandas majoritárias e com pouca semelhança entre as albuminas de *V. unguiculata* (PEDALINO *et al.*, 1990; MATOS, 1997). O perfil eletroforético da fração glutelina básica apresentou o mesmo perfil em *V. unguiculata* (MAIA, 1996), sem bandas visíveis e apenas um forte “arrastado” na corrida eletroforética. O perfil das glutelinas ácidas de *A. cearensis* é bem peculiar, apresentando somente quatro bandas proteicas de massas moleculares aparentes bastante distintas. Para esta fração, *V. unguiculata* apresentou uma grande diversidade de bandas proteicas (MAIA, 1996; MATOS, 1997), tendo algumas massas moleculares aparentes semelhantes às apresentadas em *A. cearensis*. A fração prolamina de *A. cearensis* apresenta apenas duas bandas proteicas, uma com ca. 21,4 kDa e outra com massa molecular aparente em torno de 31,0 kDa. Esta fração de *A. cearensis* é semelhante à de *V. unguiculata* no tocante a baixa diversidade de bandas proteicas, mas no que concerne a similaridade entre as massas moleculares elas são bem diferentes (MAIA, 1996). Portanto, as

proteínas que compõem a fração globulina de *A. cearensis* apresentam grande similaridade com a mesma fração de *V. unguiculata*. Já o perfil eletroforético das demais frações de *A. cearensis* não apresentou grande similaridade com o de *V. unguiculata*, tendo, por vezes, um perfil bastante peculiar.

Quanto à composição aminoacídica, parâmetro importante quando se busca uma nova fonte de proteína para a alimentação humana e de animais monogástricos, as sementes de *A. cearensis* apresentam, dentre os essenciais, uma predominância de fenilalanina + tirosina (111,76 g.kgP⁻¹), isoleucina (91,16 g.kgP⁻¹), lisina (75,39 g.kgP⁻¹), valina (56,72 g.kgP⁻¹). Por outro lado, é notória a deficiência nos aminoácidos sulfurados (metionina + cys = 7,83 g.kgP⁻¹), característica peculiar apresentada pelas proteínas das leguminosas (VASCONCELOS *et al.*, 2001; MAIA *et al.*, 2002). Dentre os aminoácidos não-essenciais ou semi-essenciais, destacaram-se os elevados teores de ácido glutâmico/ glutamato (126,74 g.kgP⁻¹) e arginina (129,57 g.kgP⁻¹). Quando os teores de aminoácidos essenciais detectados em *A. cearensis* são comparados à composição da clara do ovo, proteína referência nos estudos de avaliação da qualidade de proteínas, seis aminoácidos aparecem em quantidades inferiores, como é descrito a seguir em termos de percentual de deficiência em relação à clara do ovo: Met + Cys (89,41%), Trp (74,40%), Lys (30,50%), Thr (21,85%), Phe + Tyr (14,79%) e Leu (12,47%). Já a soja (*G. max*) analisada por Trugo *et al.* (2000), quando comparada à composição de aminoácidos essenciais da clara do ovo, apresentou quantidades inferiores de sete aminoácidos, sendo cinco iguais a *A. cearensis*: Met + Cys (71,21%), Trp (66,79%), Lys (37,60%), Ile (33,76%), Phe + Tyr (29,86%), Thr (21,35%) e Val (4,50%). Portanto, é notória a similaridade entre a composição de aminoácidos essenciais de *A. cearensis* e *G. max*, visto que ambas apresentam teores menores do que a clara do ovo, essencialmente, para os mesmos aminoácidos na mesma magnitude. Quando à composição de aminoácidos essenciais de *A. cearensis* é comparada aos requerimentos estabelecidos pela FAO/WHO/UNU (1985) para crianças de 2 a 5 anos, apenas dois aminoácidos apresentam deficiência (% deficiência em relação aos requerimentos de crianças de 2 a 5 anos): Met + Cys (68,68%) e Trp (8,18%). De acordo com Trugo *et al.* (2000), as sementes de *P. vulgaris* também apresentam deficiência apenas para dois aminoácidos: Met + Cys (36,20%) e Ile (32,87%). As sementes de *A. cearensis* atendem quase que integralmente aos maiores requerimentos da FAO/WHO/UNU, sendo deficientes em aminoácidos essenciais na mesma magnitude que o *P. vulgaris*. Quanto às exigências de ratos em crescimento (COATES *et al.*,

1969), as sementes de *A. cearensis* são deficientes em seis aminoácidos essenciais (% deficiência em relação aos requerimentos de ratos em crescimento): mais severamente em Met + Cys (84,94%) e Leu (36,92%), e mais levemente em Trp (15,83%), Thr (7,9%), Val (2,21%) e Lys (2,1%). De acordo com Trugo *et al.* (2000), as sementes de soja apresentam deficiência para ratos em cinco aminoácidos, sendo quatro os mesmos de *A. cearensis*: Met + Cys (59,04%), Lys (18,31%), Val (10,69%), Phe + Tyr (7,11%) e Leu (1,53%). Mais uma vez, é mostrada a semelhança entre a composição de aminoácidos de *A. cearensis* e de *G. max*. No geral, as sementes de *A. cearensis* são excelentes fontes de aminoácidos, apresentando como primeiro limitante, Met, e como segundo, Trp. Sua composição de aminoácidos é comparável em qualidade a de sementes de soja e do feijão *P. vulgaris*.

A presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais de natureza primária como proteínas ou de natureza secundária, na forma de compostos de baixa massa molecular, foi investigada na farinha de sementes de *A. cearensis*. Quanto à presença de lectinas ou hemaglutininas, o extrato bruto das sementes não foi capaz de aglutinar eritrócitos nativos e tratados com proteases de camundongo, coelho e rato. As lectinas podem ser caracterizadas e detectadas por sua habilidade em aglutinar eritrócitos, em certos casos com alta especificidade (LIS; SHARON, 1973; ASKAR, 1986). Este efeito é produzido pela habilidade das lectinas de se ligarem a tipos específicos de açúcares na superfície celular (DESHPANDE; DAMODARAN, 1990). Embora muitas lectinas reconheçam e se liguem a açúcares simples, a afinidade é muito maior para com os constituintes de glicoproteínas encontrados em animais e seres humanos (NICOLSON, 1974; PEUMANS; VAN DAMME, 1996). Essa propriedade das lectinas é responsável pelo seu efeito tóxico e pela sua interferência não-específica na absorção de nutrientes (LIENER, 1981). Segundo Nevel *et al.* (1998), o fato das lectinas reconhecerem e se ligarem a receptores glicosilados de células epiteliais localizadas nas vilosidades da mucosa intestinal conferem a estas proteínas propriedades negativas quanto a interferência nos processos de digestão, absorção e utilização de nutrientes. As lectinas são encontradas em uma ampla variedade de espécies de plantas e animais. Entretanto, estão presentes em maior quantidade em grãos de leguminosas e gramíneas (MANCINI-FILHO, LAJOLO, VIZEU, 1979; PUSZTAI, 1989). Vasconcelos *et al.* (2006) detectaram atividade hemaglutinante em nove cultivares de soja brasileira, variando de 1.152 a 147.456 UH. Kg Farinha⁻¹. Sotelo *et al.* (1999) detectaram atividade hemaglutinante nas sementes das leguminosas não-cultivadas *S. burseroides* e *A. bilimekii* com títulos de 6 e 2,

respectivamente. Portanto, é um ponto importante a ausência de atividade hemaglutinante nas sementes de *A. cearensis* quando se especula o seu potencial como fonte de proteínas para alimentação humana e/ou animal, sendo encorajadora sua utilização, principalmente quando comparada com uma leguminosa tão importante quanto à soja, com altos níveis de atividade hemaglutinante.

Além da provável ausência de lectinas nas sementes de *A. cearensis*, o extrato bruto também não apresentou atividade tóxica aguda quando injetado via IP em camundongos. Toxinas são substâncias presentes em vários organismos, muitas vezes fazendo parte de seu arsenal de defesa junto a outros compostos, agindo de forma aguda para produzir alterações fisiológicas que culminam na morte do animal (SGARBIERI, 1996). Já foram purificadas de sementes de soja duas toxinas, a “soyatoxina” – SYTX com DL_{50} 6 – 8 mg.Kg⁻¹ (VASCONCELOS *et al.*, 1994) e a toxina da soja – SBTX com DL_{50} 6,0 mg.Kg⁻¹ (VASCONCELOS *et al.*, 2008), que quando injetadas via IP em camundongos causam dispnéia, convulsões tônico-clônicas e morte. Outra toxina foi purificada de *Canavalia ensiformis*, canatoxina – CNTX com DL_{50} 2,0 mg.Kg⁻¹, que também é letal para camundongos (CARLINI *et al.*, 1989). Portanto, a ausência de toxinas em *A. cearensis* firma-se como outro ponto favorável a utilização de suas sementes como fonte de alimento, visto que sementes de importantes leguminosas como soja e *C. ensiformis* são reconhecidamente tóxicas para mamíferos quando administradas sob determinadas condições.

Apesar da excelente composição química, do elevado valor energético, da boa composição aminoacídica e da ausência de fitohemaglutininas e toxinas, foi detectada moderada atividade inibitória de tripsina ($27,41 \pm 0,03$ gTI.Kg⁻¹ de Farinha) na farinha de sementes de *A. cearensis*. Certamente, esta elevada atividade é decorrente da presença de um inibidor do tipo Bowman-Birk (BB) de 13,6 kDa, previamente purificado em sementes de *A. cearensis* por Tanaka, Sampaio, Sampaio (1989). Este valor foi próximo ao encontrado na cultivar de soja Rio Balsas estudada por Vasconcelos *et al.* (2001) que apresentou valor de atividade inibitória de tripsina de $30,6 \pm 1,1$ gTI.Kg⁻¹ de Farinha. Hossain e Becker (2001) detectaram valores de atividade inibitória de tripsina em *Sesbania* spp, um gênero de leguminosas não-cultivadas da Índia, variando de 5,25 a 14,01 gTI.Kg⁻¹ de Farinha, valores esses abaixo do encontrado para *A. cearensis*. Além disso, o valor encontrado nas sementes de *A. cearensis* é semelhante aos mais altos valores de atividade inibitória de tripsina dosados por Maia *et al.* (2000) em vários cultivares de *V. unguiculata*, de 12,0 a 30,6 gTI.Kg⁻¹ de Farinha. Os efeitos nocivos dos

inibidores de proteases em animais alimentados com leguminosas cruas são complexos (SILVA ; SILVA, 2000). Muitos estudos com animais monogástricos têm atribuído à presença de inibidores de tripsina os efeitos deletérios da alimentação à base de leguminosas, principalmente alterações metabólicas do pâncreas (aumento da secreção enzimática, hipertrofia e hiperplasia) e redução da taxa de crescimento (AL-WESALI *et al.*, 1995). No caso dos feijões e, em especial, de *V. unguiculata*, a atividade inibitória de tripsina é facilmente perdida através de tratamento térmico, permitindo seu uso como uma fonte importante de proteína na alimentação humana e animal (LIENER, 1994; MAIA, 1996). No entanto, em *A. cearensis* a estabilidade estrutural do inibidor de protease do tipo BB ao calor úmido é notória e, provavelmente, terá implicações sobre o aproveitamento da dieta à base de *A. cearensis*, sendo discutida posteriormente. No entanto, o outro lado a se considerar, quando se propõe a caracterizar os componentes antinutricionais/bioativos de uma planta, é aquele referente aos efeitos benéficos que esses compostos podem também exercer (CHAMP, 2002), questão de que trata a nutracêutica. Neste sentido, há relatos de propriedades anticarcinogênicas apresentadas por inibidores de proteases de soja e outras leguminosas, o que tem levado à comunidade científica a repensar a cautela de se remover todas as substâncias antinutricionais e/ou tóxicas por meios tecnológicos e, especialmente, por melhoramento genético (THOMPSON, 1993; WARE *et al.*, 1997; CLEMENTE; DOMONEY, 2001). No entanto, uma eliminação sistemática pode fazer-se necessária quando a incorporação de leguminosas, ou de suas frações, for de significância em alimentos infantis ou quando um tipo específico de leguminosa for consumido em grandes quantidades por um determinado grupo da população.

Dando continuidade à pesquisa de fatores tóxicos e/ou antinutricionais de natureza proteica, foi avaliada a presença de atividade ureásica na farinha de sementes de *A. cearensis*. Apesar das ureases desempenharem importante papel no metabolismo do nitrogênio em vegetais, há indícios experimentais de seu possível papel como antinutriente e, conseqüentemente, sobre seus efeitos negativos sobre a performance nutricional de animais alimentados com sementes cruas de soja (SIRKO; BRODZIK, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2001). Nas sementes de *A. cearensis* foi detectada atividade ureásica de $434,0 \pm 34,0$ U.Kg⁻¹ Farinha, sendo este valor bem superior ao descrito por Vasconcelos *et al.*, (2001) para duas cultivares de soja, $107,32 \pm 9,47$ e $219,28 \pm 12,6$ U.Kg⁻¹ Farinha. No entanto, mais estudos acerca do efeito antinutricional de

ureases devem ser realizados a fim de compreendermos a magnitude do valor encontrado para *A. cearensis*, bem como de estratégias para reduzir seus possíveis efeitos deletérios.

Além dos compostos de natureza proteica, moléculas derivadas do metabolismo secundário das plantas desempenham papel importante como fatores antinutricionais no aproveitamento dos nutrientes da dieta à base de vegetais. Nos últimos anos, fitatos, taninos, saponinas, alcalóides, compostos fenólicos totais, oxalato e glucosídeos cianogênicos são os metabólitos secundários mais investigados na pesquisa de novas fontes de proteínas para alimentação humana ou animal em sementes de leguminosas (SOTELO *et al.*, 1999; HOSSAIN; BECKER, 2001; OLOYO *et al.*, 2004; SENNA; SRIDHAR; JUNG, 2005; VADIVEL; JANARDHANAN, 2005).

Taninos são geralmente definidos como compostos polifenólicos naturais, de alta massa molecular (500 – 3000 Da), os quais possuem a habilidade de complexar e precipitar proteínas em soluções aquosas (SALUNKHE *et al.*, 1990; AGANGA; MOSASE, 2001). Também são considerados potentes inibidores de enzimas devido sua complexação com proteínas enzimáticas (NACZK *et al.*, 1994). A presença de taninos nas sementes de *A. cearensis* foi investigada através do método quantitativo de difusão radial em gel de agarose que utiliza uma extração ácida desses polifenóis e através de um ensaio qualitativo baseado em mudança de cor e que se utiliza de extração alcoólica dos taninos das sementes. No ensaio quantitativo, não foi possível detectar a presença de taninos. Já no ensaio qualitativo, foi possível verificar uma leve mudança de cor no meio reacional, ou seja, confirmando a presença de taninos em baixas concentrações. Certamente, os solventes envolvidos na extração dos taninos nos dois métodos foram cruciais na detecção desses compostos.

A grande tendência dos taninos para formar complexos com proteínas pode explicar a baixa digestibilidade das proteínas de leguminosas, inibição do crescimento e aumento da excreção de nitrogênio fecal em animais (AW; SWANSON, 1985; DESHPANDE; DAMODARAN, 1990; KAUR; KAPOOR, 1992). De acordo com Martin-Tanguy, Guillaume, Kossa (1977), os taninos podem afetar o crescimento de animais por duas razões: por seu sabor adstringente influenciando o consumo e por sua habilidade em se ligar a proteínas, afetando a digestibilidade e inibindo a atividade enzimática. Contudo, o baixo teor de taninos detectado nas sementes de *A. cearensis*, provavelmente, não será um grande obstáculo para o aproveitamento de suas proteínas.

Na análise qualitativa da presença de metabólitos secundários no extrato etanólico de sementes de *A. cearensis*, foram detectados ainda flavonas, flavonóis, xantonas e esteróides. Além destes, as sementes de *A. cearensis* são reconhecidamente ricas em cumarina, sendo o óleo das sementes (23%) constituído por cerca de 4% deste composto com um pouco de 6-hidroxycumarina (LORENZI; MATOS, 2002). Já foram descritas para a cumarina várias atividades biológicas como atividade espasmolítica, hipoglicemiante, antidiurética, antiespermatogênica, broncodilatadora, antiedematogênica, hepatotóxica e antitumoral. O dicumarol, uma substância quimicamente relacionada à cumarina, é um potente anticoagulante utilizado como rodenticida. Não há relatos sobre a influência da cumarina ou de seus derivados sobre o aproveitamento de nutrientes em dietas à base de vegetais, mesmo estando presente em várias famílias vegetais de importância agrônômica (MATOS *et al.*, 2004). Portanto, este trabalho poderá contribuir sobre a influência de uma dieta rica em cumarina e em derivados cumarínicos sobre a performance nutricional de ratos em crescimento.

Para avaliar a qualidade nutricional das proteínas de sementes de *A. cearensis*, dietas à base da farinha crua (Dieta AC) e processada - lavagem e cocção (Dieta ACP) das sementes, bem como as dietas controles, uma à base da proteína da clara do ovo (Dieta Padrão) e outra isenta de proteínas (Dieta Aproteica), foram preparadas e oferecidas a ratos jovens para consumo *ad libitum*. Já é bem conhecido que ratos geralmente apresentam baixas taxas de consumo em ensaios de avaliação da qualidade de proteínas presentes em farinhas de sementes. Vasconcelos *et al.* (2001) em estudo nutricional com sementes cruas de soja, demonstraram que os ratos alimentados com as sementes cruas como fonte de proteínas consumiram cerca de 37 % menos dieta do que aqueles alimentados com a dieta à base da clara do ovo. Valor próximo ao encontrado por Senna, Sridhar, Jung (2005) referente à ingestão voluntária de dieta à base de sementes de *C. maritima*, aproximadamente 30% menos do que os ratos alimentados com a dieta à base de proteína animal. Já os ratos alimentados com a farinha crua e processada de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas apresentaram consumo voluntário ca. 95 e 90%, respectivamente, menor do que aquele apresentado pelo grupo Dieta Padrão. O baixo consumo das dietas experimentais resultou em perda de peso drástica, cerca de duas vezes maior do que aquela dos animais alimentados com a dieta isenta de proteínas. As curvas de crescimento dos animais dos grupos experimentais refletiram o baixo consumo diário das dietas, estando as curvas

desses grupos bem abaixo até da curva do grupo Dieta Aproteica que, por sua vez, consumiu 57,26 % menos do que o grupo Dieta Padrão.

Certamente, uma ingestão tão baixa não supriria as necessidades metabólicas dos animais dos grupos experimentais, o que foi verificado no 4º dia de experimento com a morte precoce de dois animais do grupo Dieta AC, aliado ao aspecto mórbido dos demais animais do mesmo grupo e do grupo Dieta ACP. Portanto, o experimento foi interrompido em seu 4º dia, sendo os animais exsanguinados para análise dos parâmetros séricos e dissecados para obtenção do peso úmido e seco relativo dos órgãos. Estes procedimentos foram realizados para averiguar o status nutricional dos animais e evidenciar algum indício de toxicidade das dietas experimentais, mesmo com o curto tempo de experimento e baixo consumo de dieta que justifique a rejeição da dieta por parte dos animais.

Em geral, os animais dos grupos experimentais, alimentados à base da farinha de sementes de *A. cearensis* como fonte de proteínas, apresentaram quadros de aumento e, especialmente, redução relativa dos órgãos, relacionados à inanição proteica e calórica. Foi verificado aumento relativo do estômago, dos rins e do fígado dos animais dos grupos experimentais bem superior a apresentada pelo grupo Dieta Aproteica. O aumento do estômago, dos rins, do fígado foi verificado em animais subnutridos alimentados com dietas à base de feijão caupi cru como fonte de proteínas (GRANT, 1995; MAIA, 1996; SAMPAIO, 2006). Tal aumento do estômago pode estar relacionada a uma adaptação do organismo para maximização do processo digestivo e no fígado é conhecido que o baixo consumo e a má nutrição proteica resultam em acúmulo de gorduras, levando, assim, ao seu aumento (ALF, 2007). O aumento dos rins sugere um aumento da taxa catabólica geral do organismo. Além disso, foi verificada redução relativa do baço, do timo e do íleo bem mais severa do que aquela apresentada pelos animais alimentados com dieta isenta de proteínas. Redução relativa do timo e do baço em ratos alimentados com feijão caupi cru já foram sugeridas como indícios de inanição proteica por Maia (1996). Portanto, o aumento e involução dos referidos órgãos refletem um quadro de inanição dos animais.

Quanto aos parâmetros séricos dos ratos dos grupos experimentais, é evidente que houve um aumento da taxa catabólica proteica que é confirmada pelo alto nível de uréia plasmática, provavelmente para manter estáveis os níveis de proteínas séricas totais, assim como de

albumina. As enzimas marcadoras de toxicidade: fosfatase alcalina, AST e ALT, permaneceram inalteradas.

A partir dos resultados obtidos da mensuração do peso relativo dos órgãos e dos parâmetros séricos excluiu-se uma possível intoxicação dos animais com as dietas que teria levado, conseqüentemente, a uma rejeição severa das dietas, ocasionando o quadro de inanição visto nos animais. De Angelis (1986) menciona que uma das dificuldades dos experimentos utilizando ratos como modelo é que estes animais reduzem muito o consumo quando a dieta é pobre em proteína ou contém proteína de baixa qualidade. Koehnle, Russel, Gietzen (2003) afirmaram que ratos também rejeitam dietas deficientes em aminoácidos essenciais em até 15 minutos após o contato inicial. Certamente, nenhum desses fatores foi o motivo primordial para a rejeição das dietas pelos ratos. As dietas experimentais e a dieta à base da clara do ovo eram isoproteicas e a composição em aminoácidos das referidas dietas atendia de forma semelhante aos requerimentos para ratos em crescimento. Portanto, o desbalanceamento das dietas não foi a causa provável do péssimo desempenho dos animais.

Já é bem conhecido que a presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais, por exemplo lectinas, reduz bastante o consumo de dietas à base de sementes cruas de leguminosas pelos ratos (LIENER, 1980; LAFONT *et al.*, 1988). No entanto, um dos únicos fatores de importância como antinutriente de natureza proteica detectado foi inibidor de tripsina e, mesmo assim, nem o tratamento térmico melhorou consideravelmente a ingestão de dieta. Já é conhecido que o feijão *V. unguiculata* apresenta consideráveis níveis de atividade inibitória de tripsina e de lectinas, mas quando tratado termicamente esses valores são reduzidos a quantidade aceitáveis pelos animais, que imediatamente aumentam o consumo de dieta (MAIA, 1996). Certamente, fatores antinutricionais de natureza proteica sofreriam, pelo menos, redução de ação deletéria sobre os animais e, estes passariam a ingerir a dieta a níveis aceitáveis para a manutenção de seu metabolismo basal.

Trugo *et al.* (2000) observaram que após cocção (20 min.) de sementes de *G. max*, *L. albus* e *P. vulgaris* os níveis de atividade inibitória de tripsina desapareciam completamente, enquanto os teores de ácido fítico reduziram somente 0; 12,5 e 12,5%, respectivamente. El-Hady e Habiba (2003) verificaram que o mesmo tratamento realizado com sementes de *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Cicer arietinum* e *P. vulgaris* foi capaz de eliminar integralmente a atividade inibitória de tripsina e de alfa-amilase, enquanto o teor de ácido fítico, taninos e compostos

fenólicos totais foi reduzido em não mais do que 5, 37 e 28%, respectivamente, nas diferentes leguminosas. É perceptível que muitos metabólitos secundários de importância como fatores antinutricionais são altamente resistentes a tratamento térmico e são, por vezes, ignorados em ensaios de avaliação da qualidade nutricional de fontes vegetais, sendo, na maioria das vezes, o mau desempenho dos ratos atribuído a fatores tóxicos e/ou antinutricionais de natureza proteica. Outras vezes é posta em questão a qualidade da proteína, determinada pela composição de aminoácidos e digestibilidade. Posto isto, acredita-se que metabólitos secundários inibiram de forma drástica a ingestão de dieta pelos animais.

Martínez-Villaluenga *et al.* (2007) comentam que o sabor, mas, primariamente, o odor de dietas experimentais afetam de forma drástica a ingestão alimentar de ratos. O alto conteúdo de cumarina nas sementes de *A. cearensis* conferiu às dietas um cheiro adocicado extremamente forte e que pode ter sido decisivo na rejeição da dieta. Martínez-Villaluenga *et al.* (2007) comentam, ainda, que ensaios de avaliação de farinhas de sementes como fonte de proteínas que trazem ainda elevado teor de lipídios intrínseco a semente sofrem rancificação que, conseqüentemente, diminui o valor nutritivo da dieta e suas propriedades organolépticas. Outro fato a ser comentado é a possível presença do rodenticida dicumarol, um derivado da cumarina (MATOS *et al.*, 2004).

É razoável acreditar que as propriedades organolépticas da dieta à base de sementes de *A. cearensis* ocasionaram a rejeição das dietas pelos ratos e, conseqüentemente, um consumo alimentar que não proporcionaria uma manutenção dos processos metabólicos normais e, muito menos, uma avaliação real da qualidade das proteínas das sementes. Portanto, foi obtida uma fração proteica das sementes de *A. cearensis* com um elevado teor de proteínas totais (ca. 90%) a fim de proceder a avaliação da qualidade nutricional das proteínas a partir de uma melhora significativa na ingestão.

Sampaio (2006) avaliou a qualidade nutricional das globulinas obtidas do feijão caupi e verificou que esta fração apresentou, no geral, um aumento na quantidade de aminoácidos essenciais em relação à farinha integral de *V. unguiculata*. Contudo, lisina, leucina e os aminoácidos sulfurados tiveram uma grande redução e, em menor magnitude, o teor de triptofano também reduziu. Posto isto, procedeu-se a análise do teor de Trp como um “aminoácido marcador” de uma possível redução no conteúdo de aminoácidos essenciais no processo de obtenção da fração proteica F_{0/90}. O conteúdo de Trp reduziu em quase 50 % do valor encontrado

na farinha integral das sementes. Por isso, a fração proteica foi suplementada com este aminoácido, além da suplementação com Met, de acordo com os requerimentos para ratos em crescimento.

A $F_{0/90}$ deteve integralmente a atividade inibitória de tripsina ($27, 61 \pm 0,09$ gTI.Kg Fração⁻¹) detectada, anteriormente, na farinha integral de sementes de *A. cearensis*. Somente fervura por 180 min foi capaz de reduzir esta atividade a 55% do valor inicial. Márquez e Alonso (1999) conseguiram inibir completamente a atividade inibitória de tripsina de *C. arietinum* em apenas 5 min. Já Egounlety e Aworh (2003) reduziram a inibição de tripsina de *G. max*, *V. unguiculata* e de *Macrotyloma geocarpa* a 17,8, 13,9 e 23,8% do valor pré-tratamento em 30, 7 e 15 min respectivamente. A termoestabilidade da atividade inibitória de tripsina na $F_{0/90}$ é resultante da grande estabilidade estrutural do inibidor de protease do tipo Bowman-Birk, rico em pontes dissulfeto, previamente purificado e seqüenciado (TANAKA; SAMPAIO; SAMPAIO, M, 1989; TANAKA *et al.*, 1996). Apesar do elevado tempo de exposição ao calor (180 min) da $F_{0/90}$ que pode ter levado a depleção de alguns aminoácidos termolábeis como a lisina, esta fração proteica com – 44 % de atividade inibitória de tripsina foi avaliada, em paralelo a $F_{0/90}$ não-processada, quanto ao valor nutricional de suas proteínas para ratos em crescimento.

No ensaio de avaliação da qualidade nutricional da fração proteica $F_{0/90}$ (Dieta FP) e $F_{0/90}$ processada termicamente (Dieta FPP) de sementes de *A. cearensis* foi notório que os animais aceitaram muito bem as dietas à base das frações e que, realmente, fatores antinutricionais de natureza secundária e/ou as propriedades organolépticas da farinha das sementes é que causavam o repúdio dos animais pelas dietas. Estes resultados descentralizam um pouco o papel de proteínas antinutricionais e/ou da qualidade da proteína como fatores responsáveis pela baixa ingestão de dietas e reafirmam a importância do sabor e do odor de uma dieta experimental, bem como o seu conteúdo de metabólitos secundários antinutricionais. A ingestão diária de dieta pelos animais do grupo Dieta FP (9,21 g/ rato) e Dieta FPP (9,42 g/ rato) foi levemente inferior ao do grupo Dieta Padrão (11,02 g/ rato), mas quase o dobro do grupo Dieta Aprroteica (5,44 g/ rato). Certamente, com este consumo adequado foi possível avaliar o valor biológico das proteínas solúveis de *A. cearensis*. Rangel *et al.* (2004) apresentaram baixos valores de ingestão diária (3,4 g/ rato) de ratos alimentados com uma dieta contendo um isolado proteico de feijão caupi. Ratos alimentados com dietas contendo 75% globulinas de feijão caupi complementadas com ovalbumina e suplementadas com Met apresentaram valor de ingestão diária (9,9 g/ rato)

semelhante ao obtido com a fração de *A. cearensis* (Sampaio, 2006). Contudo, este consumo elevado de dieta pelos animais dos grupos experimentais não resultou num ganho de peso (Dieta FP = $12,24 \pm 3,28$ g e Dieta FPP = $17,6 \pm 5,03$ g) semelhante ao dos animais alimentados com a dieta padrão ($39,77 \pm 6,74$ g). No entanto, se comparado ao ganho de peso de animais alimentados com sementes de soja processadas termicamente (17,3 g) no estudo de Vasconcelos *et al.* (2001) e ao ganho de peso de ratos alimentados com isolados proteicos de *L. albus* (4,57 g) no estudo de Martínez-Villaluenga *et al.* (2007), é observado que a fração proteica de *A. cearensis* proporcionou ganho de peso semelhante ou superior àquele proporcionado por importantes fontes proteicas vegetais.

Apesar do ganho de peso regular dos animais alimentados com a fração proteica de *A. cearensis*, as curvas de crescimento dos grupos Dieta FP e Dieta FPP foram inferiores ao do grupo Dieta Padrão, mas substancialmente superiores àquela do grupo Dieta Aproteica. Situação semelhante foi encontrada por Fernández-Quintela *et al.* (1998), grupos de animais alimentados com sementes de *P. sativum*, *V. fava* e *G. max* apresentaram curvas de crescimento inferiores ao do grupo alimentado com dieta à base de proteína animal. Cuadrado *et al.* (2002) verificaram que ratos alimentados com a farinha e com frações proteicas de ervilha apresentaram também taxas de crescimento inferiores àquela apresentada pelo ratos alimentados com proteína animal. Portanto, os animais alimentados com as frações proteicas de *A. cearensis* apresentaram taxas de crescimento semelhantes às taxas de animais alimentados com importantes fontes proteicas vegetais.

Apesar dos grupos experimentais (Dieta FP e Dieta FPP) apresentarem ingestão inferior a do grupo Dieta Padrão, os mesmos apresentaram excreção fecal igual ao deste grupo. Os valores de excreção fecal para todos os grupos foram muito elevados (ca. 10g /rato nos últimos cinco dias). No estudo de Maia (1996), o grupo de ratos alimentados com proteína animal apresentou excreção fecal de 1,65 g/ rato, semelhante ao valor de 1,63 g/rato encontrado por Matos (1997). Esta elevada excreção apresentada por todos os grupos foi, provavelmente, devida ao percentual de fibra adicionado às dietas (~ 15%), ou seja, 5% acima do recomendado. Este teor mais elevado foi utilizado para tornar possível o fornecimento de dietas isoproteicas e isocalóricas, pois quando foi adicionada a farinha de sementes de *A. cearensis* às dietas experimentais para fornecer 10% de proteínas, esta quantidade trazia teores de fibra suficiente para constituir 15% da dieta.

A relação anteriormente apontada entre menor ingestão nos grupos experimentais do que no grupo Dieta Padrão e excreção semelhante em todos os grupos infere que os grupos experimentais ingeriram menos nitrogênio. Embora com menor ingestão, o grupo Dieta FP excretou nitrogênio de forma igual ao grupo Dieta Padrão e o grupo Dieta FPP (fração proteica processada termicamente) excretou menos N do que os outros dois grupos, ou seja, reteve mais N no corpo. Portanto, houve uma tendência dos animais alimentados com a dieta FP perderem mais N e dos animais alimentados com a dieta FPP reterem mais N, apontando para uma maior digestibilidade desta última. Contudo, quando foi feita a relação entre o N detectado nas fezes e o N ingerido, os grupos experimentais e o grupo controle não apresentaram diferença significativa entre os mesmos. Os animais alimentados com a fração proteica de *A. cearensis* conseguem reter o N no corpo de forma similar aos do grupo alimentado com a Dieta Padrão. No entanto, é importante avaliar se o N absorvido é transformado em tecido ou apenas é perdido ou convertido em outros compostos. Maia (1996), em experimento com ratos alimentados com farinhas de *V. unguiculata*, demonstrou uma elevada excreção de N associada a um baixo consumo, ou seja, pouco N ingerido e muita excreção, apontando para uma baixa digestibilidade das proteínas. Já Martínez-Villaluenga *et al.* (2007) demonstraram que ratos alimentados com isolados proteicos de *L. albus* apresentaram ingestão e excreção de N semelhantes aos ratos alimentados com proteína de origem animal, fato semelhante ao encontrado neste estudo.

O maior fator determinante da biodisponibilidade dos aminoácidos constituintes de uma proteína é a digestibilidade (PORTER *et al.*, 1984). A fração proteica processada termicamente apresentou valor de digestibilidade semelhante ao da proteína animal, enquanto a fração proteica não-processada apresentou digestibilidade 20% menor do que a proteína animal. Maia (1996) mostrou digestibilidade da proteína do feijão caupi em torno de 40% menor do que a apresentada pela clara do ovo. Senna, Sridhar, Jung (2005) demonstraram que a digestibilidade das proteínas de *C. maritima* é ca. 50% menor do que a digestibilidade da caseína. Já os isolados proteicos de *L. albus* apresentaram digestibilidade semelhante ao valor detectado para a caseína (MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2007). Portanto, a fração proteica de sementes de *A. cearensis* sem nenhum tratamento apresentou valor de digestibilidade superior ao feijão caupi, uma das mais importantes fontes de proteína para muitos povos, e a fração proteica processada termicamente apresentou digestibilidade semelhante a da clara do ovo. Certamente, o tratamento térmico melhorou a digestibilidade da fração proteica de *A. cearensis* por causar a desnaturação

das globulinas, como evidenciado no perfil eletroforético da F_{0/90} tratada termicamente, estando essas presentes em alta concentração nas sementes. As globulinas normalmente são resistentes à desnaturação e digestão em seu estado nativo, sendo parte da proteína excretada nas fezes ou transformada em produtos do metabolismo por microorganismos do intestino grosso (SGARBIERI; WHITAKER, 1982; UZOGARA; OFUYA, 1992).

Mesmo as proteínas sendo altamente digeríveis não necessariamente seus aminoácidos livres serão incorporados ao organismo consumidor. Para avaliar a retenção do nitrogênio ingerido no organismo, o índice NPU (utilização líquida da proteína) quantifica o percentual de nitrogênio adicionado ao animal devido à ingestão da dieta experimental, subtraindo-o do nitrogênio endógeno quantificado de um animal sob dieta isenta de proteína. Apesar das proteínas da F_{0/90} processada termicamente serem altamente digeríveis, pouco nitrogênio foi incorporado pelos animais, resultando em valor de NPU quase 20% menor do que F_{0/90}, em seu estado nativo, e aproximadamente 50% menor do que o valor de NPU da clara do ovo. Portanto, o longo tratamento térmico (180 min. de fervura) melhora a digestibilidade das proteínas, mas deve ter diminuído a quantidade de alguns aminoácidos essenciais como mostrado anteriormente para o Trp (- 50%). Maia (1996) demonstrou que o tratamento térmico (fervura por 90 min.) do feijão caupi diminuiu o conteúdo de aminoácidos essenciais já limitantes como valina e lisina. Além disso, a perda da qualidade proteica pode estar relacionada à reação de Maillard, na qual a lisina e outros aminoácidos reagem com açúcares, tornando tais aminoácidos biologicamente indisponíveis, aliada à perda resultante da formação de complexos entre aminoácidos e pigmentos fenólicos (UZOGARA; OFUYA, 1992). Senna, Sridhar, Jung (2005), trabalhando com ratos alimentados com sementes de *C. marítima*, encontraram valores de NPU quase 70% menores do que o valor apresentado pelos ratos alimentados com caseína. Sampaio (2006) apresentou valor de NPU para ratos alimentados com as globulinas de feijão caupi ca. 60% menor do que o valor apresentado pelos ratos alimentados com a clara do ovo como fonte de proteínas. Proteínas de *A. cearensis* são incorporadas aos tecidos animais de forma similar ou superior aos valores apresentados para importantes leguminosas.

Valor biológico (VB) é um índice que expressa percentualmente a relação entre o que foi realmente incorporado pelo organismo consumidor e a quantidade de proteínas que foi digerida. Como previsto, as proteínas da clara do ovo apresentaram elevado valor biológico (99,13 ± 4,95%), sendo seguidas das proteínas da F_{0/90} não-processada (75,10 ± 10,84%) e, com o mais

baixo valor biológico, as proteínas da F_{0/90} processada termicamente ($48,18 \pm 3,01\%$). Este valor de VB da F_{0/90} não-processada prediz que os compostos proteicos que foram digeridos, mesmo que em quantidade inferior à fração processada, foram, em sua maioria, absorvidos e incorporados ao organismo. O VB da F_{0/90} não-processada é semelhante aos valores apresentados por Trugo *et al.* (2000) para sementes tratadas termicamente de *G. max* ($70,6 \pm 3,7\%$), *L. albus* ($73,0 \pm 3,3\%$) e *P. vulgaris* ($68,9 \pm 5,5\%$). A fração proteica obtida de sementes de *A. cearensis* apresentou VB semelhante ao de algumas leguminosas mais importantes como fonte de proteína na alimentação humana e/ou animal. Ensaio biológico com a F_{0/90} exposta a menor tempo de tratamento térmico provavelmente melhoraria seu VB, uma vez que aumentaria a digestibilidade das proteínas, sem afetar, contudo, a integridade dos aminoácidos termolábeis.

Após avaliação nutricional das proteínas de sementes de *A. cearensis* a partir do estabelecimento de vários índices de determinação da qualidade proteica, foi precedido a análise do peso úmido e seco relativo dos órgãos, bem como a determinação dos parâmetros séricos a fim de observar indícios de toxicidade ou quaisquer outras injúrias causadas aos animais pela ingestão das dietas experimentais. Especialmente, quanto ao peso seco relativos dos órgãos foi perceptível apenas redução relativa do baço nos grupos experimentais e no grupo alimentado com dieta isenta de proteínas. Semelhante redução no baço foi observada por Rubio *et al.* (1999) em animais alimentados com sementes cruas de grão de bico e por Sampaio (2006) em ratos alimentados com globulinas de feijão caupi como fonte de proteínas. Nenhuma redução ou aumentos relativos acentuados e que apontassem para a presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais ou deficiência proteica foi observada. Nem mesmo os níveis elevados de atividade inibitória de tripsina na fração proteica de *A. cearensis* foi capaz de causar hipertrofia do pâncreas e do intestino delgado, já tão relatada em animais alimentados com sementes de leguminosas cruas, com elevados níveis de inibidores de proteases (LIENER, 1994; HOPFER, 1998; EVENEPOEL *et al.*, 2000). Portanto, a presença do inibidor de proteases do tipo Bowman-Birk em sementes de *A. cearensis*, provavelmente, não traz severos prejuízos nutricionais e abre um caminho seguro para a especulação de seu potencial nutracêutico na perspectiva de um alimento funcional para a prevenção ao câncer, pois já é relatado o potencial antiproliferativo de inibidores de proteases, especialmente do tipo BB, presentes em sementes de leguminosas comestíveis (DURANTI, 2006).

Os níveis de proteínas totais e de albumina sérica dos grupos experimentais foram semelhantes aos do grupo Dieta Padrão. Já os animais alimentados com a dieta isenta de proteínas apresentaram déficit para os dois parâmetros, o que caracteriza um quadro de desnutrição. Valores séricos mais baixos foram detectados em animais alimentados com ervilhas, fava e soja como fontes de proteínas (FERNANDEZ-QUINTELA *et al.*, 1998). Da mesma forma, as enzimas marcadoras de toxicidade, fosfatase alcalina, AST e ALT, permaneceram em níveis semelhantes ou inferiores aos apresentados pelo grupo de animais alimentados com a clara do ovo como fonte de proteínas. Os níveis de creatinina não revelaram diferenças entre os grupos experimentais e os grupos controles, sendo o nível dos animais alimentados com a fração proteica inferior ao dos animais alimentados com a dieta isenta de proteínas. Somente quanto aos níveis de uréia plasmática, pôde-se observar que os animais dos grupos experimentais apresentaram níveis superiores ao grupo Dieta Padrão e do grupo Dieta Aprroteica, o que descarta parcialmente a hipótese de depleção dos tecidos já que este grupo apresentou o pior desempenho no estudo nutricional. Provavelmente, este elevado nível de uréia plasmática, especialmente no grupo Dieta FPP, aponta para um desbalanceamento da composição de aminoácidos. Os aminoácidos podem ser absorvidos, mas caso encontrem-se em quantidades inadequadas, proteínas não são integralmente formadas e são degradadas junto ao excedente de aminoácidos, produzindo grande quantidade de uréia. Portanto, as frações proteicas de *A. cearensis* não causaram nenhum dano severo aos órgãos e nos parâmetros séricos dos animais, firmando-se como excelente fonte proteica comparável à soja e aos feijões em sua qualidade nutricional.

A. cearensis é reconhecida como umas das espécies mais ameaçadas pelo extrativismo vegetal, movido pelas crenças e inúmeros usos de todas as suas partes vegetais na medicina popular do povo nordestino (ALBUQUERQUE; OLIVEIRA, 2007). Dentre seus inúmeros usos, as sementes de *A. cearensis* são utilizadas na medicina caseira para o tratamento de várias doenças causadas por microrganismos patogênicos, como infecções urinárias e genitais, gripes, infecções e inflamações nas vias respiratórias e micoses, e, ainda, são reconhecidamente resistentes ao ataque de insetos (MAIA, 2004; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007ab). Baseado em seus usos etnobotânicos, o presente trabalho procurou avaliar, além da qualidade nutricional proteica, se proteínas de *A. cearensis* estão envolvidas em sua atividade antimicrobiana e inseticida. Para tanto, procedeu-se uma avaliação da bioatividade das proteínas majoritárias,

globulinas e albuminas, contra importantes fungos fitopatogênicos, bactérias e leveduras patógenas humanas e mosquitos vetores de doenças.

No ensaio de atividade inibitória do crescimento bacteriano contra importantes cepas patogênicas humanas, foi observado que o EB estimulou fortemente o crescimento de todas as cepas, enquanto as albuminas inibiram as Gram-negativas *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, e as globulinas inibiram, além das cepas mencionadas, as Gram-positivas *B. subtilis* e *S. aureus*, sendo todas as cepas expostas a 1,0 mg de proteínas das frações. É notório que a simples concentração das proteínas nas frações globulina e albumina resultou no aparecimento de uma forte atividade antibacteriana, não observada no EB. Portanto, é provável que proteínas sejam os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana. No entanto, tratamento térmico adequado e/ou digestão com enzimas proteolíticas poderia reforçar esta hipótese, pois as atividades não persistiriam na mesma magnitude caso os responsáveis fossem compostos proteicos. Sementes são especialmente ricas em peptídeos/proteínas antimicrobianas, os níveis desses compostos detectados nesta parte vegetal é muito maior do que aquele encontrado em outros tecidos, como folhas e flores. Baseando-se em suas diferenças estruturais primárias, as proteínas antimicrobianas de plantas podem ser divididas em quatro grupos: tioninas, defensinas, proteínas transferidoras de lipídios, peptídeos tipo-heveína e proteínas tipo-knotina (WANG *et al.*, 2001). Ribeiro *et al.* (2007) sumarizaram vários trabalhos relatando atividade antibacteriana de todas as referidas classes de proteínas tanto contra cepas Gram-positivas quanto contra cepas Gram-negativas. Pelegrini *et al.* (2006) apresentam trabalhos relatando que o efeito antibacteriano dessas proteínas reside, especialmente, em causar danos à parede e/ou membrana celular, desestabilizando o equilíbrio osmótico celular. Osborn *et al.* (1995) isolaram e caracterizaram cinco proteínas antimicrobianas que apresentaram homologia com defensinas e tioninas previamente estudadas, sendo esses compostos bastante ativos contra cepas Gram-positivas. Kelemu *et al.* (2004) isolaram uma proteína antibacteriana com ca. 20 kDa de sementes da leguminosa *Clitoria ternatea* relacionada às defensinas e tioninas previamente estudadas por Osborn *et al.* (1995). Somente passos posteriores de purificação poderão revelar dados estruturais e de similaridade com proteínas previamente purificadas de outros legumes, bem como seu mecanismo de ação.

Apesar do relato de maior sensibilidade dos esporos de fungos filamentosos a compostos fungicidas devido a peculiaridades de sua estrutura externa, esses germinaram normalmente na

presença das globulinas (0,2 mgP) e das albuminas (0,2 mgP). O extrato bruto (0,62 mgSST. mL⁻¹) inibiu somente a germinação dos esporos de *P. herguei*, mas dificilmente esta atividade é devida a compostos de natureza proteica. No entanto, Ji e Kúc (1996) relataram uma potente atividade inibitória da germinação de esporos fúngicos por enzimas estreitamente relacionadas à defesa contra patógenos vegetais, quitinases e β -1,3-glucanases. Da mesma forma, o extrato bruto (8,24 mgP) e as classes proteicas obtidas de sementes de *A. cearensis*, as globulinas (3,0 mgP) e as albuminas (3,0 mgP), não apresentaram atividade inibitória do crescimento dos fungos filamentosos em meio sólido, apesar de existirem vários relatos desta atividade, testada nas mesmas condições, atribuída a proteínas purificadas de sementes de leguminosas (CHU; LIU; NG, 2003; WONG; NG, 2005; WONG; NG, 2006). Os resultados negativos não excluem a participação de peptídeos e/ou proteínas de sementes de *A. cearensis* em sua defesa contra fungos fitopatogênicos, pois as próprias condições do ensaio não simulam completamente as condições naturais, as espécies de fungos selecionadas para o ensaio podem não estar relacionadas à patogênese das sementes, o meio sólido muitas vezes não é adequado para esses ensaios e as condições de obtenção, bem como a concentração das proteínas podem não ter favorecido a ocorrência de atividade.

Ao contrário do grande número de trabalhos que relatam a presença de peptídeos e/ou proteínas de plantas que apresentam atividade antimicrobiana, apenas dois trabalhos descreveram a atividade larvicida contra *Ae. aegypti* de proteínas de origem vegetal, um estudo com proteases cisteínicas de *Calotropis procera* (RAMOS *et al.*, 2006) e outro estudo com lectinas de sementes de *Myracrodruon urundeuva* (SÁ *et al.*, 2008). No presente estudo, o EB (27,34 mgP.mL⁻¹) de sementes de *A. cearensis* foi capaz de inibir a eclosão dos ovos de *A. aegypti* (44,0 \pm 2,0%) e *Ae. albopictus* (24,0 \pm 3,61%). Já as classes proteicas, albumina (10 mgP.mL⁻¹) e globulina (10 mgP.mL⁻¹), não inibiram a eclosão dos ovos de nenhum dos vetores. Segundo Ramos *et al.* (2006), uma fração proteica obtida do látex de *C. procera* apresentou 100% de inibição da eclosão dos ovos de *Ae. aegypti* na mesma concentração em que as globulinas e as albuminas de *A. cearensis* foram ensaiadas. Apesar das albuminas não inibirem a eclosão dos ovos de ambas as espécies, estas conseguiram causar 100% de mortalidade das larvas que emergiram dos ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, enquanto as globulinas causaram baixa mortalidade das larvas em 1º estágio de ambos os vetores. Uma fração proteica (1 mg.mL⁻¹) do látex de *C. procera* apresentou 65,67% de mortalidade das larvas em 1º estágio de *Ae. aegypti* (RAMOS *et al.*, 2006). Por outro

lado, somente o EB foi capaz de causar 100% de mortalidade das larvas em 3º estágio de *A. aegypti* ($CL_{50} 0,84 \pm 0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$) e *Ae. albopictus* ($CL_{50} 0,84 \pm 0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$), sendo as globulinas e albuminas pouco ativas. Esses valores de LC_{50} obtidos são muito superiores aos detectados para óleos essenciais e extratos orgânicos de diferentes partes vegetais (CARVALHO *et al.*, 2003; LUNA *et al.*, 2005). Certamente, os compostos responsáveis pela atividade larvicida do EB são metabólitos secundários como taninos, fenóis e esteróides, detectados nas sementes de *A. cearensis* e reconhecidamente larvicidas (LUNA *et al.*, 2005).

Apesar da detecção de atividade larvicida, provavelmente, de natureza proteica apenas contra larvas em 1º estágio de ambos os vetores, já é bem conhecido que lectinas e toxinas apresentam atividade inseticida contra dípteros, mas nada se conhece sobre a atividade de inibidores de proteases serínicas e cisteínicas, inibidores de alfa-amilase e arcelinas, apesar de estar bem documentada a ação desses compostos contra muitas outras ordens de insetos (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002). Portanto, a escassez de descrições de peptídeos/proteínas com atividade contra *Aedes* spp. advém do pequeno número de trabalhos realizados, sendo necessário um aumento de pesquisas enfocando esta questão a fim de se abrir uma nova linha de combate a dengue.

O ensaio de inibição do crescimento de leveduras patogênicas humanas pelo EB (2,73 mgP), pelas globulinas (1,0 mgP) e pelas albuminas (1,0 mgP) mostrou que o EB inibiu apenas o crescimento de *C. tropicalis*, enquanto as globulinas e as albuminas inibiram de forma bastante eficaz o crescimento de todas as leveduras (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *P. anomala*), por vezes de forma semelhante ao formol 0,4%. Da mesma forma, o ensaio de inibição do crescimento de fungos filamentosos, em meio líquido, pelas mesmas amostras nas mesmas concentrações demonstrou que o EB inibiu o crescimento dos fungos apenas nas primeiras 24 h, enquanto as globulinas foram capazes de inibir o crescimento, em alguma magnitude, de todos os fungos avaliados (*A. fumigatus*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *P. herguei* e *R. solani*) e as albuminas foram eficientes em inibir o crescimento de *A. fumigatus*, *A. niger*, *F. oxysporum* e *R. solani*. Tem se tornado cada dia mais evidente que determinadas classes de proteínas estão diretamente envolvidas na defesa das plantas contra patógenos (SWERRY; LUCAS, 1997; BROEKAERT *et al.*, 1997; THOMMA *et al.*, 2002). As vicilinas (globulinas 7S) isoladas de sementes de *V. unguiculata* e *V. radiata* em concentração de $0,8 \text{ mg. mL}^{-1}$, foram ativas em inibir o crescimento em até 90% de algumas leveduras através de uma inibição do bombeamento de

prótons para o meio externo, ligação a estruturas quitinosas vitais e inibição da formação dos esporos (GOMES *et al.*, 1998). Além disso, já é conhecida a atividade inibitória do crescimento de fungos fitopatogênicos pelas vicilinas através de ligação à quitina da parede celular (GOMES *et al.*, 1997). Um mecanismo de ação similar é atribuído a outras proteínas com o domínio de ligação à quitina, tais como quitinases específicas, heveína e proteínas-tipo heveína e peptídeos de *Amaranthus caudatus* (RAIKHEL; LEE; BROEKAERT, 1993; FERNANDES; XAVIER-FILHO, 1998; SALES *et al.*, 2000). Portanto, é bem provável que proteínas ligantes à quitina estejam presentes nas globulinas de *A. cearensis*, atuando em sua defesa contra fungos. Além das tioninas, defensinas, proteínas transferidoras de lipídios, peptídeos tipo-heveína e proteínas tipo-knotina (WANG *et al.*, 2001) citadas anteriormente como moléculas importantes na defesa contra microrganismos, as albuminas 2S vem ganhando atenção, especialmente, por sua atividade contra fungos (PELEGRINI *et al.*, 2006). Portanto, uma vasta gama de famílias de proteínas pode estar envolvida na potente atividade inibitória do crescimento de fungos apresentada pelas albuminas.

O fracionamento das albuminas em F_{0/70} e F_{70/90} potencializou especialmente a atividade inibitória do crescimento dos fungos filamentosos. A F_{70/90} (1,0 mg.mL⁻¹) apresentou potente atividade inibitória do crescimento de todos os fungos filamentosos avaliados (*A. fumigatus*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *P. herguei* e *R. solani*). Já F_{0/70} (1,0 mg.mL⁻¹) inibiu apenas de forma discreta o crescimento de *A. niger*, *A. fumigatus* e *R. solani*. Por outro lado, o fracionamento não aumentou a atividade de F_{0/70} e F_{70/90} na inibição do crescimento das leveduras utilizadas. A F_{70/90} apresentou perfil eletroforético rico em bandas proteicas de baixa massa molecular (< 31,0 kDa). Muitas proteínas antifúngicas de baixa massa molecular já foram identificadas (KELEMU *et al.*, 2004; MINCOFF *et al.*, 2006; PELEGRINI *et al.*, 2006). Provavelmente, os compostos proteicos responsáveis pela atividade contra leveduras estivessem presentes em ambas as frações e o fracionamento apenas levou à diminuição da concentração dessas moléculas e, conseqüentemente, uma redução na atividade.

Na tentativa de melhor caracterizar a proteína com atividade antifúngica, a F_{70/90} obtida das sementes de *A. cearensis* foi aplicada em coluna aniônica, resultando na obtenção de quatro picos proteicos. Para todos os picos obtidos houve uma predominância de dois grupos de bandas proteicas, um com massa molecular por volta de 45,0 a 66,2 kDa. Além disso, no PNR é visualizada fracamente uma banda com massa molecular por volta de 21,4 kDa e no PRII uma banda com massa molecular logo acima de 31,0 kDa. Portanto, um ensaio de atividade inibitória

do crescimento fúngico poderia revelar o envolvimento de uma ou mais dessas proteínas nesta atividade. Outro passo esclarecedor poderia ser a determinação da sequência aminoterminal das duas bandas proteicas isoladas e de diferentes massas (~21,4 e 31,0 kDa) a fim de investigar a similaridade com alguma proteína de defesa vegetal e, desta forma, guiar os próximos passos de purificação.

Assim, as sementes de *A. cearensis* são altamente ricas em peptídeos e/ou proteínas com atividade inibitória do crescimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, apresentando ainda atividade contra larvas em 1º estágio de *Aedes* spp. Estudos posteriores fazem-se necessários para uma melhor caracterização desses compostos e de seus respectivos mecanismos de ação.

7. CONCLUSÃO

As conclusões deste trabalho são:

- As sementes de *Amburana cearensis* possuem alto potencial nutricional, revelado pelo alto teor de proteínas, lipídios e fibra alimentar, moderado teor de carboidratos digeríveis e matéria mineral, e composição aminoacídica comparável àquela da soja e feijão. Além disso, as sementes apresentam moderados níveis de fatores antinutricionais, sendo detectados apenas atividade inibitória de tripsina, atividade ureásica e alguns metabólitos secundários.

- Provavelmente, componentes químicos de baixa massa molecular presentes nas sementes incorporadas a dietas interferem na sua aceitação e aproveitamento por parte dos animais, uma vez que quando a fração proteica $F_{0/90}$, obtida de suas proteínas solúveis foi incorporada à dieta balanceada teve boa aceitação pelos animais e mostrou-se como uma boa fonte de proteínas, comparável a importantes fontes de proteínas vegetais, como a soja e os feijões.

- As proteínas das sementes de *A. cearensis* são compostas principalmente por globulinas ($74,43 \text{ g.100g}^{-1}$) e albuminas ($14,23 \text{ g.100g}^{-1}$), com quantidades menores de proteínas do tipo glutelinas básicas ($10,07 \text{ g.100g}^{-1}$), prolaminas ($1,20 \text{ g.100g}^{-1}$) e proteínas do tipo glutelinas ácidas ($0,07 \text{ g.100g}^{-1}$). O extrato bruto (EB) das sementes apresenta uma grande diversidade de bandas proteicas com predominância de bandas com massa molecular aparente $> 45,0 \text{ kDa}$.

- As sementes de *A. cearensis* possuem também alto potencial bioativo, destacando-se as atividades de suas proteínas majoritárias (globulinas e albuminas) contra o crescimento de bactérias e leveduras patógenas do homem e de fungos filamentosos fitopatogênicos, e atividade contra larvas em 1º estágio de *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*.

- A atividade inibitória do crescimento de fungos fitopatogênicos concentra-se na fração $F_{70/90}$ das albuminas, sendo rica em proteínas de baixa massa molecular ($< 30 \text{ kDa}$).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGANGA, A. A.; MOSASE, K. W. Tannin content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capassa*, *Zizyphus mucronata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 91, p. 107-113, 2001.

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; NETOS, E.M.F.L.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **J. Ethnopharmacol.**, v. 114, p. 325-354, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P.; OLIVEIRA, R.F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high richness of medicinal plants? **J. Ethnopharmacol.**, v. 113, p. 156-170, 2007.

ALF - American Liver Foundation. **Diet & Your Liver**. Disponível em: <<http://www.liverfoundation.org/db/articles/1022>>. Acesso em: 02 fev 2009.

AL-WESALI, M.; LAMBERT, N.; WELHAM, T.; DOMONEY, C. The influence of pea seed trypsin inhibitors on the *in vitro* digestibility of casein. **J. Sci. Food Agric.**, v. 68, n. 4, p. 431-437, 1995.

AMBIENTE BRASIL CAATINGA. Disponível em : <<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./natural/index.html&conteudo=./natural/biomas/caatinga.html#loca>>. Acesso em 29 de dezembro de 2008.

ANDRADE-LIMA, D. The caatinga dominium. **Rev. Bras. Bot.**, n. 4, p. 149-153, 1981.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. 15th ed. Arlington: Virginia, 1990. 1115p.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16th ed. Gaitheersburgh, 1997.

ARAÚJO FILHO, J.A.; BARBOSA, T.M.L., **Manejo agroflorestal da catinga: uma proposta de sistema de produção.** In: Oliveira, T.S.; Assis Júnior, R.N.; Romero, R.E.; Silva, J.R.C.S. Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido. Fortaleza, Folha de Viçosa, p. 47-57, 2000.

ASANTHE, I. K.; ADU-DAPAAH, H.; ADDISON, P. Variation in contents of crude protein and mineral elements in 32 cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) accessions in Ghana. **Ghana J. Agric. Sci.**, v. 39, n. 1, p. 83-86, 2006.

ASKAR, A. Faba beans (*Vicia faba* L.) and their role in the human diet. **Food Nutr. Bull.**, v. 8, n. 3, p. 15-24, 1986.

AW, T. L.; SWANSON, B. G. Influence of tannin on *Phaseolus vulgaris* protein digestibility and quality. **J. Food Sci.**, v. 50, n. 1, p. 67-71, 1985.

BAETHGEN, W. E.; ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v. 20, n. 9 e10, p. 961-96, 1989.

BECKER-RITT, A.; MULINARI, F.; VASCONCELOS, I.M.; CARLINI, C.R. Antinutritional and/or toxic factors in soybean seeds [*Glycine max* (L.) Merril]. Comparison among different cultivars adapted to South Region of Brazil. **J. Sci. Food Agric.**, v. 84, p. 263-270, 2004

BIOSFERA DA CAATINGA. Disponível em: <http://www.biosferadacaatinga.org.br/o_bioma_caatinga.html>. Acesso em 20 de dezembro de 2008

BLANCO, A.; BRESSANI, R. Biodisponibilidad de aminoácidos in el frijol (*Phaseolus vulgaris*). **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 41, n. 1, p. 38-51, 1991.

BORGES, S.M.A.A. **A importância epidemiológica do *Ae. albopictus* nas Américas.** São Paulo. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP. 2001. 91p.

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

BROEKAERT, W.F.; LEE, H.-I.; KUSH, A.; CHUA, N.-H.; RAIKHEL, N. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p. 7633-7637, 1997.

BURBANO, C.; MUZQUIZ, M.; AYET, G.; PEDROSA, M.M. Evaluation of antinutritional factors of selected varieties of *Phaseolus vulgaris*. **J. Sci. Food Agric.**, v. 79, p. 1468-1472, 1999.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Isolation and Characterization of a Toxic Protein from *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) Seeds, Distinct From Concanavalin A.. **Toxicon**, v. 19, p. 667-675, 1981.

CARLINI, C. R. ; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CARVALHO, A. F. F. U.; MELO, V. M. M.; AGUIAR, L. M. B. A.; MATOS, F. J. A. Avaliação da toxicidade de extratos de plantas medicinais através de bioensaio com *Artemia salina* Leach. **Cienc. Cult.**, v. 40, n. 11, p. 1109-1111, 1987.

CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M.; CRAVEIRO, A.; BANTIM, M. M. B.; RABELO, E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 04, p. 569-571, 2003.

CHAMP, M-J. Non-nutrient bioactive substances of pulses. **Br. J. Nutr.**, v.88, n. 3, p. 307-319, 2002.

CHU, K.T.; LIU, K.H.; NG, T.B. Cicerarin, a novel antifungal peptide from Green chickpea. **Peptides**, v. 24, p. 659-663, 2003.

CLEMENTE, A.; DOMONEY, C. Anticarcinogenic activity of protease inhibitors in legumes. In **Proceedings of the 4th European Conference on Grain Legumes**, Cracow, Paris: AEP Editions, p. 114–115. 2001

COATES, M.E.; ODONOGHUE, P. N., PAIYNE, P.R., WARD, R.J. Dietary standards for laboratory rats and mice – nutritional and microbiological recommendation. **Laboratory Animal Handbook 2**. London: Laboratories Animals, p. 13-15, 1969.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**, Fiocruz, Rio de Janeiro, 1994. 228 pp.

CORREA, P.R.L.; FRANCA, E.; BOGUTCHI, T.F. *Aedes aegypti* infestation and occurrence of dengue in the city of Belo Horizonte, Brazil. **Rev. Saude Publica**, v. 39, n. 1, p. 33-40, 2005.

COSTA-LOTUFO, L. V.; JIMENEZ, P.C.; WILKE, D. V.; LEAL, L.K.A.M.; CUNHA, G. M. A.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K.M.; VIANA, G.S.B.; MORAES, M. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Z. Naturforsch., C, J. Biosci.**, Alemanha, v. 58, n. 9 e 10, p. 675-680, 2003.

CRUZ, G. A. D. R.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; PILON, A. M.; CRUZ, R. S.; BRUMANO, M. H. N.; MOREIRA, M. A. Avaliação da digestibilidade protéica, inibidor de protease e fibras alimentares de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Braz. J. Food Technol.**, v. 7, n. 2, p. 103-109, 2004.

CUADRADO, C.; GRANT, G.; RUBIO, L.A.; MUZQUIZ, M.; BARDOCZ, S.; PUSZTAI, A. Nutricional utilization by rat of diets based on lentil (*Lens culinaris*) seed meal or its fractions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 15, p. 4371-4376, 2002.

DE ANGELIS, R. C. Proteínas e seu valor nutritivo. In: _____. **Fisiologia da Nutrição**. v.1, 3^a ed. São Paulo: Nobel, p. 84-112, 1986.

DESHPANDE, S. S.; DAMODARAN, S. Food legumes: chemistry and technology. **Adv.Cereal Sci. Technol.**, v. 10, p. 147-241, 1990.

DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, v. 77, p. 67-82, 2006.

EGOUNLETY, M.; AWORH, O.C. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin, inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). **J. Food Eng.**, 56, p. 249–254, 2003.

EL-HADY, A.A.A.; HABIBA, R.A. Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. **Lebensm. Wiss. U. Technol.**, n. 36, p. 285-293, 2003.

ERME, I.; TURGUT-BALIK, D.; SAHIN, A. Electrophoretic Analysis of total protein profiles of some Lathyrus L. (Sect. Cicercula) Grown in Turkey. **Pak. J. Biol. Sci.**, v.10, N.17, p. 2890-2894, 2007.

EVENOPOEL, P.; HIELE, M.; GEYPENS, G.; GEBOES, K.P.; RUTGEERTS, P.; GHOOS, Y. C-egg white breath test: a non-invasive test of pancreatic trypsin activity in the small intestine. **Gut**, v.46, p.52-57, 2000.

FAO/WHO/UNU. Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU. **Technical Report Series**. WHO, Geneva, 1985. 724p.

FERNANDES, K.V.S.; XAVIER FILHO, J. The biological roles of legume seed vicilins (7S storage proteins). **Trends Comp. Biochem. Physiol.**, v. 4, p. 241-245, 1998.

FERNANDES, G.S. **Potencial de utilização de globulinas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.) como fonte alternativa de proteína de alta qualidade.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006. 97p.

FERNANDEZ-QUINTELA, A.; BARRIO, A.S.D.; MACARULLA, M.T.; MARTÍNEZ, J.A. Nutricional evaluation and metabolic effects in rats of protein isolates obtained from seeds of three legumes species. **J. Ethnopharmacol.**, v. 78, p. 251-260, 1998.

FREIRE, M.G.M.; GOMES, V.M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O.L.T.; SIMONE, S.G.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiol. Biochem.**, v.40, p. 61-68, 2002.

GARDA, E.C. **Atlas do meio ambiente do Brasil.** Brasília, Editora Terra Viva, 1996.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; BARBOSA, M.R.V.; BOCAGE NETA, A.L.; FIGUEIREDO, M.A. **Plantas endêmicas da caatinga.** In: Vegetação e flora das caatingas, p. 103-115, 2002.

GOMES, A.C.; BITENCOURT, M.D.; DÉLSIO NATAL, D.; PINTO, P.L.S.; MUCCI, L.F.; PAULA, M.B.; URBINATTI, P.R.; BARATA, J.M.S. *Aedes albopictus* in rural zone of Brazil and its implication in the sylvatic yellow fever transmission. **Rev. Saude Publica**, v.33, n.1, p. 95-7, 1999.

GOMES, M.A.F. **Padrões de caatinga nos Cariris Velhos, Paraíba.** Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Dissertação de Mestrado, 1979.

GOMES, V.M.; OKOROKOV, L.A.; ROSE, T.L.; FERNANDES, K.V.S.; XAVIER-FILHO, J. Legume vicilins (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1379, n. 2, p. 207-216, 1998.

GRANT, G.; DORWARD, P.M.; BUCHAN, W.C.; ARMOUR, J.C.; PUSZTAI, A. Consumption of diets containing raw soya beans (*Glycine max*), kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) cowpeas (*Vigna unguiculata*) or lupin seeds (*Lupinus angustifolius*) by rats for up to 700 days: Effects on body composition and organs weights. **Br. J. Nutr.**, v. 73, p. 17-29, 1995.

GUIMARÃES FILHO, C. Valorizando o bioma caatinga: o cabrito do Vale do São Francisco. **Bahia Agric.**, v. 7, n. 3. p. 31-38, 2006.

HAGERMAN, A. E. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. **J. Chem. Ecol.**, v. 13, p. 437-449, 1987.

HISSA, D.C.; VASCONCELOS, I.M.; CARVALHO, A.F.U.; NOGUEIRA, V.L.R.; CASCON, P.; ANTUNES, A.S.L.; MACEDO, G.R.; MELO, V.M.M. Novel surfactant proteins are involved in the structure and stability of noam nests from the frog *Leptodactylus vastus*. **J. Exp. Biol.**, v. 211, p. 2707-2711, 2008.

HOPFER, U. Digestão e absorção de constituintes nutricionais básicos. In: DEVLIN, T.M. (Ed.). **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., p. 888-915, 1998.

HOSSAIN, M. A.; BECKER, K. Nutritive value and antinutritional factors in different varieties of *Sesbania* seeds and their morphological fractions. **Food Chem.**, v. 73, v. 4, p. 421-431, 2001.

JI, C., KÚC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiol. and Mol. Plant Pathol.**, v. 49, p. 257-265, 1996.

KAKADE, M.L.; SIMONS, N.; LIENER, I.E. An evaluation of natural vs synthetic substrate for measuring the antitryptic of soybean samples. **Cereal Chem.**, v. 46, n. 4, p. 518-526, 1969.

KAPLAN, A. **The determination of urea, ammonia and urease.** In: GLICK, D. (Ed.) *Methods of biochemical analysis.* New York, USA: John Wiley & Sons, 1969. p. 311-314.

KAUR, D.; KAPOOR, A. C. Nutrient composition and antinutritional factors of rice bean (*Vigna umbellata*). **Food Chem.**, Barking, v. 43, n. 2, p. 119-124, 1992.

KELEMU, S., CARDONA, C., SEGURA, G. Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of *Clitoria ternatea*, a tropical forage legume. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 42, p. 867-873, 2004

KIMATI, H.; GIMENEZ-FERNANDES N.; SOAJE, J.; KUROZAWA, C; BRIGNANI NETO, F.; BETTIOL, W. **Guia de Fungicidas Agrícolas – Recomendações por Cultura**, v.1, 2ª ed. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1997, 225p.

KOEHNLE, T.J.; RUSSEL, M.C.; GIETZEN, D.W. Rats rapidly reject diets deficient in essential amino acids. **J. Nutr.**, v. 133, p. 2331-2335, 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 689-695, 1970

LAFONT, J.; ROUANET, J.M.; GABRION, J.; ZAMBONINO, I.J.L.; BESANCON, P. Duodenal toxicity of dietary *Phaseolus vulgaris* lectins in the rat an integrative assay. **Digestion**, v. 41, p. 83-93, 1988.

LAJOLO, F. M.; TIRAPEGUI, J. Proteínas e aminoácidos. In: DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. **Ciências Nutricionais.** São Paulo: Sarvier, p. 41-69, 1998.

LEAL, L.K.; NECHIO, M.; SILVEIRA, E.R.; CANUTO, K.M.; FONTENELE, J.B.; RIBEIRO, R.A.; VIANA, G.S. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 335-340, 2003.

LEAL, L.K.; NOBRE JÚNIOR, H.V.; CUNHA, G.M.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; OLIVEIRA, R.A.; SILVEIRA, E.R.; CANUTO, K.M.; VIANA, G.S. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neurosci. Lett.**, v. 11, n. 3, p. 86-90, 2005.

LEAL, L.K.; FONSECA, F.N.; PEREIRA, F.A.; CANUTO, K.M.; FELIPE, C.F.; FONTENELE, J.B.; PITOMBEIRA, M.V.; SILVEIRA, E.R.; VIANA, G.S. Protective effects of amburoside A, a phenol glucoside from *Amburana cearensis*, against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. **Planta Med.** v.74, n.5, p.497-502, 2008.

LIENER, I.E. Heat-labile antinutritional factors. In: SUMMERFIELD, R.J., BUNTING, A.H. (ed.). **Advances in legumes science**. London: Royal Botanical Gardens, v.1, n. 3, p. 157-170, 1980.

LIENER, I. E. The nutritional significance of the plant lectins. In: ORY, R. L. **Antinutrients and natural toxicants in foods**. Westport: Food & Nutrition Press, 1981. p. 143-157.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994.

LIS, H.; SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). **Ann. Rev. Biochem.**, v. 42, p. 541-574, 1973.

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

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 507p., 2002.

LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA., M.C.; MENDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W.; SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 199-206, 2005

MACORIS, M.L.G.; CAMARGO, M.F.; SILVA, I.G.; TAKAKU, L.; ANDRIGHETTI, M.T. Modificação da suscetibilidade de *Aedes aegypti* ao Temephós. **Rev. Patol. Trop.**, v. 24, p. 31-40, 1995.

MAHAN, L. K.; ARLIN, M. T. Proteínas. In: KRAUSE. **Alimentos, Nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 1992. p. 57-70.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Proteins. In: _____. **Krause's food, Nutrition and diet Therapy**. 9 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1998. Cap.5, p. 63-76.

MAIA, F. M. M. **Composição e caracterização nutricional de três cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. EPACE 10, OLHO DE OVELHA E IPA-206**. Dissertação de mestrado em bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996, 87p.

MAIA, F. M. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; MATOS, M. R. T.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M. 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.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. 1º ed. São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora, 2004. 413p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319 p.

MANCINI-FILHO, J.; LAJOLO, F. M.; VIZEU, D. M. Lectins from red kidney beans: radiation effect on agglutinating and mitogenic activity. **J. Food Sci.**, v. 44, n. 4, p. 1194-1196, 1979.

MARACAJÁ, P. B.; BATISTA, C. H. F.; SOUSA, A. H.; VASCONCELOS, W. E. Levantamento florístico e fitossociológico do extrato arbustivo- arbóreo de dois ambientes na Vila Santa Catarina, Serra do Mel, RN . **Rev. Biol. Cienc. Terra**, v. 3, n. 2, p. 20-33, 2003

MARQUÉZ, M.C.; ALONSO, R. Inactivation of trypsin inhibitor in chickpea. **J Food Comp. Anal.**, n. 12, p. 211-217, 1999.

MARTIN-TANGUY, J.; GUILLAUME, J.; KOSSA, A. Condensed tannins in horse bean seeds: chemical structure and apparent effects on poultry. **Journal Sci. Food Agric.**, v. 28, n. 8, p. 757-765, 1977.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C., URBANO, G., PORRES, J. M., FRIAS, J., VIDAL-VALVERDE, C. Improvement in food intake and nutritive utilization of protein from *Lupinus albus* var. *multolupa* protein isolates supplemented with ascorbic acid. **Food Chem.**, v. 103, p. 944-951, 2007.

MATOS, F. J. A., **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Edições UFC, Fortaleza, 1988. 128p.

MATOS, M. R. T. **Estudos bioquímicos e nutricionais de três cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** EPACE 11, PITÍUBA e TVu 1888. Dissertação de mestrado em bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997. 122p

MATOS, F. J. A. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. Sousa, M.P.; Oliveira, M.E. et al. Fortaleza: Editora UFC, 2004. 448p.

MECHI, R.; CANIATTI-BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V. Avaliação química, nutricional e fatores antinutricionais do Feijão-preto (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiado. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v.25, n.1, p.109-114, 2005.

MILLER, D. S.; BENDER, A. E. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. **Br. J. Nutr.**, v. 9, p. 382-388, 1955.

MINCOFF, P. C.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Isolation and characterization of a 30kD antifungal protein from seeds of *Sorghum bicolor*. **Res. Microbiol.**, v. 157, p. 326-332, 2006.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; BLOCH, M. F. de M. **Análise química de tecido vegetal**. Londrina: IAPAR, 1992. 17p. (Circular, 74).

MOREIRA, R. A.; BARROS, A. C. H.; STEWART, J. C.; PUSZTAI, A. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). **Planta**, v. 158, p. 63-69, 1983.

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

NACZK, M.; NICHOLS, T.; PINK, D.; SOSULSKI, F. Condensed tannins in canola hulls. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, n. 10, p. 2196-2200, 1994.

NEVEL, V. C.; RYCKE, H.; BEECKMANS, S.; WILDE, R.; DRIESSCHE, E. V. Inhibitory action of spray dried blood plasma and whole egg powder on lectins in extracts of several legume seeds: a qualitative approach. **J. Sci. Food Agric.**, v. 77, n. 3, p. 319-326, 1998.

NICOLSON, G. L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. **Int. Rev. Cytol.**, v. 39, p. 89-190, 1974.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido Brasileiro. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, supl., p. 05-08, 2003.

NUGDALLAH, G.A.; EL TINAY, A.H. Effect of cooking on cowpea protein fractions. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 51, n. 3, p. 277-282, 1997.

OLOYO, R.A. Chemical and nutritional quality changes in germinating seeds of *Cajanus cajan* L. **Food Chem.**, v. 85, p. 497-502, 2004.

ONWULIRI, V.A.; OBU, J.A. Lipids and other constituents of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* grown in northern Nigeria. **Food Chem.**, v.78, p.1-7, 2002.

OLIVEIRA, J. E. D.; VANNUCCHI, H. **The protein requirement of Brazilian rural works studies with a rice and a bean a diet.** In: RAND, W. M. Protein-energy requirements of developing countries: results of international research. Tokio: United University, p. 98-114, 1983.

OSBORN, R.W.; DE SAMBLANX, G.W.; THEVISSSEN, K.; GODERIS, I., TOREKENS, S., VAN LEUFEN, F., ATTENBOROUGH, H., REES, S.B., BROEKAERT, W.F. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. **FEBS Lett.**, v. 368, n. 2, p. 257-262, 1995

PEDALINO, M.; D'URZO, M. P.; COSTA, A.; GLILO,S.; RAO, R. Biochemical characterization of cowpea seed proteins. In: NG, N. Q., MONTI, L. M.(ed) **Cowpea genetic resources.** Thailand: Amarin Printing Group Co. Ltd., 1990, cap. 3, p. 81-89.

PELEGRINI, P. B.; NORONHA, E. F.; MUNIZ, M. A. R.; VASCONCELOS, I. M.; CHIARELLO, M. D.; OLIVEIRA, J. T. A.; FRANCO, O. L. An antifungal peptide from passion

fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1764, p. 1141-1146, 2006.

PEUMANS, K. J.; VAN DAME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 7, p. 132-138, 1996.

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

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 1, p. 179-187, 2006

PORTER, D. H.; SWAISGOOD, H. E.; CATIGNAGI, G. L. Characteristics of on the immobilized digestive enzyme system for determination of protein digestibility. **J. Agric. Food Chem.**, v. 32, p. 334-339, 1984.

PROLL, J.; PETZKE, J.; EZEAGU, E. I.; METGES, C. C. Low nutritional quality of unconventional tropical crop seeds in rats. **J. Nutr.**, v.128, n.11, p.2014-2022, 1998.

PUSZTAI, A. Lectins. In: CHEEK, P.R. **Toxicants of plant origin: proteins and aminoacids**. v.3, Boca Raton : CRC Press, 1989. p.29-71.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenamento de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 666p, 2000.

RAIKHEL, N. V.; LEE, H. I.; BROEKAERT, W. F. Structure and function of chitin-binding proteins. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 44, p. 591-615, 1993.

RAMOS, M. V.; BANDEIRA, G. P.; FREITAS, C. D. T., NOGUEIRA, N. A. P., ALENCAR, N. M. N.; SOUSA, P. A. S.; CARVALHO, A. F. U. Latex constituents from *Calotropis procera*

(R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol. 101, n. 5, p. 503-510, 2006.

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

RIBEIRO, S. F. F.; AGIZZIO, A. P.; MACHADO, O. L. T.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; OLIVEIRA, M. A.; FERNANDES, K. V. S.; CARVALHO, A. O.; PERALES, J.; GOMES, V. M. A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: partial characterization and antifungal activity. **Sci. Hort.**, v. 111, p. 399-405, 2007.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil – manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Edgar Blucher, 294p., 1978.

ROBERTS, W. K.; SELITRENNIKOFF, C. P. Zeamantin, an antifungal protein from maize with membrane permeabilizing activity. **J. Gen. Microbiol.**, v. 136, p. 1771-1778, 1990.

RODAL, M. J. N. **Fitossociologia da vegetação arbustivo-arbórea em quatro áreas da caatinga em Pernambuco**. Campinas, Universidade Estadual de Campinas. Tese de doutorado, 1992.

RUBIO, L. A.; GRANT, G.; DAGUID, T.; BROWN, D.; PUSZTAI, A. Organs relative weight and plasma amino acid and concentrations in rats fed diets based on whole legumes (faba bean, lupin, chickpea, defatted soybean) seed meals or their fractions. **Journal Sci. Food Agric.**, v. 79, p. 187-194, 1999.

RUIZ, M. A.; SOTELO, A. Chemical composition, nutritive value, and toxicology evaluation of mexican wild lupins. **J. Agric. Food Chem.**, vol.49, p. 5336-5339, 2001.

SÁ, R. A.; SANTOS, N. D. L.; SILVA, C. S. B.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; CAVADA, B. S.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comp. Biochem. Phys. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 149, n. 3, p. 300-306, 2008.

SALES, M. P.; GERHARDT, I. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; XAVIER-FILHO, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **J. Plant Physiol.**, v. 124, p. 515-522, 2000.

SALUNKHE, D. K.; JADHAV, S. J.; KADAM, S. S.; CHAVAN, J. K. Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.17, n.3, p.277-305, 1982.

SAMPAIO, E. V. S. B. **Overview of the Brazilian Caatinga**. In: Bullock, S.H.; Mooney, H.A.; Medina, E.; Seasonally dry forests. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. p. 35-58, 1995.

SAMPAIO, E. V. S. B. **Vegetação e flora da caatinga**. Everardo V. S. B. Sampaio; Giuliatti, A. M.; Virgínio, J; Gamarra-Rojas, C. F. L. Recife: Associação Plantas do Nordeste- APNE, 76p., 2000.

SANTOS, J. E.; HOWE, J. M.; DUARTE, F. A. M.; OLIVEIRA, J. E. D. Relationship between the nutritional efficacy of a rice and bean diet and energy intake in pre-school children. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 32, n. 1, p. 541-544, 1979.

SANTOS, M. F. A. V.; RIBEIRO, M. R.; SAMPAIO, E. V. S. B. Semelhanças vegetacionais em sete solos de caatinga. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, n. 27, p. 305-314, 1992.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analyt. Biochem.** v. 166, p. 368-379, 1987.

SGARBIERI, V. C.; WHITAKER, J. R. Physical, chemical and nutritional properties of common beans (*Phaseolus vulgaris*) proteins. **Adv. Food Res.**, v. 28, n. 3, p. 93-166, 1982.

SGARBIERI, V. C. Fontes de proteínas na alimentação. In: _____. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações**. São Paulo: Varela, 1996. p. 139-257.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. **Adv. Bot. Res.**, v. 26, p. 135-192, 1997.

SENNA, S.; SRIDHAR, K. R.; JUNG, K. Nutritional and antinutritional evaluation of raw and processed seeds of a wild legume, *Canavalia cathartica* of coastal sand dunes of India. **Food Chem.**, v.92, p. 465-472, 2005.

SERUFO, J. C.; OCA, H. M.; TAVARES, V. A.; SOUZA, A. M.; ROSA, R. V.; JAMAL, M.C; LEMOS, J. R.; OLIVEIRA, M. A.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G. Isolation of dengue type-1 from larvae of *Aedes albopictus* in the Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 88, n.3, p. 503-4, 1993.

SILVA, M. R.; DA SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais: Fitatos e taninos. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 1, p. 21-32, 1999.

SILVA, M. R.; DA SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 3-9, 2000.

SILVA, J. M. C.; OREN, D. C. Geographic variation and conservation of the Moustached Woodcreeper (*Xiphocolaptes falcirostris*), an endemic and threatened species of northeastern Brazil. **Bird Conserv. Int.**, v. 7, p. 263-274, 1997.

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para conservação**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente: Universidade Federal de Pernambuco, 382p. 2004.

SIRKO, A.; BRODZICK, R. Plants ureases: roles and regulation. **Acta Biochim. Pol.**, v. 47, n. 4, p. 1189-1195, 2000.

SOTELO, A; MIGLIARO, P.; TOLEDO, A.; CONTRERAS, J. Chemical composition, digestibility and antinutritional factors content of two wild legumes: *Styphonolobium burseroides* and *Acacia bilimeki* . **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 54, p. 59-65, 1999

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C.; SANTOS, A. M. M.; VICENTE, A. **Análise da representatividade das unidades de conservação de uso direto e indireto na Caatinga: análise preliminar**. In: Silva, J.M.C. & Tabarelli, M. (coord.), Workshop Avaliação e Identificação de Ações Prioritárias para a Conservação, Utilização Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade do Bioma Caatinga. Petrolina, Pernambuco. <www.biodiversitas.org.br>. Acesso em: 23.12.2008

TANAKA, A. S.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, M. V. Purification and preliminary characterization of *Torresea cearensis* trypsin inhibitor. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 22, n. 9, p. 1069-71, 1989.

TANAKA, A. S.; SAMPAIO, C. A. M.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E. A.; SAMPAIO, C. A. M. Sequence of a New Bowman-Birk inhibitor from *Torresea acreana* seeds and comparison with *Torresea cearensis* trypsin inhibitor. **J. Protein Chem.**, v. 15, p. 555-562, 1996.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos de controle de dengue no Brasil. **Cad. Saude Publica**, v.18, n.3, 2002

THOMMA, B.P.H.J.; CAMMUE, B.P.A.; THEVISSSEN, K. Plant defensins. **Planta**, v. 216, p. 193-202, 2002.

THOMPSON, L.U. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. **Food Res. Int.**, v. 26, p. 131–149, 1993.

TRUGO, L.C.; DONANGELO, C.M.; TRUGO, N. M. F.; BACHKNUDSEN, K. . Effect of heat treatment on nutritional quality of germinated legume seeds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 2082-2086, 2000.

UZOGARA, S.G., OFUYA, Z.M. Processing and utilization of cowpeas in developing countries: a review. **J. Food Process Preserv.**, v. 16, p. 105-147, 1992.

VANDIVEL, V.; JANARDHANAN, K. Nutritional and Antinutritional characteristics of seven south Indian wild legumes. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 60 p. 69-75, 2005

VASCONCELOS, I. M. ; TRENTIM, A. ; GUIMARÃES, J. A. ; CARLINI, C. R. . Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybean (*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, A.F.; CAMPELO, G.J.A.; OLIVEIRA J.T.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.; CARVALHO, A. F. F. U., MELO, V. M. M.; CARLINI, C. R.; CASTELLAR, L. I. M. 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.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional Properties of Plant Lectins. Review.. **Toxicon.**, Gra-Bretanha, v. 44, p. 385-403, 2004.

VASCONCELOS, I. M.; CAMPELLO, C. C.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. U.; SOUZA, D. O. B.; MAIA, F. M. M. Brazilian soybean *Glycine max* (L.) Merr. cultivars adapted to low latitude regions: seed composition and content of bioactive proteins. **Rev. Brasil. Bot.**, v. 29, n. 4, p. 617-625, 2006.

VASCONCELOS, I. M.; MORAIS, J. K. S.; SIEBRA, E. A.; CARLINI, C. R.; SOUSA, D. O. B.; BELTRAMINI, L. M.; MELO, V. M. M.; OLIVEIRA, J. T. A. SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other toxic soybean [*Glycine max*] proteins and its inhibitory effect on *Cercospora sojina* growth. **Toxicon**, v. 51, p. 952-963, 2008.

WANG, X.; BUNKERS, G.J.; WALTERS, M.R.; THOMA, R.S. Purification and characterization of three antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 282, p. 124-1228, 2001.

WANG, H.X.; NG, T.B. An antifungal protein from the pea *Pisum sativum* var. arvense Poir. **Peptides**, v. 27, p. 1732-1737, 2006.

WANG, H.X.; NG, T.B. An antifungal peptide from red lentil seeds. **Peptides**, v. 28, p. 547-552, 2007.

WARE, J.H., WAN, X.S., RUBIN, H., SCHECHTER, N.M. AND KENNEDY, A.R. Soybean Bowman-Birk protease inhibitor is a highly effective inhibitor of human mast cell chymase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 344, n. 1, p. 133-138, 1997.

WEBER, E. A. **Armazenagem Agrícola**. Guaíba: Agropecuária, 396 p., 2001

WONG, J.H., NG., T.B. Vulgarinin, a broad-spectrum antifungal peptide from haricot beans (*Phaseolus vulgaris*). **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 37, p. 1626-1632, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva; p.84, 1997.

ZADOKS, J.C. The costs of change in plant protection. **J. Plant Protec.**, v. 9, p. 151-159, 1992.