

PROTEÍNAS DA SEMENTE DE FAVELA (*Cnidoscolus phylla-*  
*canthus*, Pax & K. Hoffm): EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E  
ASPECTOS NUTRICIONAIS

Euclides Alves de Moraes

---

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários  
à obtenção do grau de  
MESTRE EM BIOQUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

1 9 7 8

[Redacted]

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição do material contido nesta dissertação é permitida desde que se faça a citação apropriada.

[Redacted]

Euclides Alves de Morais

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

\_\_\_\_\_  
Renato de Azevedo Moreira  
Orientador da Dissertação

\_\_\_\_\_  
D a t a

\_\_\_\_\_  
José Xavier Filho

\_\_\_\_\_  
D a t a

\_\_\_\_\_  
Iracema Lima Ainouz

\_\_\_\_\_  
D a t a



À memória de meus pais,  
a minha esposa  
e meu filho

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Renato de Azevedo Moreira, pela orientação criteriosa com os seus conhecimentos científicos, cujo incentivo e apoio possibilitaram a solução de difíceis problemas.

Aos professores José Xavier Filho e Iracema Lima Ainous, pelas criteriosas sugestões proporcionadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao laboratorista Joaquim Gomes Marques, pelo auxílio nas determinações preliminares deste trabalho.

A todos os professores e colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelo ambiente de trabalho, cooperação e estímulo.

Ao professor Jerônimo Vingt-Un Rosado Maia pela sugestão na escolha do material, objeto de estudo deste trabalho.

Ao professor Alcir Leopoldo Dias da Silveira, pela revisão do português.



Este trabalho foi realizado graças às seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES/CID), pela bolsa de Pós-Graduação concedida ao autor e pelo convênio com o curso de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios foi executada esta pesquisa.

Escola Superior de Agricultura de Mossoró e a seu Diretor professor Ari Pinheiro Amorim, pela oportunidade de impressão deste trabalho.

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.



## ÍNDICE GERAL

|   | Página |
|---|--------|
| I - INTRODUÇÃO.....   | 1      |
| II - MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 10     |
| A - MATERIAIS.....  | 10     |
| B - MÉTODOS.....  | 11     |
| 1. Semente de favela.....   | 11     |
| 2. Preparação da farinha.....   | 11     |
| 3. Análise elementar.....   | 11     |
| 3.1. Determinação de umidade.....   | 11     |
| 3.2. Determinação do nitrogênio total....   | 12     |
| 3.3. Determinação de lipídios totais.....   | 12     |
| 3.4. Determinação do teor de cinzas.....  | 13     |
| 4. Dosagem de proteínas.....  | 13     |
| 5. Ensaio de hemaglutinação.....  | 14     |
| 6. Extração de proteínas.....   | 14     |
| 6.1. Extração a diferentes valores de pH.   | 15     |
| 6.2. Extração a diferentes concentrações<br>salinas.....  | 15     |
| 6.3. Extração com tampões a diferentes va<br>lores de pH e concentrações salinas<br>diferentes..... | 15     |
| 7. Fracionamento das proteínas.....   | 16     |
| 7.1. Fracionamento das proteínas totais..   | 16     |



|   | Página |
|---|--------|
| 7.2. Fracionamento das albuminas por precipitação salina.....                       | 16     |
| 7.3. Fracionamento das proteínas em Sephadex G-100.....                             | 17     |
| 7.4. Cromatografia em DEAE-celulose.....  | 17     |
| 7.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida ..                                       | 18     |
| 7.5.1. Eletroforese em pH 8,1.....  | 18     |
| 7.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.....                           | 19     |
| 7.5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e $\beta$ -mercaptoetanol..... | 19     |
| 8. Composição em aminoácidos.....   | 20     |
| 8.1. Determinação de 1/2-cistina e metionina.....                                   | 21     |
| 8.2. Espectro de absorção e dosagem do triptofano.....                              | 22     |
| 9. Ensaio biológico.....  | 22     |
| III - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 25     |
| 1. Semente de favela.....   | 25     |
| 2. Preparação da farinha delipidada.....  | 25     |
| 3. Análise elementar.....   | 25     |
| 3.1. Determinação de umidade.....   | 25     |
| 3.2. Determinação do nitrogênio total....   | 26     |



|   | Página |
|---|--------|
| 3.3. Determinação de lipídios totais.....   | 26     |
| 3.4. Determinação de cinzas.....  | 28     |
| 4. Extração das proteínas de favela.....  | 28     |
| 4.1. Efeito do pH.....  | 28     |
| 4.2. Efeito do cloreto de sódio.....  | 30     |
| 4.3. Extração com tampões.....  | 30     |
| 5. Fracionamento de proteínas.....  | 33     |
| 5.1. Fracionamento das proteínas totais..   | 33     |
| 5.2. Fracionamento das albuminas por precipitação com sulfato de amônio.....        | 36     |
| 5.3. Fracionamento das proteínas em Sephadex G-100.....                             | 36     |
| 5.3.1. Cromatografia do extrato total.  | 36     |
| 5.3.2. Cromatografia das globulinas.  | 39     |
| 5.3.3. Cromatografia das albuminas..  | 39     |
| 5.4. Cromatografia em DEAE-celulose.....  | 42     |
| 5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida.   | 47     |
| 5.5.1. Eletroforese em pH 8,1.....  | 47     |
| 5.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.....                           | 49     |
| 5.5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e $\beta$ -mercaptoetanol..... | 51     |
| 6. Composição em aminoácidos.....   | 54     |



|   | Página |
|---|--------|
| 6.1. Espectro de absorção.....              | 60     |
| 7. Escore químico da farinha de favela..... | 62     |
| 8. Toxidez.....                             | 64     |
| 8.1. Toxidez "in vitro".....                | 64     |
| 8.2. Toxidez "in vivo".....                 | 64     |
| IV - CONCLUSÕES.....                        | 68     |
| V - BIBLIOGRAFIA.....                       | 71     |

## ÍNDICE DE TABELAS

| Tabela   | Página |
|--|--------|
| 1. Composição, em gramas, das dietas usadas no ensaio biológico.....   | 24     |
| 2. Análise elementar dos principais constituintes da semente de favela.....  | 27     |
| 3. Extração sucessiva das proteínas da semente de favela   | 35     |
| 4. Fracionamento das albuminas de semente de favela por precipitação com sulfato de amônio.....  | 37     |
| 5. Composição em aminoácidos da farinha delipidada e das diferentes frações proteicas de semente de favela expressa em g de aminoácidos por 100 g de amostra.....                | 55     |
| 6. Composição em aminoácidos da farinha delipidada e das diferentes frações proteicas de semente de favela expressa em g de aminoácidos por 100g de aminoácidos recuperados..... | 56     |
| 7. Composição em aminoácidos da farinha delipidada e das diferentes frações proteicas de semente de favela expressa em g de aminoácidos por 16g de nitrogênio.....               | 57     |
| 8. Umidade, nitrogênio total e proteína bruta das amostras utilizadas nas análises de aminoácidos....  | 58     |
| 9. Cálculo do escore químico da farinha de favela....  | 63     |



## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura  | Página |
|---|--------|
| 1. Efeito do pH sobre a extração das proteínas de semente de favela.....  | 29     |
| 2. Efeito da concentração de NaCl sobre a extração das proteínas da semente de favela.....                              | 31     |
| 3. Extração das proteínas de semente de favela com tampões a diferentes valores de pH e concentrações de NaCl.....      | 32     |
| 4. Esquema de obtenção dos três principais grupos de proteínas encontrados na farinha da semente de favela.....         | 34     |
| 5. Cromatografia em Sephadex G-100 do extrato total de favela.....  | 38     |
| 6. Cromatografia em Sephadex G-100 das globulinas de favela.....  | 40     |
| 7. Fracionamento das albuminas de favela em Sephadex G-100.....   | 41     |
| 8. Cromatografia em DEAE-celulose da albumina total..   | 43     |
| 9. Cromatografia em DEAE-celulose da fração albumínica precipitada entre 40-60% de saturação com sulfato de amônio..... | 44     |



|  | Página |
|--|--------|
| 10. Cromatografia em DEAE-celulose da fração albumínica precipitada em 60-80% de saturação com sulfato de amônio.....      | 45     |
| 11. Cromatografia em DEAE-celulose da fração albumínica precipitada em 80-100% de saturação com sulfato de amônio.....     | 46     |
| 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida em tampão TRIS-glicina pH 8,1 de frações proteicas de semente de favela.....     | 48     |
| 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS de frações proteicas de semente de favela.....                           | 50     |
| 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e $\beta$ -mercaptoetanol de frações proteicas de semente de favela..... | 52     |
| 15. Espectro de absorção na região do ultravioleta, de frações proteicas de semente de favela.....                         | 61     |
| 16. Variação percentual de peso de camundongos alimentados com diferentes dietas.....                                      | 65     |



## ABREVIATURAS

|         |   |  |
|---------|---|--|
| Ala     | : | alanina  |
| Arg     | : | arginina   |
| Asp     | : | ácido aspártico  |
| 1/2-Cis | : | meia cistina   |
| Fen     | : | fenilalanina   |
| Gli     | : | glicina  |
| Glu     | : | ácido glutâmico  |
| His     | : | histidina  |
| Ile     | : | isoleucina   |
| Leu     | : | leucina  |
| Lis     | : | lisina   |
| Met     | : | metionina  |
| Pro     | : | prolina  |
| Ser     | : | serina   |
| Tir     | : | tirosina   |
| Tre     | : | treonina   |
| Tri     | : | triptofano   |
| Val     | : | valina   |
| INAN    | : | Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição             |
| PBDCT   | : | Plano Básico de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |

NPR : net protein ratio  
PER : protein efficiency ratio  
SDS : sódio-dodecil sulfato  
TEMED : N,N,N',N'- tetrametiletlenodiamina  
TRIS : 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol  
(trishidroximetilaminometano)  
DEAE-celulose : dietil-amino-etil-celulose



## SUMÁRIO

Visando o aproveitamento da semente de favela na alimentação tanto humana como animal, foi feito um estudo de extração, fracionamento e composição de aminoácidos de suas proteínas.

Para se determinar qual o meio que extrai uma maior quantidade de proteínas foram feitas extrações em diversas soluções onde se variou o pH e a concentração salina, tendo-se encontrado como ideal NaCl 1% em tampão borato de sódio 0,1M pH 10,0 .

Foram feitas extrações com o tampão acima, sendo o extrato total dialisado contra tampão acetato de sódio 0,033 M pH 5,0 seguido por diálise contra água, para se obterem as albuminas e globulinas. O resíduo desta extração foi reextraído com NaOH 0,1N , obtendo-se assim as glutelinas.

As albuminas foram fracionadas por sulfato de amônio, nas faixas 0-40 , 40-60 , 60-80 e 80-100% de saturação.

Extrato total, globulinas, albuminas e as frações de albumina precipitadas com sulfato de amônio foram submetidas a cromatografias em Sephadex G-100 e DEAE-celulose, eletroforese a pH 8,1 e eletroforese em presença de SDS com e sem  $\beta$ -mercaptoetanol.

Foi feito um estudo da composição de aminoácidos da farinha de favela e das diversas frações proteicas. Comparan-

do-se os resultados obtidos com níveis recomendados pela FAO, pode-se ter uma idéia do valor nutritivo dessas amostras.

Foram feitos ainda testes biológicos utilizando-se a farinha de favela na alimentação de camundongos durante 15 dias e o ganho de peso comparado com dietas controle.



## I. INTRODUÇÃO

A situação alimentar da humanidade está longe de ser considerada satisfatória. Cerca de dois terços da população mundial carecem de alimentação adequada. Assim o problema de um suprimento conveniente de alimento para a população do globo é da máxima prioridade atualmente. Novos meios de produção, novos alimentos, novos meios de preservação, enfim, diversos caminhos vêm sendo considerados como armas de combate à fome (1).

O alimento constitui preocupação e ocupação diárias do homem, visto que, nos dias atuais, quando as estatísticas acusam o aumento das populações em progressão geométrica e a produção de alimentos quase se mantém estacionária, isto deixa de ser um problema do indivíduo e passa a ser um problema principalmente governamental (2). A assistência internacional à agricultura é hoje mais necessária do que nunca a fim de que os países em desenvolvimento possam aproveitar as novas oportunidades de se integrarem em definitivo no rol de uma sociedade bem alimentada.

Se já é possível tirar proveito das oportunidades que são oferecidas, existe uma justificada esperança de que a situação alimentar melhore muito mais rapidamente do que tem sido possível até agora, e que se consiga um equilíbrio apropriado entre a população e as disponibilidades de alimentos. Por



outro lado, a persistência de uma explosão demográfica sem controle poderá dar lugar a que estas esperanças se dissipem (3).

As estatísticas mundiais indicam que um bilhão de pessoas vêm sofrendo fome e má nutrição nos últimos anos, que dez milhões de crianças estão tão seriamente mal nutridas que suas vidas estão em perigo, que quatrocentos milhões de pessoas estão no limiar do jejum e que doze mil pessoas morrem de fome cada dia. Diante deste quadro, muitos cientistas estão procurando desenvolver fontes de proteínas de baixo custo que possam ser empregadas na complementação das dietas das classes menos favorecidas (4, 5).

As tendências atuais no preparo de alimentos vão em direção à fabricação de alimentos a partir de elementos básicos, como as proteínas, com ênfase muito maior em suas propriedades funcionais e nutricionais do que em relação a sua pureza. A compreensão das propriedades das proteínas pode fornecer novos conhecimentos da função ou valor nutricional dos alimentos (6).

As sementes de oleaginosas juntamente com sementes de legumes são as mais promissoras fontes de proteínas vegetais. Produtos de origem animal abastecem, acima de um terço da proteína, na dieta humana, ao passo que as proteínas vegetais entram na proporção de 50 a 75% do total das necessidades, sendo que grãos de cereais, sementes oleaginosas e legumes constituem os três grupos principais de plantas que fornecem



proteínas para a alimentação (7). Ainda que certas proteínas vegetais sejam pobres em alguns aminoácidos, elas são fontes importantes de proteína em muitas partes do mundo, onde a viabilidade de proteína animal não é adequada (8).

Nas últimas décadas, com a evolução das técnicas de análise de aminoácidos, ocorreu um grande desenvolvimento no setor das investigações em bioquímica e nutrição. Um fator de grande importância reside principalmente em três setores da pesquisa: estudos estruturais das proteínas, principalmente da sua composição em aminoácidos e da seqüência dos mesmos na cadeia polipeptídica; caracterização qualitativa e dosagem quantitativa dos aminoácidos em diferentes tecidos; determinação da composição em aminoácidos de produtos alimentícios, com o fim de conhecer o seu valor nutritivo no que diz respeito às exigências em aminoácidos pelas diferentes espécies animais e pelo homem (9).

Os principais aminoácidos conhecidos como integrantes das proteínas de origem animal são em número de vinte, alguns dos quais considerados essenciais pelo fato de não serem sintetizados pelo organismo na mesma velocidade em que são utilizados em novas sínteses. Para que esses aminoácidos sejam incorporados à estrutura das proteínas, precisam ser administrados na dieta, como constituintes das proteínas alimentares (10).

O valor nutritivo de uma proteína depende do conteúdo e das proporções adequadas dos chamados aminoácidos essen-



ciais ou indispensáveis. Assim, se as exigências orgânicas para esses aminoácidos fossem perfeitamente conhecidas e se os aminoácidos nas proteínas dos alimentos fossem totalmente aproveitados pelo organismo, poderia ser possível se predizer com certa precisão o valor nutritivo de uma proteína, baseando-se simplesmente em sua composição em aminoácidos (11).

O primeiro problema que surge é que as exigências para os diferentes aminoácidos, em diferentes idades e estados fisiológicos, ainda não foram determinadas. A primeira proposição neste sentido foi a de Block e Mitchell (12, 13) que tomaram a composição em aminoácidos do ovo integral como padrão, atribuindo-lhe um valor biológico igual a 100. Esses autores dividiram a quantidade do aminoácido limitante da proteína em estudo pela quantidade do mesmo aminoácido no ovo integral e deram a esse quociente, expresso em percentagem, a denominação de escore químico.

Os aminoácidos necessários para a manutenção do equilíbrio de nitrogênio em ratos foram determinados por Rama Rao e col. (14) como sendo valina, isoleucina, leucina, treonina, metionina, histidina, lisina, arginina, fenilalanina e triptofano. Por outro lado Rose e col. (15) discutiram os efeitos específicos dos aminoácidos arginina e histidina e mostraram que esses aminoácidos são considerados dispensáveis na dieta humana.

O maior problema com relação à determinação de ami-



noácidos em alimentos consiste em que nem todos os aminoácidos determinados quimicamente estão disponíveis fisiologicamente para os animais ou para o homem. Isto se deve, principalmente, à interação que pode ocorrer entre aminoácidos e outros constituintes dos alimentos. Este tipo de interação é estimulado e se torna particularmente importante durante o processamento dos alimentos, onde se observa uma diminuição na disponibilidade biológica dos aminoácidos, decréscimo na digestibilidade das proteínas e, conseqüentemente, diminuição do valor nutritivo das proteínas (9).

Karakoltsidis and Constantinidis (16) estudando sementes de quiabo e comparando-as com outras sementes como soja, algodão, etc. encontraram uma composição de aminoácidos semelhante à da soja, todavia quando essas proteínas eram ministradas na alimentação de ratos, o desenvolvimento era mais efetivo e o valor de PER revelou ser superior ao daqueles alimentados com proteínas de soja.

Verifica-se que o papel desempenhado pelas plantas na alimentação humana é de alta importância, apesar de contem uma variedade de substâncias que são consideradas tóxicas para os animais. Estão incluídas neste grupo, as hemaglutininas, glicosídeos cianogênicos, fatores bociogênicos, inibidores de tripsina e quimiotripsina, e que são considerados fatores antinutricionais, porém são destruídos total ou parcialmente pela ação do calor (17).



Alguns autores mostram que existe um aumento acentuado no valor nutricional da proteína da soja, após o aquecimento, devido a um melhor aproveitamento dos aminoácidos sulfurados (18 , 19). Estudo neste sentido foi feito por Cabral, L.C. (20), usando farinha de soja integral cozida, na alimentação de ratos. Os valores de PER e NPR revelaram que o aquecimento e conseqüente destruição de algumas substâncias tóxicas não trazem danos ao valor nutricional das suas proteínas.

Um dos grandes óbices a uma maior oferta de produtos agropecuários, e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do setor agrícola, é a baixa produtividade da terra. No Nordeste brasileiro, esta situação não permite uma remuneração satisfatória ao agricultor, devido à adoção de tecnologia e práticas completamente obsoletas, na grande maioria justificadas pela escassez de informações concretas acerca de métodos mais modernos de exploração agrícola. A constatação dessa realidade levou órgãos, como a SUDENE, a vastos e ambiciosos programas de pesquisas e experimentação agropecuárias em todo o Nordeste (21).

Entre os programas que constituem o II Plano Básico de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (II PBDCT), destaca-se o melhoramento das xerófilas nativas, existentes no Nordeste semi-árido com possibilidades de exploração econômica. Várias espécies, como favela, oiticica, umbu, caju, carnaúba, macambira, caroá, palma, maniçoba, estão sendo incluídas em programas de pesquisas (22).



Analisando os projetos desenvolvidos pelos órgãos governamentais, verifica-se que eles são em geral de natureza agrônômica, quando na realidade outros aspectos deveriam ser salientados, como os aspectos químico e biológico, uma vez que é de interesse não só a obtenção de variedades mais produtivas ou mais resistentes, bem como culturas que proporcionem um alto teor em aminoácidos essenciais.

A ciência e tecnologia deverão desempenhar importante papel para os programas governamentais que envolvem nutrição, dada a significação deste aspecto para promoção, preservação e restauração da saúde da população brasileira, especialmente em determinadas regiões ou faixas etárias.

As diretrizes básicas da ciência e tecnologia, neste setor, são desenvolvidas, principalmente, através do Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição (INAN), procurando modificar as condições nutricionais imperantes no país; minorar os problemas da má nutrição de grupos prioritários; diminuir a prevalência das enfermidades nutricionais e lograr um estado nutricional ótimo para a população (22).

As condições especiais do clima e do solo do sertão nordestino determinaram uma associação de plantas típicas, onde entre muitas espécies, sobressaem plantas de grande valor econômico. Esta região sem similar no mundo pelas suas características ecológicas, se constitui, de acordo com Duque (23), num refúgio para o nordestino onde ele busca meios de sobrevi-



vência, principalmente em épocas de seca, quando lhe falta o alimento.

Com o fim de ampliar e intensificar as atividades de pesquisa e experimentação com as principais oleaginosas nativas, é que nos propusemos a estudar o faveleiro (*Cnidoscolus phyllacanthus* Pax & K. Hoffm), planta da família das Euforbiáceas. Xerófila por excelência, habitando os tabuleiros rasos e pedregosos dos sertões mais secos do Nordeste, encontra-se desde o Piauí até o estado da Bahia. O faveleiro como planta nativa atinge de três a cinco metros de altura, irregularmente esgalhada, lactescente, profusamente armada de espinhos cáusticos. Folhas longas, grossas, lanceoladas, profundamente recortadas, com pequenos acúleos no limbo e espinhos nas nervuras. Flores alvas, hermafroditas, de quatro milímetros de diâmetro, em pequenos cachos axilares e terminais. Cápsula deiscente contendo três sementes parecidas com sementes de mamona. As folhas maduras e a casca servem de forragem a caprinos, ovinos, muares e bovinos (24).

Entretanto a grande importância da favela está em sua semente à qual recorrem os sertanejos em épocas de carência, comendo-a pilada (25). Os estudos realizados com esta semente revelaram tratar-se de uma promissora fonte de óleo comestível e com um alto teor de proteína bruta (26, 27).

A alta resistência dessa planta às secas, por si só, justifica este trabalho e permite a sua continuidade, levando-



se em conta, entre outros aspectos, a exploração racional dessa planta e um possível estudo de melhoramento genético.

O presente trabalho foi desenvolvido visando o aproveitamento da semente de favela como uma nova fonte de proteína na alimentação animal. O estudo realizado permitiu um maior conhecimento da composição química de suas sementes, principalmente em relação ao comportamento biológico de suas proteínas e outras propriedades relacionadas ao fracionamento e composição em aminoácidos.



## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### A. MATERIAIS

As sementes de favela (*Cnidoscolus phyllacanthus* Pax & K. Hoffm) utilizadas neste trabalho foram colhidas de plantas nativas localizadas no município de Mossoró, Rio Grande do Norte.

Nos ensaios biológicos foram utilizados: farelo de trigo, Avecedo de Moinhos Fortaleza, S.A., amido de milho, Maizena de "Refinações de Milho Brasil Ltda", Óleo de milho "Gostosura" de Correia Industrial e Comércio, S.A., Caseína para uso biológico, segundo Hammarsten, de Carlo Erba. Albumina sérica bovina de "Sigma Chemical Company", Todos os demais reagentes foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

Os animais utilizados nos testes biológicos foram camundongos Suíços Albinos obtidos do laboratório Alfa Conlab, Fortaleza, Ceará.



## B. MÉTODOS

### 1. Semente de favela

Várias amostras contendo 100 sementes foram pesadas em balança analítica, para cálculo do peso médio por semente. Foi determinada ainda a relação entre peso do tegumento (casca) e peso da amêndoa (endosperma e cotilédones).

### 2. Preparação da farinha

Após a eliminação do tegumento das sementes, elas foram trituradas e deixadas em hexana durante 16 horas à temperatura ambiente de 28°C. A hexana foi decantada e as amêndoas secas pulverizadas em almofariz. O material assim obtido foi novamente tratado com hexana por 16 horas. O solvente foi decantado, o material foi secado ao ar e passado em uma peneira de 50 malhas/pol<sup>2</sup>.

### 3. Análise elementar

#### 3.1. Determinação de umidade

Para determinar a umidade, pesa-filtros contendo de 1 a 3g de amostra foram colocados em estufa a 110°C durante 24 horas, após o que foram mantidos em um dessecador até atingir



a temperatura ambiente. Os pesa-filtros foram pesados e colocados em estufa por mais 3 horas, repetindo-se a etapa anterior até a obtenção de pesos constantes. O teor de umidade foi calculado pela relação entre o peso perdido por aquecimento e o peso da amostra, e expresso em percentagem.

### 3.2. Determinação do nitrogênio total

O nitrogênio total foi dosado pelo método semi-micro-Kjeldahl (28) na semente íntegra, na amêndoa, na farinha delapidada e em algumas frações proteicas.

Para mineralização foram utilizadas amostras de 40 a 50 mg, às quais foram adicionados 3 ml de ácido sulfúrico concentrado e 0,5 ml de uma solução de sulfato de mercúrio a 14%. Após a mineralização, as amostras foram diluídas com água bidestilada para um volume de 100 ml. Para a destilação foram usadas alíquotas de 10 ml desta solução, às quais foram adicionados 12 ml de NaOH 50%, 200 mg de zinco em pó e 2 ml de tiosulfato de sódio 20% (29). A amônia liberada foi coletada em 10 ml de ácido bórico 2% e titulada com HCl 0,01N.

### 3.3. Determinação de lipídios totais

O teor de lipídios totais foi determinado essencialmente conforme descrito por Triebold (30), substituindo-se éter



por hexana. Amostras contendo de 4 a 5g foram pesadas em cartuchos de papel de filtro e colocadas em um extrator Soxhlet com hexana normal. A extração foi efetuada por 3 horas, depois que o solvente foi evaporado em banho-maria a 70°C, pesando-se posteriormente o extrato hexânico. O teor de lipídios foi calculado como a relação entre o peso do resíduo do balão de extração (lipídios extraídos) e o peso seco da amostra, e expresso em percentagem.

#### 3.4. Determinação do teor de cinzas

Para determinar o teor de cinzas, cápsulas de porcelana contendo 2 a 3 g de amostra foram colocadas em uma mufla a 600°C, durante 4 horas, até incineração total da matéria orgânica. Em seguida, a cápsula foi transferida para um dessecador até atingir a temperatura ambiente e, então, determinado o peso do resíduo. O teor de cinzas foi calculado como a relação entre o peso do resíduo e o peso seco da amostra, e expresso em percentagem (30).

#### 4. Dosagem de proteína

As determinações de proteína foram feitas pelo método de micro-biureto (31). A 0,1 ml de amostra foram adicionados 0,9 ml de água destilada, 3 ml de NaOH 4% e 0,2 ml do rea-



gente micro-biureto. A mistura foi agitada e colocada em repouso por 15 minutos, após o que a densidade ótica a 330nm foi medida em um espectrofotômetro Beckman DU. Foi utilizada como padrão uma solução de albumina sérica bovina.

#### 5. Ensaio de hemaglutinação

A atividade hemaglutinante do extrato aquoso foi determinada, utilizando-se o método descrito por Moreira (32).

Partindo-se da solução a ser dosada, são feitas diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8, etc...) com solução salina isotônica. A 1 ml de cada diluição é adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias a 2% na mesma solução salina. As suspensões obtidas são então incubadas a 37°C durante 30 minutos e, depois, deixadas em repouso por mais 30 minutos à temperatura ambiente, após o que são centrifugadas a 1500 x g por 30 segundos, para observar a presença de aglutinação.

#### 6. Extração de proteínas

Para extração de proteínas foram feitas determinações usando-se: diferentes valores de pH; diferentes concentrações salinas; tampões com diferentes valores de pH e concentrações salinas diferentes.



### 6.1. Extrações a diferentes valores de pH

Porções de 100 mg de farinha foram deixadas em contacto com 10 ml de soluções de NaOH ou HCl à temperatura ambiente, por 5 horas. As suspensões foram centrifugadas a 8.000 x g, por 20 minutos, a 4°C em uma centrífuga Internacional modelo HR-1. O pH foi determinado nos sobrenadantes e as concentrações de proteínas extraídas determinadas pelo micro-biureto.

### 6.2. Extrações a diferentes concentrações salinas

Foram feitas extrações nas mesmas condições anteriores usando-se soluções de NaCl nas concentrações que variaram de 0 a 10%.

### 6.3. Extrações com tampões a diferentes valores de pH e concentrações salinas diferentes

Neste caso foram usados: acetato de sódio 0,01M pH 5,0, fosfato de sódio 0,01M pH 7,0 e borato de sódio 0,01M pH 10,0 contendo NaCl nas concentrações de 0, 1 e 5%, usando-se a relação farinha-meio de extração de 1:100.



## 7. Fracionamento das proteínas

### 7.1. Fracionamento das proteínas totais

A farinha delipidada foi submetida à extração com tampão borato 0,1M pH 10,0 com 1% de NaCl, durante 4 horas com agitação ocasional. O material foi centrifugado a 8.000 x g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante filtrado em papel de filtro quantitativo. O filtrado foi então dialisado contra tampão acetato 0,033M pH 5,0 durante, pelo menos, 24 horas a 4°C, quando as albuminas e globulinas foram então separadas por centrifugação.

Para a obtenção das glutelinas o resíduo da extração foi submetido à nova extração com NaOH 0,1N e centrifugado a 8.000 x g por 20 minutos a 4°C.

Tanto o extrato total como as albuminas, globulinas e glutelinas, após diálise contra água, foram liofilizadas e guardadas a 7°C em ambiente seco.

### 7.2. Fracionamento das albuminas por precipitação salina

As albuminas foram submetidas à precipitação com sulfato de amônio nos níveis de 0-40 , 40-60 , 60-80 e 80-100% de saturação, por um período de 6 horas à temperatura ambiente, centrifugado a 8.000 x g por 20 minutos a 4°C e, os precipita-



dos foram retomados e dialisados contra água, liofilizados e mantidos a 7°C em ambiente seco.

### 7.3. Fracionamento das proteínas em Sephadex G-100

Uma coluna de Sephadex G-100 (Pharmácia, Suécia) foi preparada segundo Determann (33). O gel foi deixado equilibrar em água por 72 horas, após o que foi deixado sedimentar livremente em uma coluna de 2,5 cm de diâmetro x 40 cm de altura.

Amostras de 50 mg de proteínas (extrato total, globulina, albumina e as frações albumínicas) em 2 ml de tampão borato 0,1 M pH 10,0, NaCl 1%, contendo sacarose 10%, foram aplicadas na coluna previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi feita com o tampão de equilíbrio a um fluxo de 40 ml por hora.

A eluição foi acompanhada através de um sistema LKB UVICORD II, sendo registrada a absorbância a 280 nm. Os efluentes da coluna foram recolhidos em frações de 4 ml, em um coletor automático de frações Beckman 133A. Posteriormente tiveram suas absorbâncias a 280 nm, determinadas em um espectrofotômetro Beckman DU.

### 7.4. Cromatografia em DEAE-celulose

Uma coluna de DEAE-celulose de 1,3 cm de diâmetro x



16 cm de altura foi preparada segundo Peterson (34). A coluna foi montada, deixando-se o adsorvente sedimentar por gravidade até atingir altura desejada, sendo então lavada e equilibrada com tampão fosfato de sódio e potássio 5mM pH 6,8. 20 a 50 mg de cada amostra foram dissolvidas e dialisadas por 15 horas a 9°C, contra o mesmo tampão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1.500 x g por 15 minutos e, o sobrenadante foi aplicado na coluna.

A eluição inicial foi feita com tampão fosfato de sódio e potássio 5mM pH 6,8 e, posteriormente, com um gradiente retilíneo de concentração de NaCl de 0 a 1M preparado com o mesmo tampão. O fluxo foi mantido a 40ml/h, sendo recolhidas frações de 3 ml. O sistema coletor e analizador foi o mesmo usado quando do fracionamento por Sephadex.

## 7.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

### 7.5.1. Eletroforese em pH 8,1

Extrato total, globulinas, albuminas e frações albumínicas obtidas por precipitação com sulfato de amônio foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida. As colunas de gel foram preparadas em tubos de vidro de 7mm de diâmetro x 75mm de altura, seguindo-se a técnica descrita por Clarke (35).



Como tampão de corrida foi usado o sistema TRIS-glicina HCl pH 8,1 e uma fonte Buchler operando com 2mA/tubo. A localização das bandas foi feita com solução de negro de amido 1% em ácido acético 7% durante uma hora, sendo o excesso de corante retirado com ácido acético 7%.

#### 7.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foi desenvolvida segundo a técnica de Weber e Osborn (36).

Amostras de proteínas (1mg/ml) foram dissolvidas em tampão fosfato 0,01M pH 7,0 contendo 1% de SDS, utilizando-se de 50 a 100 $\mu$ l por coluna de gel. Foi usada uma corrente constante de 7mA por tubo durante 4 horas. A localização das bandas de proteína foi feita, imergindo-se as colunas de gel em uma solução de Coomassie Brilliant Blue a 0,005% em metanol + ácido acético + água (5:1:5), durante, pelo menos, 16 horas. O descoramento foi feito em uma solução de ácido acético 7%.

#### 7.5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e $\beta$ -mercaptoetanol

Eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo SDS, foi feita segundo o método de Weber e Osborn (36).

Proteínas (1mg/ml) foram dissolvidas em tampão fos-



fato 0,01M pH 7,0 contendo SDS 1% e  $\beta$ -mercaptoetanol 1%, e incubadas a 100°C por 10 minutos.

A eletroforese se desenvolveu com corrente constante de 7mA por tubo, durante 4 horas. As demais etapas foram as mesmas usadas no ítem anterior.

### 5. Composição em aminoácidos

Excetuando-se 1/2-cistina, metionina e triptofano, a composição de aminoácidos foi determinada de acordo com o método de Spackman, Stein e Moore (37), modificado por Piez e Morris (38).

Amostras foram hidrolizadas com HCl 6N (bidestilado), a 108°C em banho de areia, por 20 horas, em uma ampola de vidro sob nitrogênio e seladas sob pressão reduzida. Foram feitas hidrólises, em duplicata, contendo cada uma, aproximadamente, 2 mg de proteína. Após a hidrólise, as ampolas foram abertas, os hidrolizados secos sob pressão reduzida, em presença de NaOH e  $P_2O_5$ . Os resíduos secos foram retomados com solução de norleucina 0,5mM em HCl 0,01N, de tal modo que a solução final contivesse 0,5 $\mu$ mol de norleucina e 1mg de proteína por ml.

Aliquotas de 0,5ml de uma solução assim obtida foram usadas na análise de aminoácidos em um analisador automático da Technicon Corporation (U.S.A.), e equipado com uma coluna de 6mm de diâmetro x 1.300mm de altura com um esquema operacional



de 6 horas de eluição, recomendado pelo fabricante.

A determinação da concentração de cada aminoácido, foi feita por planimetria, relacionando-se áreas e concentrações das amostras padrão e problema. Norleucina foi usada como padrão interno em todas as análises.

#### 8.1. Determinação de 1/2-cistina e metionina

Para determinação de 1/2-cistina e metionina (sob a forma de metionina sulfona) foi utilizado o método de Schram, Moore e Bigwood (39) descrito por Blackburn (40).

Em uma ampola de vidro contendo 2 mg de amostras, foram adicionados 2 ml de ácido per fórmico recém preparado (mistura de 1 ml de peróxido de hidrogênio 30% e 9 ml de ácido fórmico 88%).

A solução foi deixada reagindo durante a noite (15 horas) em banho de gelo a 0°C, sendo a seguir seca sob pressão reduzida em um dessecador contendo NaOH e P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> à temperatura ambiente. As amostras foram redissolvidas em 2 ml de HCl 6N (bidestilado), saturado com nitrogênio. A seguir as ampolas foram seladas sob pressão reduzida e submetidas a 108°C por 20 horas e os hidrolizados tratados conforme o descrito no item anterior.



## 8.2. Espectro de absorção e dosagem do triptofano

Para determinação do espectro de absorção e determinação do teor de triptofano foi utilizado o método de Goodwin e Morton (41), modificado por Beaven e Holiday (42) e descrito por Bailey (31).

Foram preparadas amostras contendo 1mg de proteína por ml de NaOH 0,1N . O espectro de absorção para cada amostra foi feito determinando-se as absorbâncias nos comprimentos de onda de 230 a 350 nm . Os valores de absorbâncias a 280 e 294nm foram utilizados para determinação do triptofano, aplicando-se a relação Tir/Tri estabelecida na fórmula seguinte:

$$\frac{M}{Tir} = \frac{0,592 \times E_{294} - 0,263 \times E_{280}}{0,263 \times E_{280} - 0,170 \times E_{294}}$$

## 9. Ensaio Biológico

Camundongos machos de 21 a 25 dias de idade foram alimentados inicialmente com farelo de trigo por 5 dias, sendo, só então, submetidos a dietas problemas. Para cada tratamento foram utilizados 4 grupos de cinco animais, formados ao acaso e mantidos em gaiolas individuais contendo comedouro e bebedouro.

Os animais foram alimentados utilizando-se três rações todas isoproteicas, preparadas conforme a tabela 1, sendo



os pesos de cada grupo tomados diariamente.

As rações e a água foram fornecidas " ad libitum ".



| Ingredientes      | Dieta A | Dieta B | Dieta C |
|-------------------|---------|---------|---------|
| Caseína           | 20,0    | -       | -       |
| Farinha de favela | -       | -       | 33,0    |
| Amido             | 73,0    | -       | 60,0    |
| Óleo de milho     | 7,0     | -       | 7,0     |
| Farelo de trigo   | -       | 100,0   | -       |
| Nitrogênio :      | 3,20    | 3,08    | 3,31    |
| Proteína :        | 20,00   | 19,25   | 20,68   |

Tabela 1 - Composição, em gramas, das dietas usadas no ensaio biológico.



### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 1. Semente de favela

A semente de favela apresenta um peso médio de 0,300g e um comprimento duas vezes maior do que a largura. Está constituída de uma camada externa rígida, o tegumento, que corresponde a 42% do peso total da semente. Apresenta ainda a amêndoa constituída pelo endosperma e cotilédones, cujo peso é da ordem de 58% do total da semente.

#### 2. Preparação da farinha delipidada

Com a eliminação do tegumento e a extração dos lipídios totais da amêndoa da semente de favela, obtém-se a farinha delipidada, com rendimento da ordem de 28% em relação à semente íntegra.

#### 3. Análise elementar

##### 3.1. Determinação de umidade

O teor de água foi determinado na semente íntegra, amêndoa e farinha delipidada, sendo encontrados os valores 11,4; 7,6 e 11,3% respectivamente. Estes valores foram levados em



conta nas determinações de nitrogênio total, lipídios totais e cinzas.

### 3.2. Determinação do nitrogênio total

O teor de nitrogênio total, determinado em diferentes partes da semente, é mostrado na tabela 2, tendo sido utilizado o fator 6,25 para cálculo da proteína total. Os resultados obtidos estão coerentes com os dados obtidos por Ventura, M. M. e Lima, I. H. (27).

### 3.3. Determinação de lipídios totais

O teor de óleo determinado na semente íntegra e amêndoa é mostrado na tabela 2.

Verifica-se que mais de um terço da semente é constituída de lipídios e que a amêndoa comporta quase que totalmente a fração lipídica da semente.

Estudos das propriedades fisico-químicas do óleo da semente de favela, mostraram ser ele uma promissora fonte de óleo refinável, de sabor e cheiro agradáveis, que pode ser utilizado na alimentação tanto animal como humana (25).



|                    | Nitro-<br>gênio | Proteína<br>(N x 6,25) | Óleo | Cinzas | Carboi-<br>dratos |
|--------------------|-----------------|------------------------|------|--------|-------------------|
|                    | %               | %                      | %    | %      | %                 |
| Semente íntegra    | 3,4             | 21,4                   | 34,0 | 4,5    | 39,3              |
| (2)<br>Amêndoa     | 5,5             | 34,5                   | 49,9 | 5,1    | 10,5              |
| Farinha delipidada | 10,9            | 68,0                   | -    | 10,0   | 22,0              |

Tabela 2 - Análise elementar dos principais constituintes da semente de favela. (1) Determinado por diferença. (2) Correspondente a 58% do peso total da semente íntegra.



### 3.4. Determinação de cinzas

Os teores de cinzas determinados na semente íntegra, amêndoa e farinha delipidada, são mostrados na tabela 2.

## 4. Extração das proteínas de favela

### 4.1. Efeito do pH

A figura 1 nos mostra a curva de solubilidade das proteínas de favela em função do pH.

Em pH 1,0 observa-se um máximo de solubilidade (295 mg proteína/g de farinha) seguido por um decréscimo acentuado, atingindo um mínimo em pH 3,0 e permanecendo aproximadamente constante até pH 7,0, a partir do qual verifica-se um aumento brusco de solubilidade atingindo um máximo em pH 11,5 (600 mg proteína/g de farinha). A partir de pH 12,0 observa-se um decréscimo na solubilidade das proteínas devido, provavelmente, a uma desnaturação alcalina.

Ventura, M. M. e Lima, I. H. (27) estudando os constituintes nitrogenados da amêndoa da semente de favela, determinaram uma curva de solubilidade em função do pH em ausência e presença de NaCl, sendo obtidas duas curvas de comportamentos semelhantes, em que a adição de NaCl revela uma solubilização superior aos valores obtidos na ausência do mesmo.



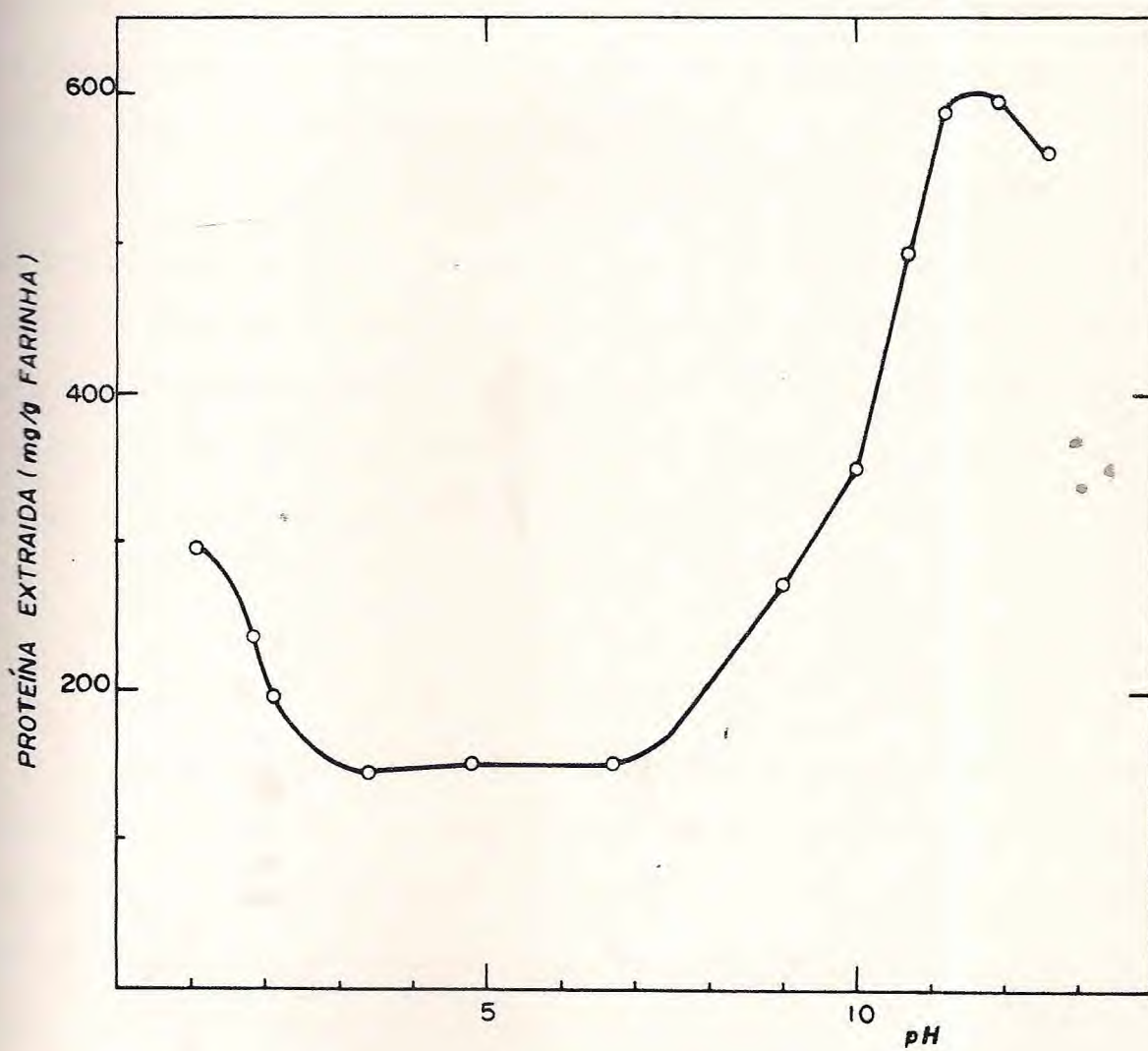


Figura 1 - Efeito do pH sobre a extração das proteínas de semente de favela.



#### 4.2. Efeito do cloreto de sódio

Para se conhecer a concentração de cloreto de sódio que extrai a maior quantidade de proteínas da farinha de fave-la, foi estudada a extração das mesmas em presença de concentrações crescentes deste sal (desde 0% até 10%).

A variação de concentração de proteína nos extratos, em função da concentração de NaCl na solução extratora, é mostrada na figura 2. Verifica-se um aumento acentuado na extração das proteínas entre 0 e 1% de NaCl e, a partir de 2%, um aumento muito lento na solubilização. Estes resultados sugerem a faixa de concentração de 1 a 5% de NaCl como ideal.

#### 4.3. Extração com tampões

Antes de iniciar o processo de fracionamento das proteínas presentes na farinha de fave-la, foi feito ainda um levantamento com nove tampões diferentes, usando a proporção 1:100 (p/v), entre a massa da amostra e o volume de solução extratora. O estudo teve por finalidade a escolha do melhor meio de extração, levando-se em conta a força iônica e pH. A figura 3 mostra a influência dos diferentes meios de extração na solubilização das proteínas. Verifica-se que o melhor meio encontrado é o tampão borato de sódio 0,01 M, pH 10,0 com 1% de NaCl. No entanto o pH no sobrenadante caiu de 10,0 para 8,8.



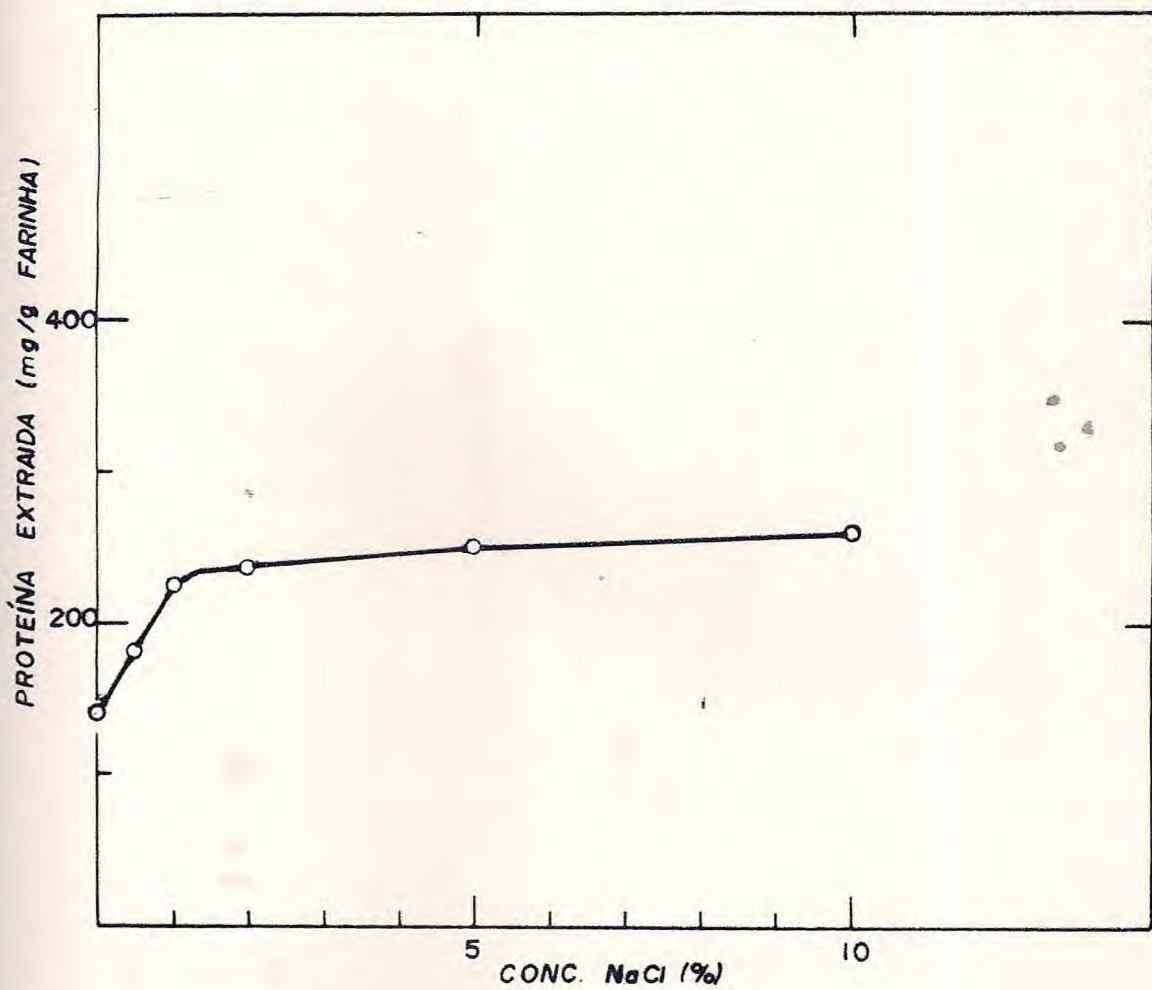


Figura 2 - Efeito da concentração de NaCl sobre a extração das proteínas da semente de favela.



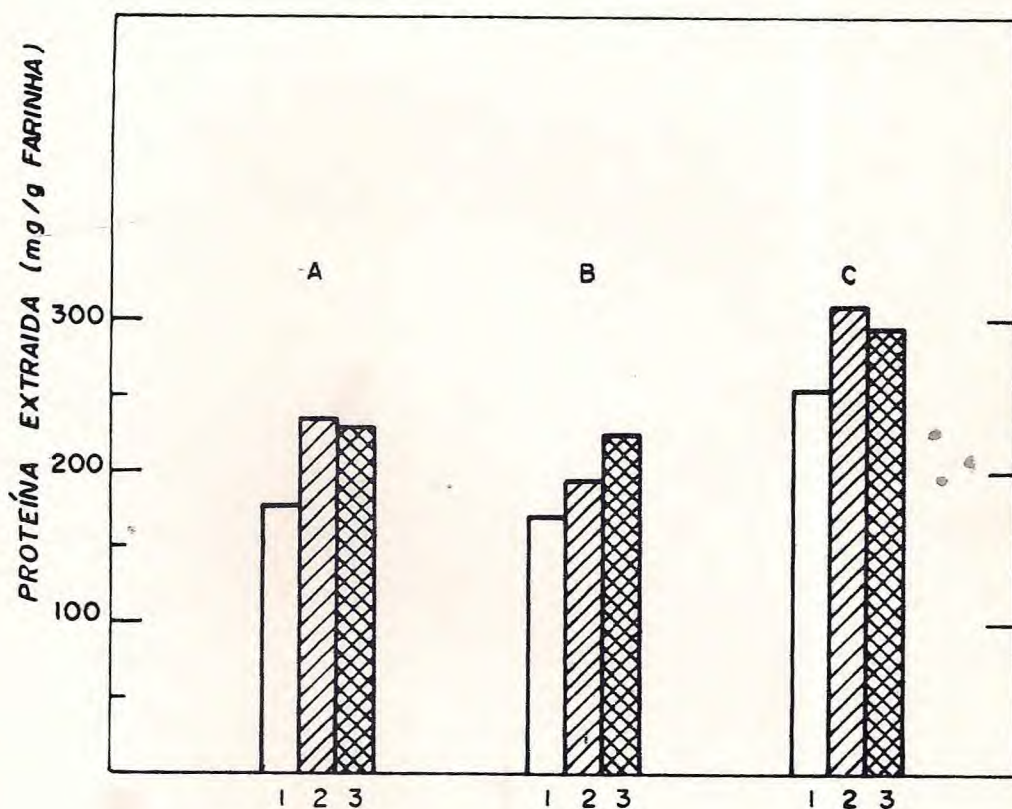


Figura 3 - Extração das proteínas de semente de favela com tampões a diferentes valores de pH e concentrações de NaCl. A - Tampão acetato de sódio 0,01M, pH 5,0 ; B - tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,0 ; C - tampão borato de sódio 0,01M , pH 10,0 ; 1 - sem NaCl; 2 - NaCl 1% ; 3 - NaCl 5% .



Para evitar este abaixamento de pH, passou-se a usar, nas extrações subsequentes, tampão borato de sódio 0,1 M pH 10,0 com NaCl 1%.

## 5. Fracionamento de proteínas

### 5.1. Fracionamento das proteínas totais

Para estudar as proteínas da semente de favela foi seguido essencialmente o esquema da figura 4.

A tabela 3 mostra os resultados obtidos para extração sucessiva com os três grupos de proteínas mais importantes, encontrados na semente de favela. Quando um grama de farinha delipidada é submetido à extração com tampão borato de sódio 0,1M pH 10,0 em NaCl 1%, são obtidas 251, mg de proteína (extrato total) que, após diálise contra tampão acetato, seguida por diálise contra água, nos dá 85,6 mg de globulina e 56,8 mg de albumina. Do resíduo, por extração com NaOH 0,1N, são obtidas 373 mg de glutelinas. Verifica-se, portanto, que o grupo das glutelinas corresponde a 54,9% da proteína total, enquanto que as globulinas somam um total de 12,6% e as albuminas 8,4%. Por outro lado, observa-se que 17,3% das proteínas extraídas correspondem a substâncias dializáveis.

Além dessas frações Ventura, M. M. e Lima, I.H. (27), estudando a solubilidade das proteínas da semente de favela,



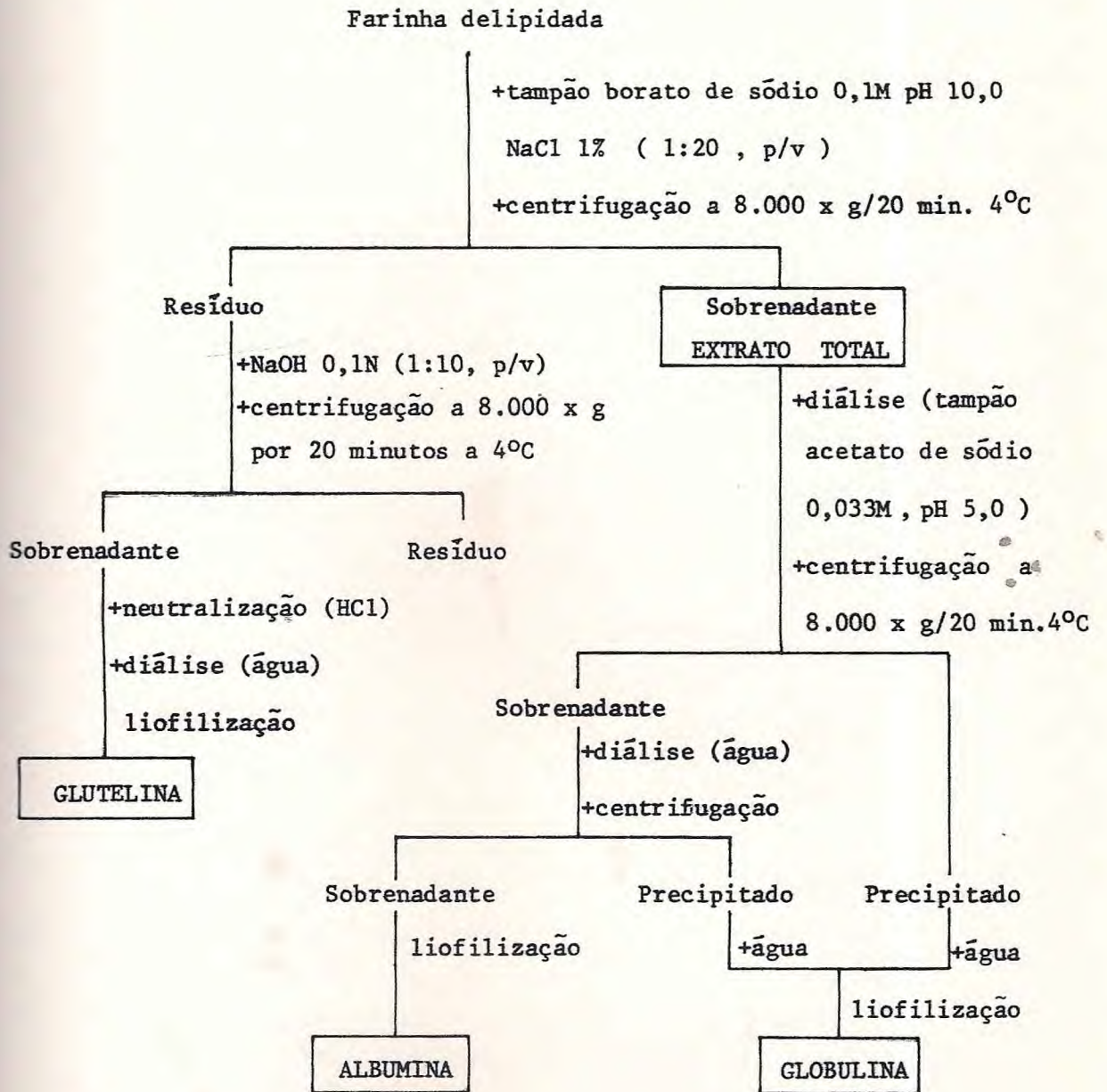


Figura 4 - Esquema de obtenção dos três principais grupos de proteínas encontrados na farinha da semente de favela.



---

|               | mg proteína/g<br>farinha | proteína *<br>% |
|---------------|--------------------------|-----------------|
| Extrato total | 251,0                    | 36,9            |
| Globulina     | 85,6                     | 12,6            |
| Albumina      | 56,8                     | 8,4             |
| Glutelina     | 373,0                    | 54,9            |

---

Tabela 3 - Extração sucessiva das proteínas da semente de favela. \*Percentagem em relação ao teor total de proteína, na farinha delipidada, determinado pelo teor de nitrogênio total.



observaram que 2% dos constituintes nitrogenados são encontrados na fração solúvel em etanol a 70%.

### 5.2. Fracionamento das albuminas por precipitação com sulfato de amônio

As albuminas foram submetidas a fracionamento com sulfato de amônio, a diferentes níveis de saturação, obtendo-se frações precipitadas com 40, 60, 80 e 100% de saturação. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 4, onde se observa que a maior percentagem de proteína precipita entre 40 e 60% de saturação e que uma quantidade bastante reduzida precipita entre 0 a 40% de saturação.

### 5.3. Fracionamento das proteínas em Sephadex G-100

#### 5.3.1. Cromatografia do extrato total

O extrato total, após diálise e liofilização, foi submetido a fracionamento em Sephadex G-100. O resultado é mostrado na figura 5.

O extrato total (figura 5) apresenta perfil cromatográfico, com três frações distintas, cujos pesos moleculares, determinados segundo Determann (33), são: igual ou maior do que 125.000, 15.300 e 6.300 daltons.



| Saturação de<br>(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |   |     | mg fração/g<br>farinha | mg fração/100mg*<br>albumina |
|---|---|-----|------------------------|------------------------------|
| 0   | - | 40  | 4,4                    | 10,0                         |
| 40  | - | 60  | 17,9                   | 40,0                         |
| 60  | - | 80  | 13,7                   | 30,7                         |
| 80  | - | 100 | 8,6                    | 19,3                         |

Tabela 4 - Fracionamento das albuminas de semente de favela por precipitação com sulfato de amônio. \*Expressa em percentagem de proteína total recuperada após diálise.



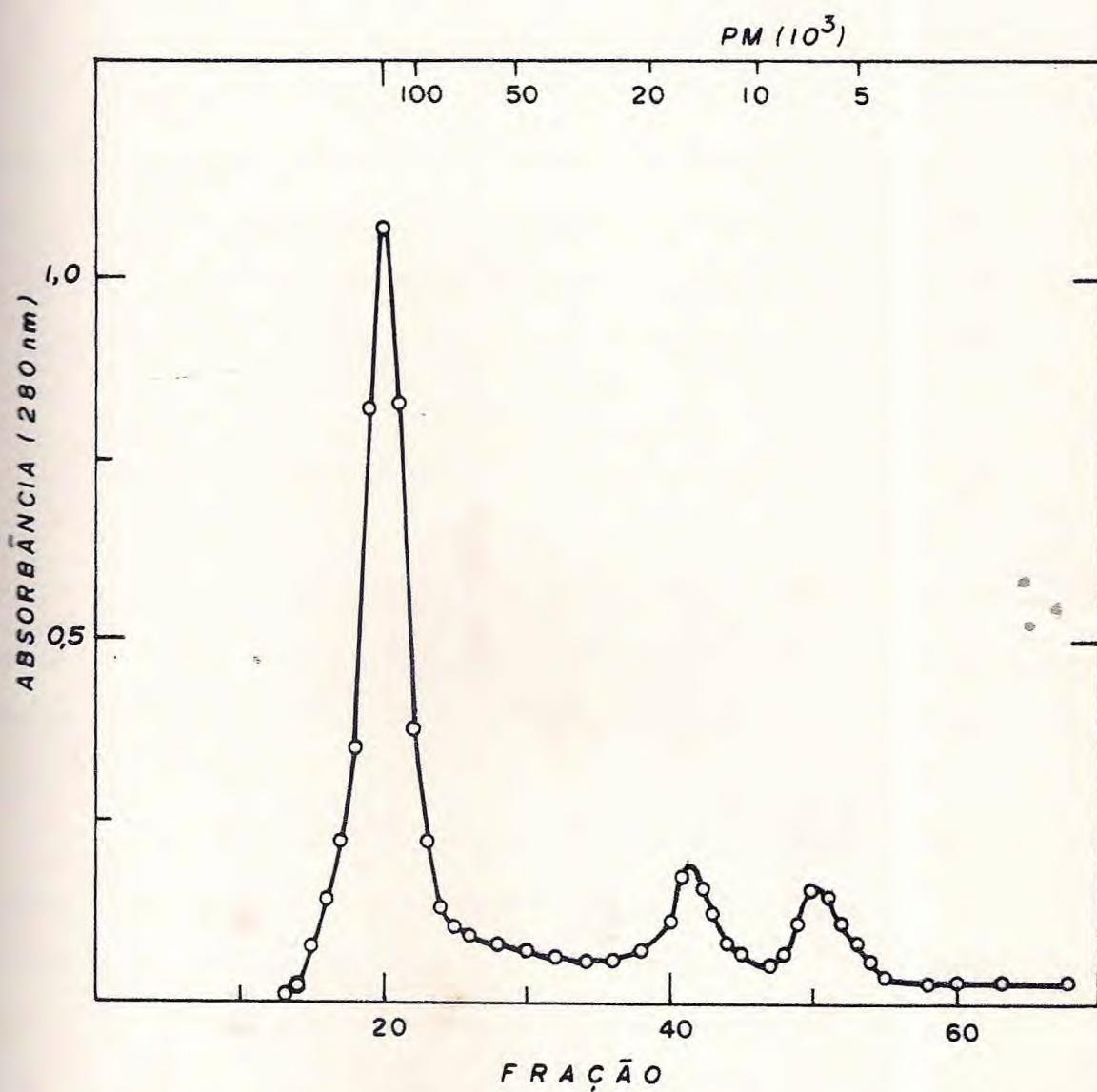


Figura 5 - Cromatografia em Sephadex G-100 do extrato total de favela. Coluna: 2,5cm x 40cm. Eluição: NaCl 1% em tampão borato de sódio 0,1M, pH 10,0. Volumes das frações: 4 ml.



### 5.3.2. Cromatografia das globulinas

As globulinas, após diálise e liofilização, foram submetidas a fracionamento em Sephadex G-100.

As globulinas foram eluídas, na sua quase totalidade, em um único pico em Sephadex G-100 (figura 6) apresentando peso molecular igual ou maior do que 125.000 daltons.

### 5.3.3. Cromatografia das albuminas

As albuminas totais e as frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio foram fracionadas por cromatografia em Sephadex G-100. Os resultados são mostrados na figura 7.

As albuminas totais (figura 7A) apresentaram quatro grandes grupos de pesos moleculares igual ou maior do que 125.000, 76.200, 15.300 e 6.300 daltons. O pico de peso molecular 76.200 daltons mostrado nas albuminas não é evidenciado no extrato total, provavelmente devido ao fato de esta proteína se encontrar em baixa concentração no extrato total, ficando o mesmo mascarado por outros picos.

A fração 0-40 (figura 7B) mostrou dois picos de pesos moleculares: um igual ou maior do que 125.000 e o outro de 88.300 daltons.

A fração precipitada entre 40-60% de saturação com



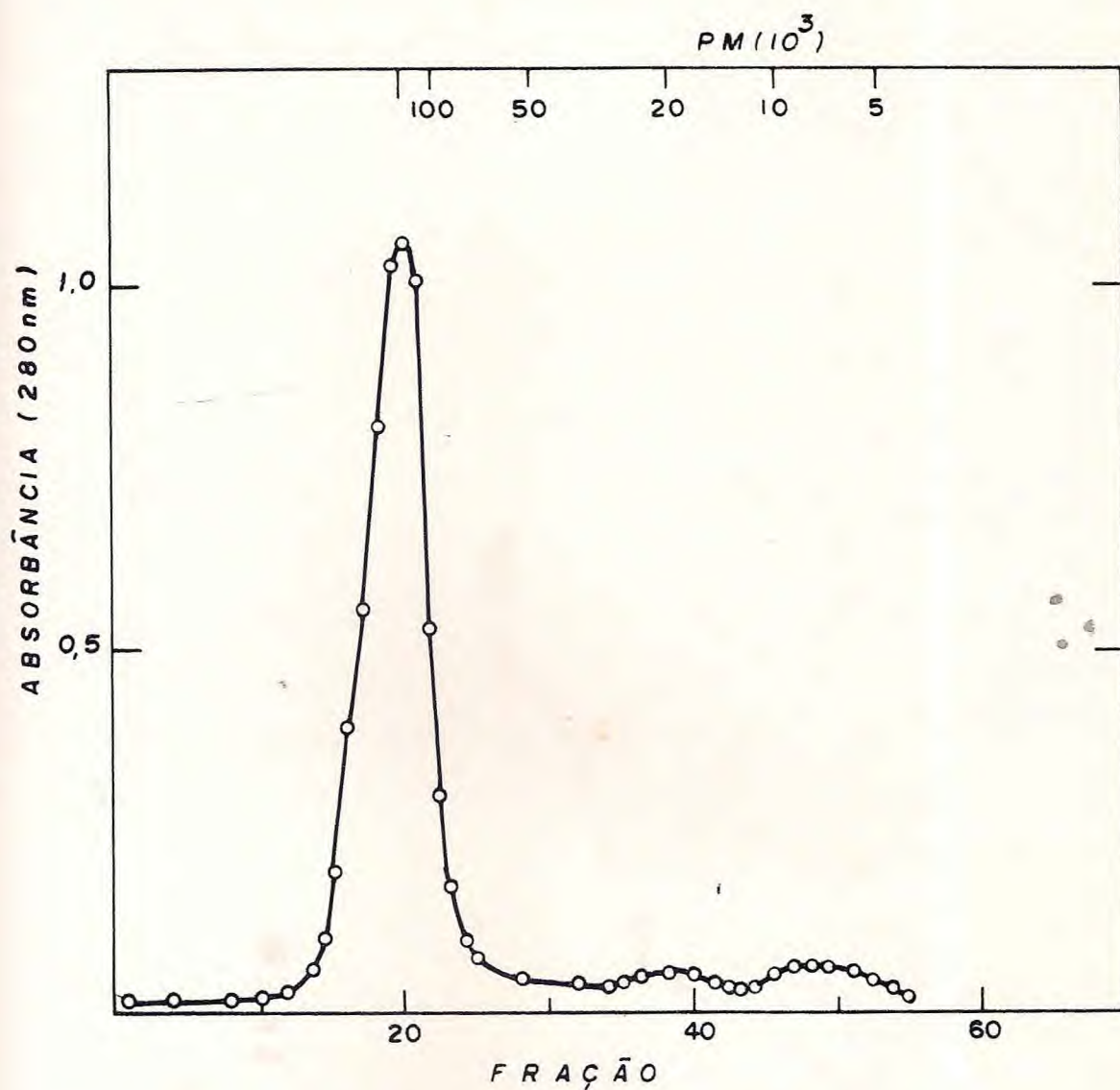


Figura 6 - Cromatografia em Sephadex G-100 das globulinas de favela. Coluna: 2,5cm x 40cm. Eluição: NaCl 1% em tampão borato de sódio 0,1M, pH 10,0. Volumes das frações: 4 ml.



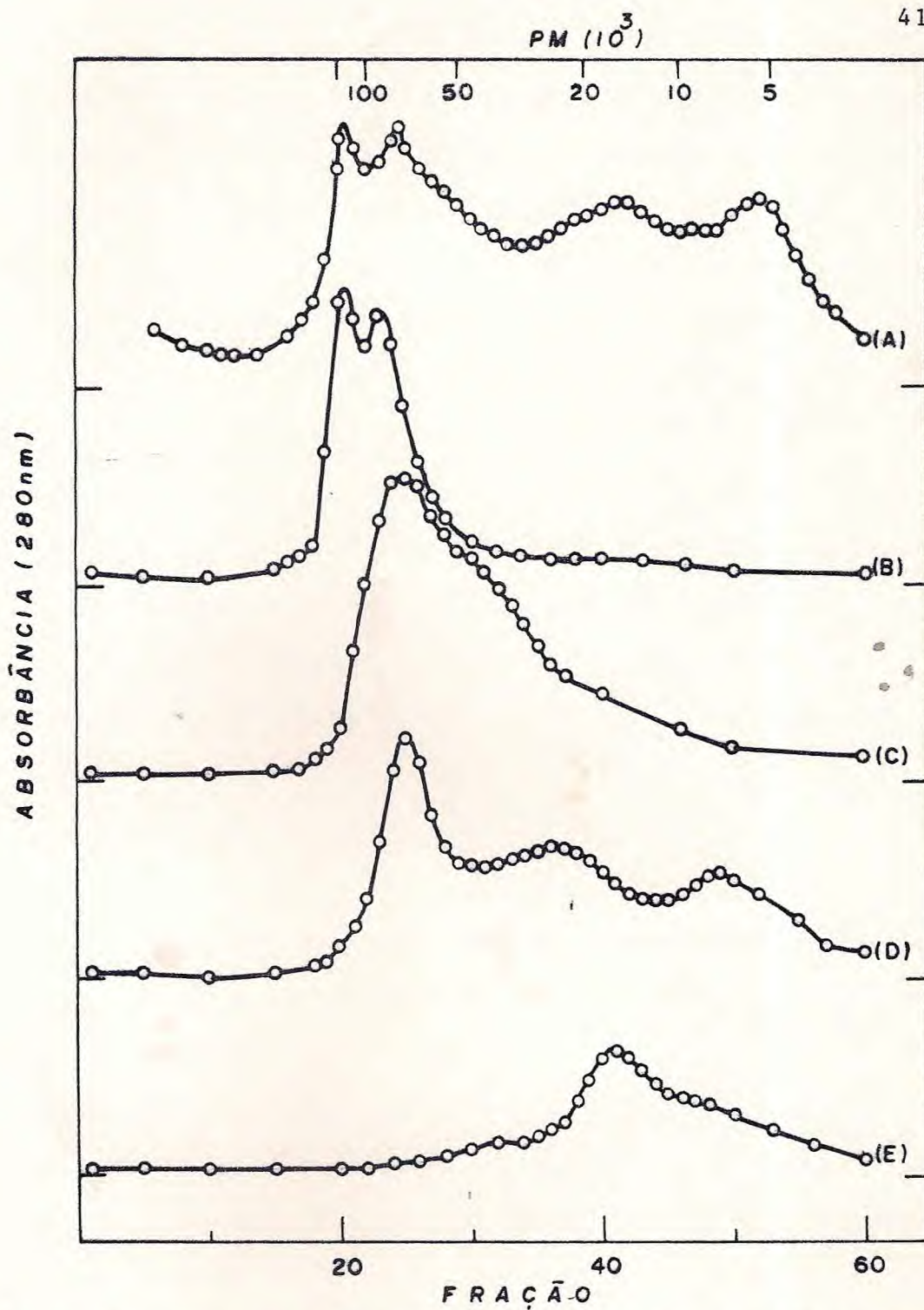


Figura 7 - Fracionamento das albuminas de favela em Sephadex G-100. Coluna: 2,5cm x 40cm. Eluição: NaCl 1% em tampão borato de sódio 0,1M, pH 10,0. Volumes das rações: 4ml. (A) albumina total, (B) fração 0-40, (C) fração 40-60, (D) fração 60-80 e (E) fração 80-100.



sulfato de amônio, revelou um pico de peso molecular 76.200 daltons e um ombro à altura de um peso molecular, aproximadamente, 47.000 daltons.

A fração 60-80 apresentou três picos com pesos moleculares 76.200 , 24.800 e 7.300 daltons.

Por outro lado, a fração 80-100 mostrou um só pico de peso molecular 15.300 daltons.

Os picos de pesos moleculares 88.300 , 47.000 e 24.000 daltons das frações 0-40 , 40-60 e 60-80, respectivamente, não foram detectados nas albuminas totais, por se encontrarem aparentemente em concentrações relativamente baixas, sendo encobertos pelas outras proteínas de concentrações mais altas.

#### 5.4. Cromatografia em DEAE-celulose

Albumina total, fração 40-60 , fração 60-80 e fração 80-100 foram submetidas à cromatografia em DEAE-celulose, em gradiente linear de NaCl de 0 a 1M .

Os resultados são mostrados nas figuras 8, 9, 10 e 11, onde se verifica em cada cromatograma a presença de três picos, sendo o primeiro pico eluído com tampão de partida, representando o material não retido pela coluna e os dois picos seguintes eluídos a 0,20 e 0,25 M de NaCl. Apenas a fração 80-100 (figura 11) apresentou os dois últimos picos eluídos a 0,10 e 0,15 M de NaCl.

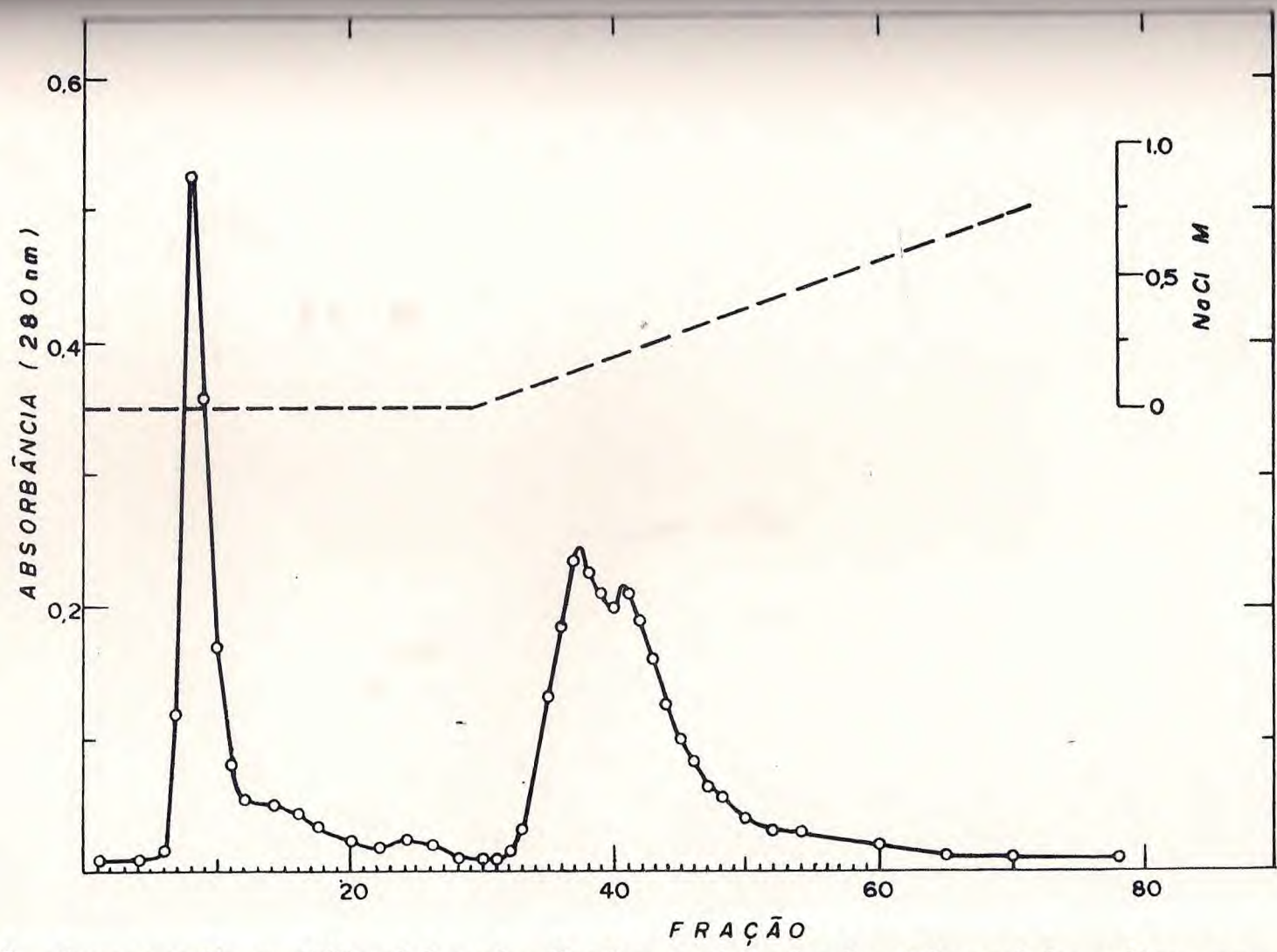


Figura 8 - Cromatografia em DEAE-celulose da albumina total de favela. Coluna: 1,3cm x 16cm; tampão de partida: fosfato de Na e K 5mM pH 6,8, seguido por gradiente linear de NaCl. Volumes das frações: 3,0 ml. (—○—)  $A_{280}$  ; (---) concentração de NaCl.



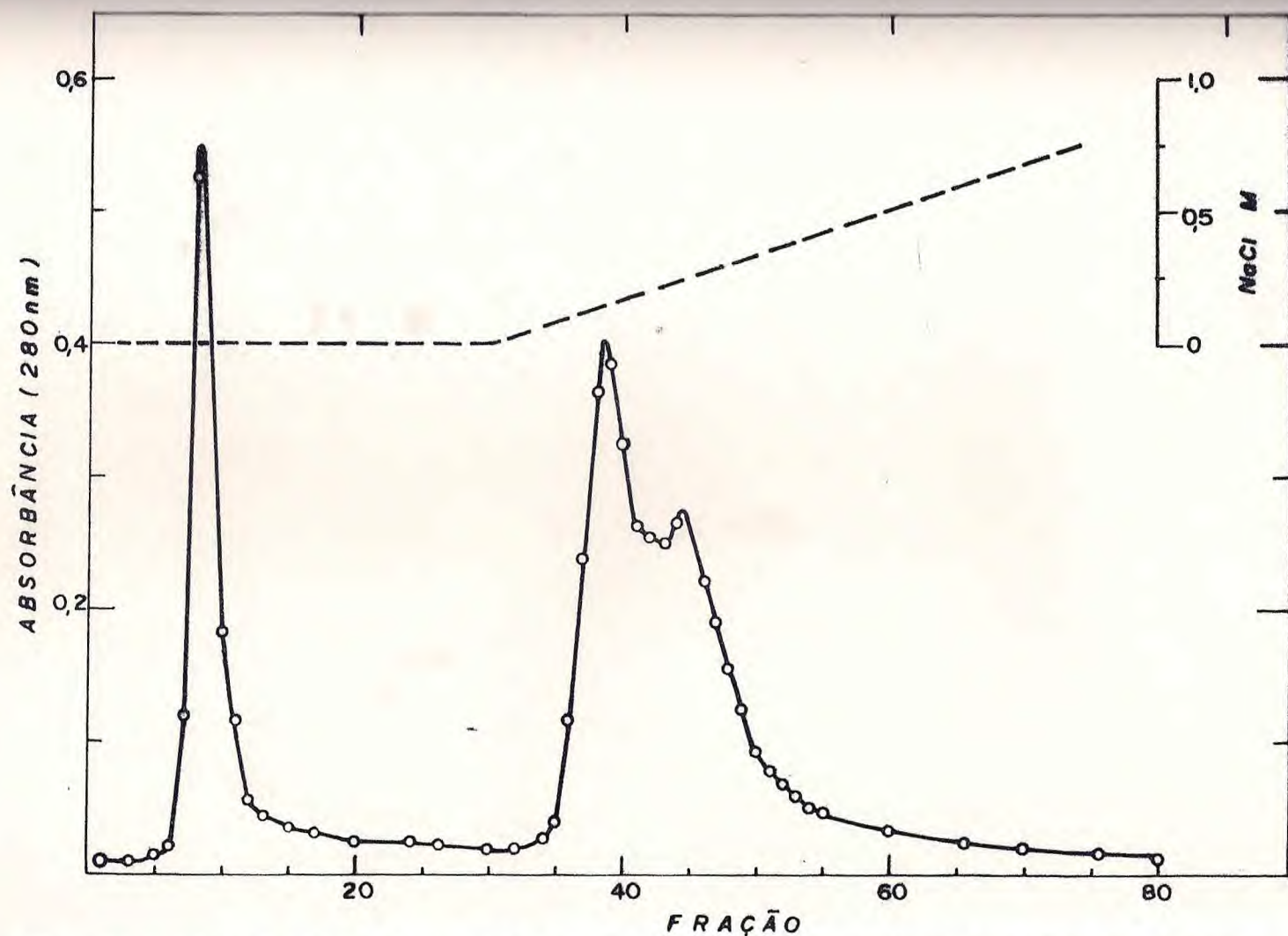


Figura 9 - Cromatografia em DEAE-celulose da fração albumínica precipitada entre 40-60% de saturação com sulfato de amônio. Coluna: 1,3cm x 16cm; tampão de partida: fosfato de Na e K 5mM pH 6,8, seguido por gradiente linear de NaCl. Volumes das frações: 3,0 ml. (-o-)  $A_{280}$ ; (---) concentração de NaCl.

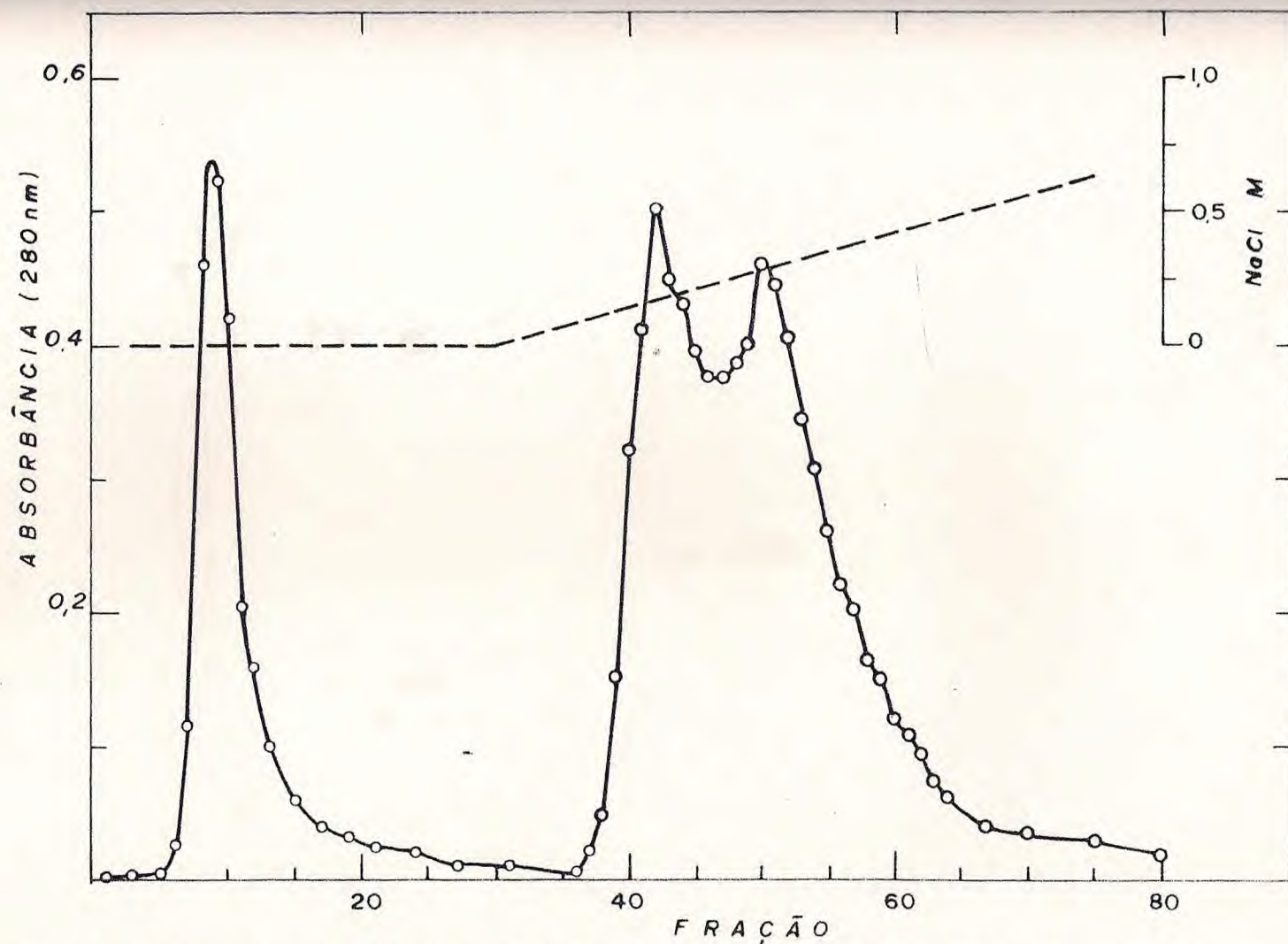


Figura 10 - Cromatografia em DEAE-celulose da fração albumina precipitada entre 60-80% de saturação com sulfato de amônio. Coluna: 1,3cm x 16cm; tampão de partida: fosfato de Na e K 5mM pH 6,8, seguido por gradiente linear de NaCl. Volumes das frações: 3,0 ml. (-o-)  $A_{280}$ , (---) concentração NaCl.



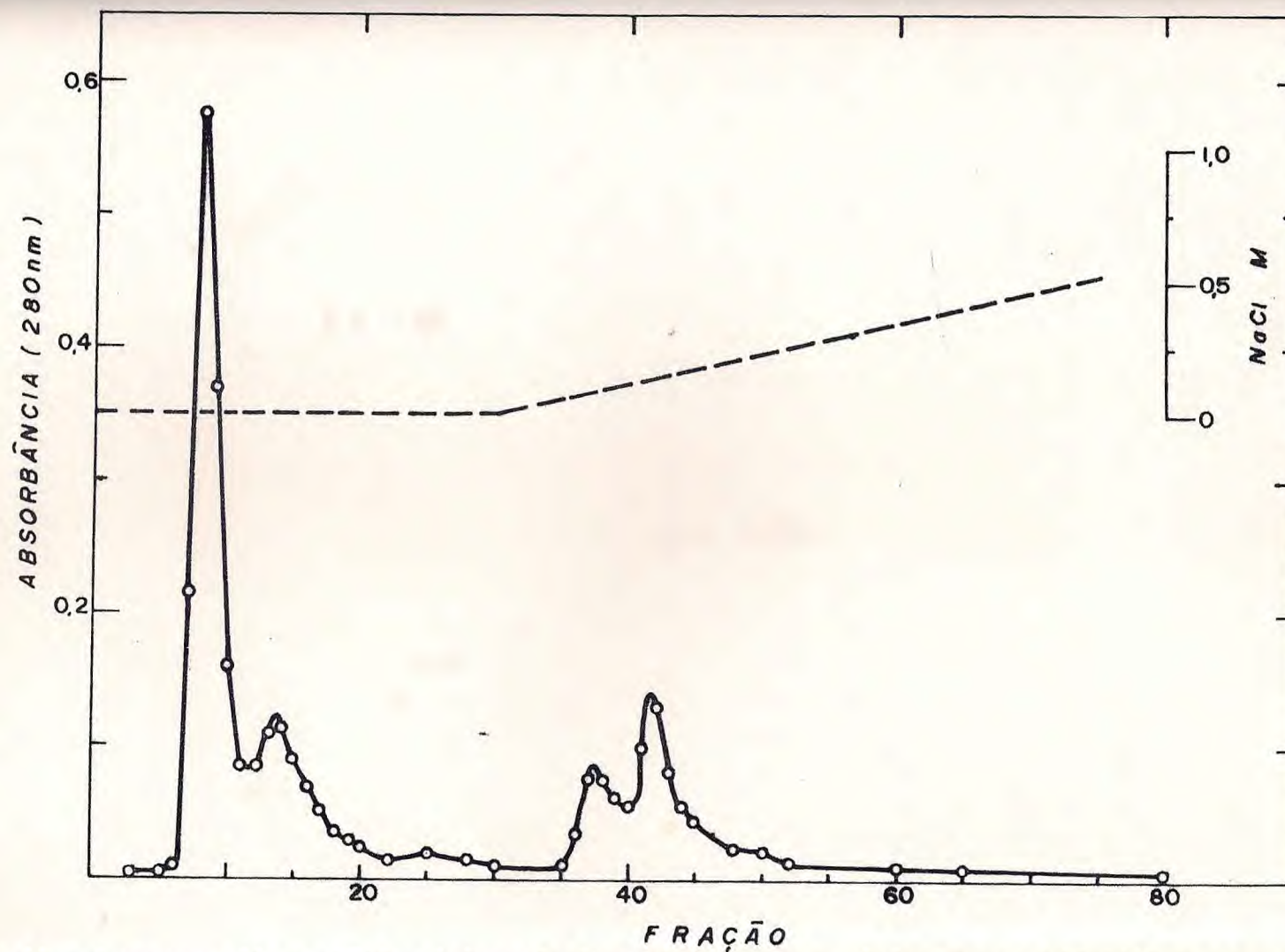


Figura 11 - Cromatografia em DEAE-celulose da fração albumina precipitada entre 80-100% de saturação com sulfato de amônio. Coluna: 1,3cm x 16cm; tampão de partida: fosfato de Na e K 5mM pH 6,8, seguido por gradiente linear de NaCl. Volumes das frações: 3,0ml. (-o-)  $A_{280}$ , (---) concentração NaCl.



Os resultados, obtidos nas cromatografias em DEAE-celulose, mostram que as albuminas de favela apresentam pelo menos sete frações proteicas. Verifica-se que albumina total e frações 40-60 e 60-80 apresentam dois picos em cada cromatograma, que são eluídos com a mesma concentração de NaCl, o que revela o mesmo poder de fixação dessas proteínas no material de coluna.

Analizando a altura assumida pelos picos nos perfis cromatográficos, observa-se que a fração 60-80 é quantitativamente mais expressiva, enquanto que a fração 80-100 mostra uma baixa concentração de proteínas para uma mesma quantidade de amostra aplicada. Nesta fração, o pico eluído a 0,10M de NaCl tem uma quantidade de proteína muito pequena, quando comparada com o total de proteína, e, por isto, não foi observado na cromatografia das albuminas.

## 5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

### 5.5.1. Eletroforese em pH 8,1

Foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1. Os resultados obtidos com as diversas frações proteicas são mostrados na figura 12.

O extrato total (figura 12A) revela quatro componentes proteicos, sendo que apenas um, localizado a uma mobilidade relativa de 0,42, mostra ser quantitativamente mais ex-



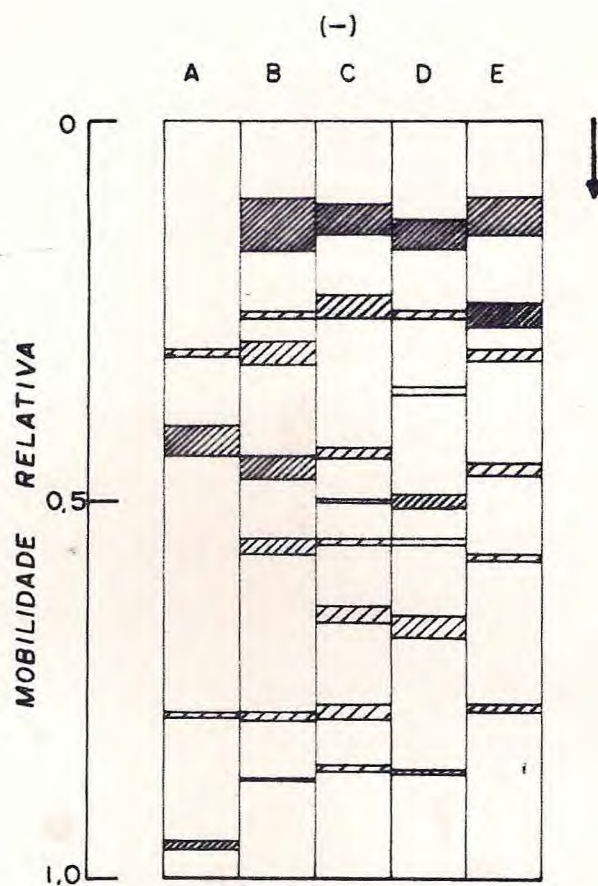


Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em tampão TRIS-glicina pH 8,1, de frações proteicas de semente de favela; 2 mA por tubo. (A) extrato total; (B) albumina; (C) fração 40-60; (D) fração 60-80; (E) fração 80-100.

pressivo. As albuminas (figura 12B) apresentam sete faixas, onde quatro delas se mostram bem distintas, com mobilidades relativas de: 0,14 ; 0,30 ; 0,46 e 0,56.

O maior número de componentes das albuminas, em relação ao extrato total, deve-se provavelmente à presença de proteínas que estão no extrato total em concentrações mais baixas e, portanto, são diluídas e não detectáveis na concentração aplicada.

A fração 40-60 (figura 12C) mostra oito componentes proteicos, cujas mobilidades relativas se encontram entre 0,11 a 0,85. As outras duas frações, 60-80 e 80-100, mostraram sete e seis componentes, respectivamente, de mobilidades semelhantes aos da fração 40-60.

#### 5.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS são mostrados na figura 13 e os pesos moleculares determinados segundo Xavier-Filho e Moreira (43).

O extrato total (figura 13A) mostra cinco bandas de proteínas de pesos moleculares variando de 10.000 a 50.000 daltons, enquanto que as globulinas (figura 13B) mostram seis componentes, onde o primeiro apresenta um peso molecular em torno de 60.000 daltons e os restantes correspondendo às bandas do extrato total. Albumina total (figura 13C) apresenta cinco fai-



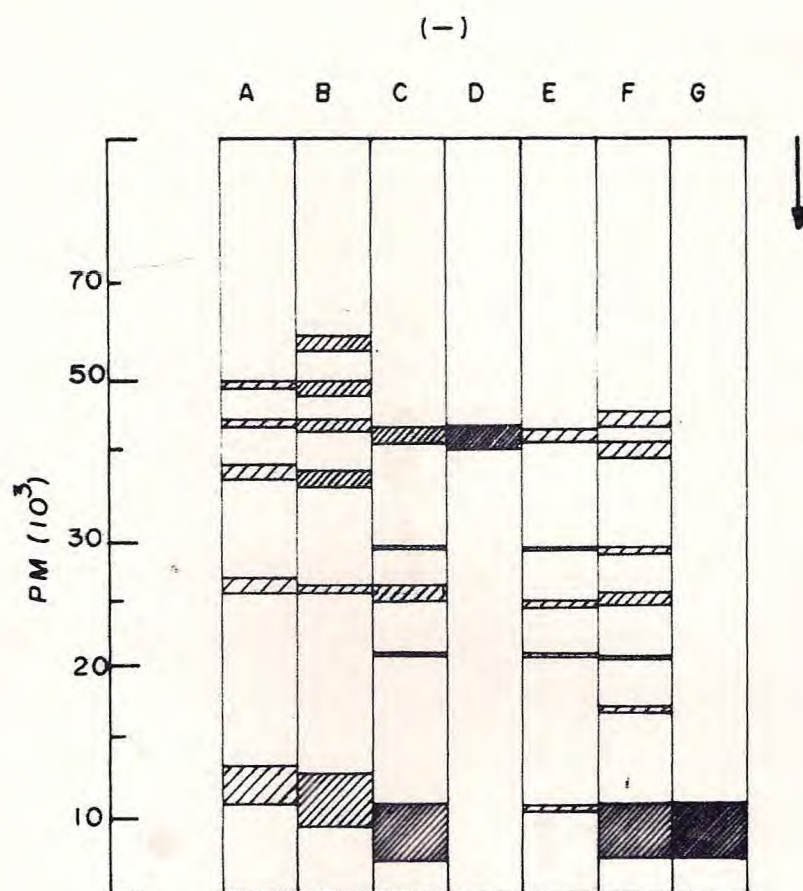


Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, de frações proteicas de semente de favela; 7 mA por tubo. (A) extrato toal; (B) globulinas; (C) albuminas; (D) fração 0-40; (E) fração 40-60; (F) fração 60-80; (G) fração 80-100.

xas, onde três delas são quantitativamente mais significativas, de pesos moleculares 42.000 ; 26.000 e 10.000 daltons, respectivamente.

Com relação as frações obtidas por precipitação salina, verifica-se que a fração 0-40 (figura 13D) apresenta um só componente de baixa mobilidade, ou seja, peso molecular em torno de 42.000 daltons.

A fração 40-60 (figura 13E) apresenta cinco componentes quantitativamente pouco expressivos e pesos moleculares semelhantes à albumina total. Por outro lado, a fração 60-80 (figura 13F) mostra sete faixas onde apenas uma delas é quantitativamente mais expressiva, apresentando um peso molecular inferior a 10.000 daltons.

A fração 80-100 (figura 13G) apresenta um só componente de mobilidade relativa 0,92 que corresponde a uma proteína com peso molecular de aproximadamente 8.000 daltons.

### 5.5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e $\beta$ -mercaptoetanol

Foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol em sete amostras de proteínas extraídas da semente de favela: extrato total, globulinas, albumina total e quatro frações albumínicas obtidas por precipitação com sulfato de amônio.

Os resultados obtidos, mostrados na figura 14, reve-



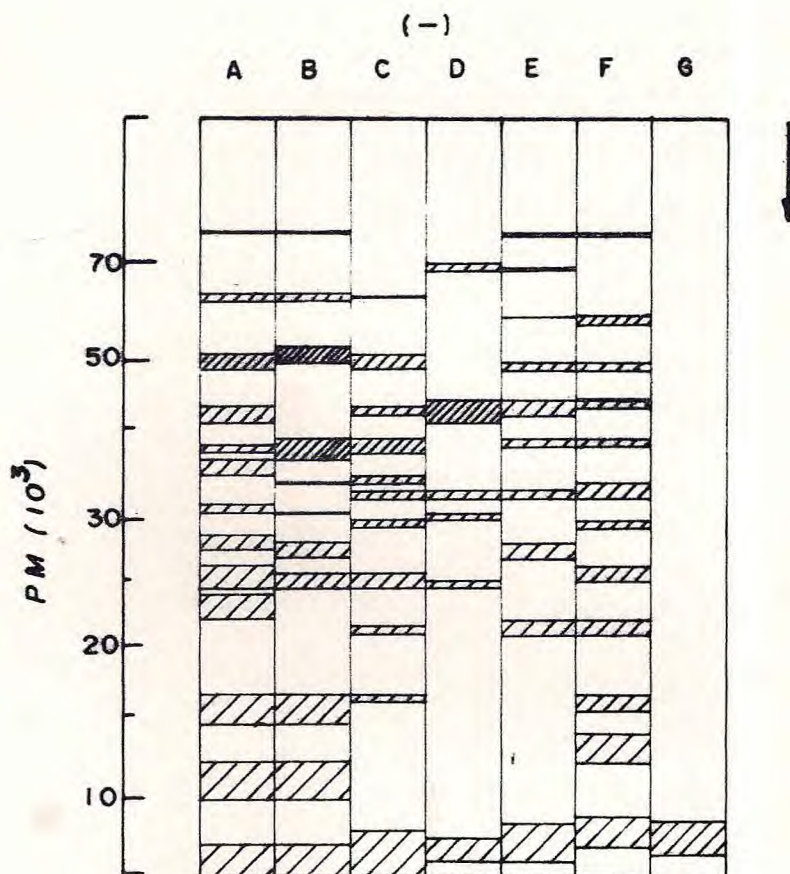


Figura 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, de frações proteicas de semente de favela; 7 mA por tubo. (A) extrato total; (B) globulinas; (C) albuminas; (D) fração 0-40; (E) fração 40-60; (F) fração 60-80; (G) fração 80-100.



lam um maior número de componentes em cada amostra analisada, em virtude de o tratamento dessas amostras com  $\beta$ -mercaptoetanol promover a quebra das ligações S-S, além da dissociação de dímeros ou polímeros em suas respectivas sub-unidades, pelo tratamento com SDS.

O extrato total (figura 14A) mostra treze faixas contra quatro na eletroforese a pH 8,1 e cinco na eletroforese com SDS, enquanto que as globulinas produziram nove bandas e as albuminas onze.

No extrato total, na albumina e na globulina podem-se evidenciar, de acordo com suas localizações, dois grupos principais de proteínas: um de peso molecular baixo compreendido entre 7.000 e 16.000 daltons e o outro de peso molecular mais elevado, variando de 25.000 a 50.000 daltons.

A fração 0-40 que, na eletroforese com SDS, mostrou um só componente, quando tratada com  $\beta$ -mercaptoetanol, revela a presença de seis componentes com pesos moleculares variando de 6.000 a 68.000 daltons, evidenciando um caso típico de dissociação e/ou redução de ligações dissulfeto provavelmente presente na estrutura da proteína.

As frações 40-60 e 60-80 mostram dez e doze componentes, respectivamente. Apenas dois deles na fração 60-80, cujos pesos moleculares são 13.000 e 17.000 daltons respectivamente, mostram-se quantitativamente mais expressivos e não são evidenciados na fração 40-60. Os demais componentes, em ambas



as frações, apresentam mobilidades semelhantes com pesos moleculares variando de 8.000 a 70.000 daltons.

A fração 80-100 apresenta um só componente de alta mobilidade relativa (0,95), semelhante ao obtido na eletroforese com SDS, mostrando ser efetivamente uma proteína de baixo peso molecular, aproximadamente 8.000 daltons.

#### 6. Composição em aminoácidos

A análise da composição de aminoácidos da semente de favela foi feita na farinha delipídada, extrato total, gluteínas, albuminas e globulinas. Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 5, 6 e 7, onde a concentração de cada aminoácido é expressa de três modos diferentes.

Para expressar a composição em g por 16g de nitrogênio foi levado em conta o teor proteico de cada amostra, a partir do nitrogênio total (tabela 8), determinado previamente pelo método semi-micro-Kjeldhal (28).

Nas cinco amostras analisadas, os aminoácidos encontrados em maior quantidade foram: ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina e arginina, enquanto foi encontrado um teor relativamente baixo de triptofano, tirosina e valina.

Não foi detectada a presença de valina nas globulinas, destacando-se uma maior concentração na farinha e nas gluteínas. As albuminas mostram um alto teor de 1/2-cistina em



| Aminoácidos     | Farinha | Extrato Total | Glutelina | Albumina | Globulina |
|-----------------|---------|---------------|-----------|----------|-----------|
| Asp.            | 6,02    | 6,30          | 6,63      | 8,35     | 5,28      |
| Tre.            | 2,12    | 4,01          | 2,74      | 4,46     | 2,81      |
| Ser.            | 2,59    | 4,91          | 3,40      | 7,72     | 4,31      |
| Glu.            | 8,87    | 10,48         | 10,09     | 11,90    | 10,61     |
| Pro.            | 2,79    | 2,65          | 3,59      | 3,67     | 3,39      |
| Gli.            | 2,01    | 3,08          | 2,66      | 3,89     | 2,73      |
| Ala.            | 1,68    | 2,83          | 2,61      | 2,38     | 3,51      |
| Val.            | 1,91    | 1,45          | 2,91      | 1,76     | -         |
| 1/2-Cis.        | 3,25    | 4,47          | 2,93      | 11,11    | 2,77      |
| Met.            | 1,10    | -             | -         | -        | -         |
| Ile.            | 1,93    | 4,43          | 1,59      | 2,07     | 3,49      |
| Leu.            | 3,80    | 5,37          | 4,74      | 6,73     | 7,12      |
| Tir.            | 1,59    | 1,92          | 1,74      | 2,57     | 2,32      |
| Fen.            | 2,41    | 2,87          | 3,68      | 1,37     | 3,77      |
| NH <sub>3</sub> | 0,53    | 0,76          | 1,32      | 0,83     | 1,11      |
| Lis.            | 2,71    | 6,65          | 2,91      | 8,23     | 5,09      |
| His.            | 2,17    | 2,25          | 2,61      | 1,74     | 2,27      |
| Arg.            | 6,66    | 7,04          | 8,80      | 7,74     | 7,65      |
| Tri.            | 0,75    | 0,80          | 0,76      | 0,63     | 1,14      |

Tabela 5 - Composição em aminoácidos da farinha delipidada e das diferentes frações proteicas de semente de favela expressa em g de aminoácidos por 100 g de amostra.



| Aminoácidos     | Farinha | Extrato<br>Total | Glutelina | Albumina | Globulina | Ref.FAO |
|-----------------|---------|------------------|-----------|----------|-----------|---------|
| Asp.            | 10,97   | 8,72             | 10,10     | 9,58     | 7,61      | -       |
| Tre.            | 3,86    | 5,55             | 4,18      | 5,12     | 4,05      | 2,80    |
| Ser.            | 4,72    | 6,79             | 5,18      | 8,85     | 6,21      | -       |
| Glu.            | 16,16   | 14,50            | 15,38     | 13,65    | 15,30     | -       |
| Pro.            | 5,08    | 3,67             | 5,47      | 4,21     | 4,89      | -       |
| Gli.            | 3,66    | 4,26             | 4,05      | 4,46     | 3,93      | -       |
| Ala.            | 3,06    | 3,92             | 3,98      | 2,73     | 5,06      | -       |
| Val.            | 3,48    | 2,00             | 4,43      | 2,02     | -         | 4,20    |
| 1/2-Cis.        | 5,92    | 6,19             | 4,47      | 12,74    | 3,99      | -       |
| Met.            | 2,00    | -                | -         | -        | -         | 2,20    |
| Ile.            | 3,52    | 6,19             | 2,42      | 2,37     | 5,03      | 4,20    |
| Leu.            | 6,92    | 7,43             | 7,22      | 7,72     | 10,26     | 4,80    |
| Tir.            | 2,90    | 2,66             | 2,65      | 2,95     | 3,35      | -       |
| Fen.            | 4,39    | 3,97             | 5,61      | 1,57     | 5,44      | 2,80    |
| NH <sub>3</sub> | 0,97    | 1,05             | 1,86      | 0,96     | 1,60      | -       |
| Lis.            | 4,94    | 9,20             | 4,43      | 9,44     | 7,34      | 4,20    |
| His.            | 3,95    | 3,11             | 3,98      | 2,00     | 3,27      | -       |
| Arg.            | 12,13   | 9,74             | 13,41     | 8,88     | 11,03     | -       |
| Tri.            | 1,37    | 1,11             | 1,16      | 0,73     | 1,64      | 1,40    |

Tabela 6 - Composição em aminoácidos da farinha delipidada e das diferentes frações proteicas de semente de favela expressa em g de aminoácidos por 100 g de aminoácidos recuperados.



| Aminoácidos     | Farinha | Extrato<br>Total | Glutelina | Albumina | Globulina |
|-----------------|---------|------------------|-----------|----------|-----------|
| Asp.            | 9,84    | 9,02             | 7,05      | 10,14    | 8,50      |
| Tre.            | 3,46    | 5,74             | 2,91      | 5,42     | 4,52      |
| Ser.            | 4,23    | 7,03             | 3,61      | 9,38     | 6,94      |
| Glu.            | 14,49   | 15,01            | 10,73     | 14,46    | 17,08     |
| Pro.            | 4,56    | 3,79             | 3,82      | 4,46     | 5,46      |
| Gli.            | 3,28    | 4,41             | 2,83      | 4,73     | 4,40      |
| Ala.            | 2,75    | 4,05             | 2,77      | 2,89     | 5,65      |
| Val.            | 3,12    | 2,07             | 3,09      | 2,14     | -         |
| 1/2-Cis.        | 5,31    | 6,40             | 3,11      | 13,50    | 4,46      |
| Met.            | 1,80    | -                | -         | -        | -         |
| Ile.            | 3,15    | 6,34             | 1,69      | 2,52     | 5,62      |
| Leu.            | 6,21    | 7,69             | 5,04      | 8,18     | 11,46     |
| Tir.            | 2,60    | 2,75             | 1,85      | 3,12     | 3,74      |
| Fen.            | 3,94    | 4,11             | 3,91      | 1,66     | 6,08      |
| NH <sub>3</sub> | 0,87    | 1,09             | 1,30      | 1,08     | 1,79      |
| Lis.            | 4,43    | 9,52             | 3,09      | 10,00    | 8,19      |
| His.            | 3,55    | 3,22             | 2,77      | 2,11     | 3,65      |
| Arg.            | 10,88   | 10,08            | 9,42      | 9,40     | 12,32     |
| Tri.            | 1,23    | 1,15             | 0,81      | 0,77     | 1,84      |

Tabela 7 - Composição em aminoácidos da farinha delipidada e das diferentes frações proteicas de semente de favela expressa em g de aminoácidos por 16 g de nitrogênio.



|               | Umidade<br>% | Nitrogênio<br>% | Proteína<br>N x 6,25 |
|---------------|--------------|-----------------|----------------------|
| Farinha       | 11,20        | 9,79            | 61,16                |
| Extrato total | 5,60         | 11,17           | 69,78                |
| Globulinas    | 4,10         | 9,94            | 62,13                |
| Albuminas     | 10,60        | 13,17           | 83,31                |
| Glutelinas    | 10,50        | 15,05           | 94,06                |

Tabela 8 - Umidade, nitrogênio total e proteína bruta das amostras utilizadas nas análises de aminoácidos.



relação as demais amostras analisadas. Farinha e glutelinas apresentam em torno de 50% da lisina encontrada nas demais amostras.

Com relação à metionina, observa-se que este aminoácido é encontrado na farinha, sendo detectados apenas traços nas demais frações. Isto se deve provavelmente à presença da metionina na forma livre e/ou associado a peptídeos de baixo peso molecular que são eliminados ao longo do fracionamento, principalmente durante a diálise.

Comparando os resultados obtidos nas diversas frações proteicas (tabela 6), observa-se que todos os aminoácidos essenciais se encontram em quantidade igual, superior ou bem próximo aos níveis recomendados pela FAO (44, 45). No entanto a soma dos aminoácidos essenciais presentes na farinha de favela é superior à soma dos aminoácidos essenciais recomendados pela FAO, sendo a relação igual a 1,25, que equivale a 25,5% a mais, do que o nível mínimo recomendado.

No caso da metionina, apenas a farinha apresenta o teor recomendado; nas demais frações, ela se constitui o aminoácido limitante. Por outro lado, esta deficiência pode ser compensada pela presença de 1/2-cistina que pode substituir de 80 a 89% a quantidade mínima recomendada de metionina (9).

Farinha, extrato total, albuminas e glutelinas não apresentam o nível mínimo de valina recomendado pela FAO. O mesmo é observado para a isoleucina na farinha, glutelina e al-



bumina.

A albumina mostra-se com baixos teores de fenilalanina e triptofano, que não correspondem aos níveis mínimos recomendados.

#### 6.1. Espectro de absorção

Fenilalanina, tirosina e triptofano exibem intensa absorção de luz a um comprimento de onda maior do que 250 nm, devido às suas naturezas aromáticas.

Os comprimentos de onda de absorção máxima (pH 8,0) desses aminoácidos são 260 nm para fenilalanina, 280 nm para triptofano e 294 nm para tirosina. Se uma proteína contém um ou mais desses aminoácidos, poderá absorver luz na região de 260 a 294 nm. Esta propriedade pode ser usada para medir sua concentração na proteína (46, 31).

O espectro de absorção determinado em cinco amostras proteicas da semente de favela é mostrado na figura 15.

Albuminas e glutelinas apresentam um máximo de absorção em 292 nm e um mínimo em 275 nm.

Farinha, extrato total e globulinas não apresentam máximo de absorção nas regiões do ultravioleta. Nas cinco amostras analisadas, não se observa máximo de absorção em 280nm, o que sugere a presença de pequena quantidade de triptofano.



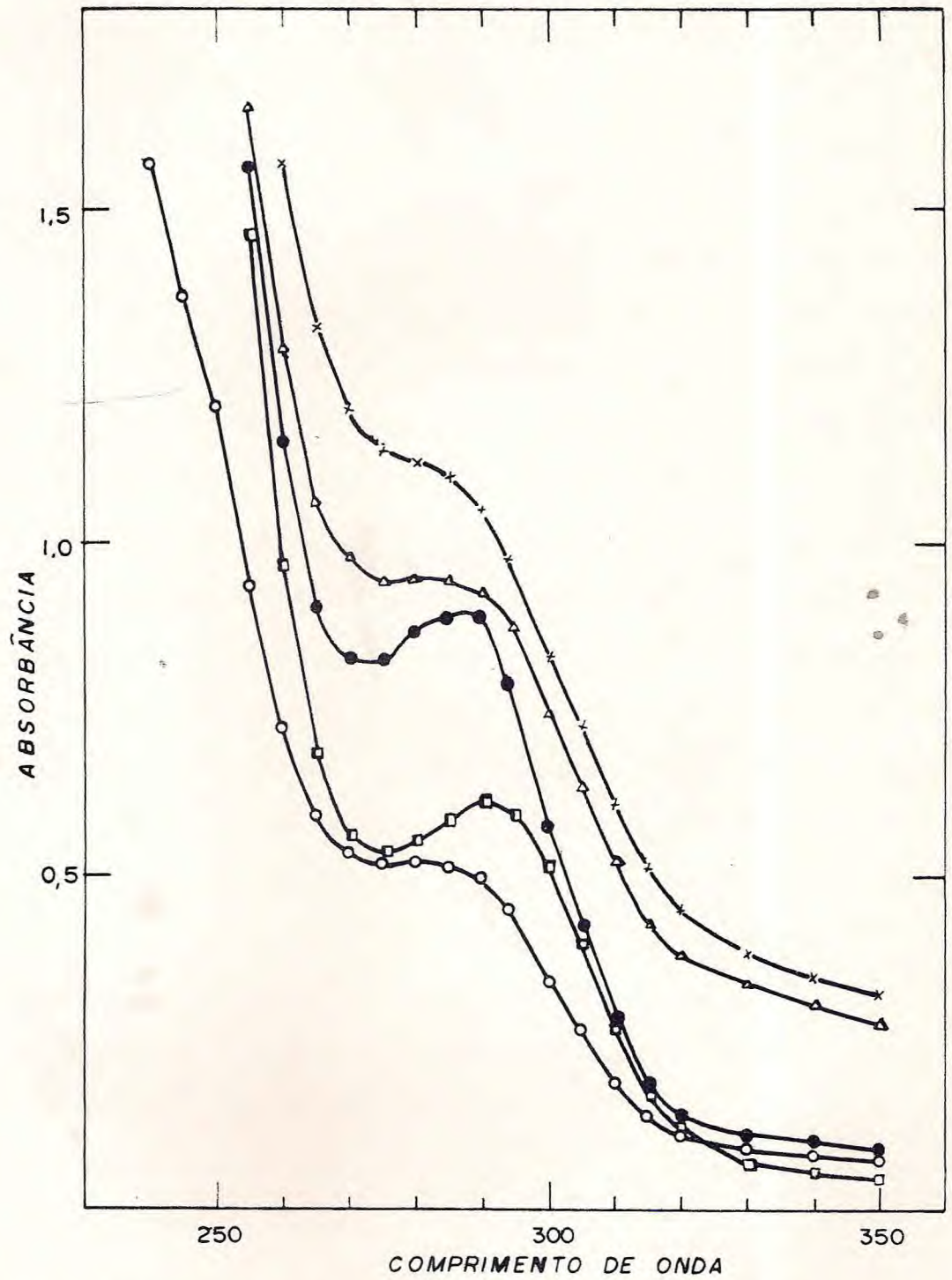


Figura 15 - Espectro de absorção na região do ultravioleta de frações proteicas de semente de favela, dissolvidas em NaOH 0,1N. (—○—) farinha; (—□—) albumina; (—●—) glutelina; (—△—) extrato total; (—x—) globulina.



## 7. Escore químico da farinha de favela

O escore químico foi calculado segundo o método proposto pela FAO e descrito por Cabral (20), no qual toma-se por base o conteúdo de aminoácidos presente no alimento, considerando-se como padrão a composição de aminoácidos do ovo integral, cujo valor biológico é considerado igual a 100.

Segundo a FAO, o escore químico é calculado em três etapas:

- a. somando-se as contribuições de todos os aminoácidos essenciais, incluindo cistina e tirosina;
- b. calculando-se as percentagens dos aminoácidos potencialmente limitantes da proteína;
- c. relacionando-se as percentagens dos aminoácidos componentes da proteína problema, com as correspondentes percentagens destes aminoácidos do ovo integral.

A tabela 9 mostra o teor de aminoácidos essenciais da farinha de favela e do ovo integral e os quocientes correspondentes. Verifica-se que os aminoácidos valina, isoleucina, tirosina e fenilalanina apresentam quocientes menores do que 100, sendo a valina o aminoácido limitante.

O valor encontrado para o escore químico da farinha de favela foi de 63, o qual se mostrou maior do que os encontrados para soja, levedura, farinha de trigo, glúten, zeína e



| Aminoácidos<br>essenciais | Conteúdo de aminoácidos<br>g/16 g N |                 | Total de aminoácidos<br>essenciais<br>% |                 | Quocien-<br>te do<br>aminoá-<br>cido<br>(%) |
|---------------------------|-------------------------------------|-----------------|---|-----------------|---|
|                           | Farinha<br>de<br>favela             | Ovo<br>integral | Farinha<br>de<br>favela                 | Ovo<br>integral |   |
| Tre.                      | 3,46                                | 5,07            | 10,2                                    | 10,2            | 100   |
| Val.                      | 3,12                                | 7,26            | 9,2                                     | 14,6            | <u>63</u>                                   |
| Ile.                      | 3,15                                | 6,64            | 9,3                                     | 13,3            | 70  |
| Leu.                      | 6,21                                | 8,85            | 18,3                                    | 17,8            | >100  |
| Tir.                      | 2,60                                | 4,19            | 7,6                                     | 8,4             | 90  |
| Fen.                      | 3,94                                | 5,84            | 11,6                                    | 11,7            | 99  |
| Lis.                      | 4,43                                | 6,45            | 13,0                                    | 12,9            | >100  |
| Aa-sulfurados             | 7,11                                | 5,54            | 20,9                                    | 11,1            | >100  |

Tabela 9 - Cálculo do escore químico da farinha de favela.



gelatina, sendo comparável ao da caseína (11 , 47).

## 8. Toxidez

### 8.1. Toxidez " in vitro " - ensaio de hemaglutinação

Ao contrário de outros membros da família das Euforbiáceas que apresentam elevados teores de lectinas as quais são presumivelmente um dos responsáveis por transtornos fisiológicos causados pela ingestão de suas sementes, as sementes de favela não apresentaram qualquer atividade hemaglutinante, quando o extrato total foi testado com hemácias dos diversos grupos do sistema ABO.

Esta ausência de atividade hemaglutinante, juntamente com o fato de sementes de favela não apresentaram atividade alergênica (Silva Lima, M.G., comunicação pessoal) e inibição contra tripsina (Xavier-Filho, comunicação pessoal), é uma boa indicação do valor nutritivo das mesmas.

### 8.2. Toxidez "in vivo"

A figura 16 mostra os resultados obtidos quando camundongos foram submetidos a três dietas diferentes, sendo dois controles e um problema. O tratamento A constou de uma dieta controle à base de caseína, amido de milho e óleo, onde se verifica um aumento muito lento no ganho de peso dos animais do



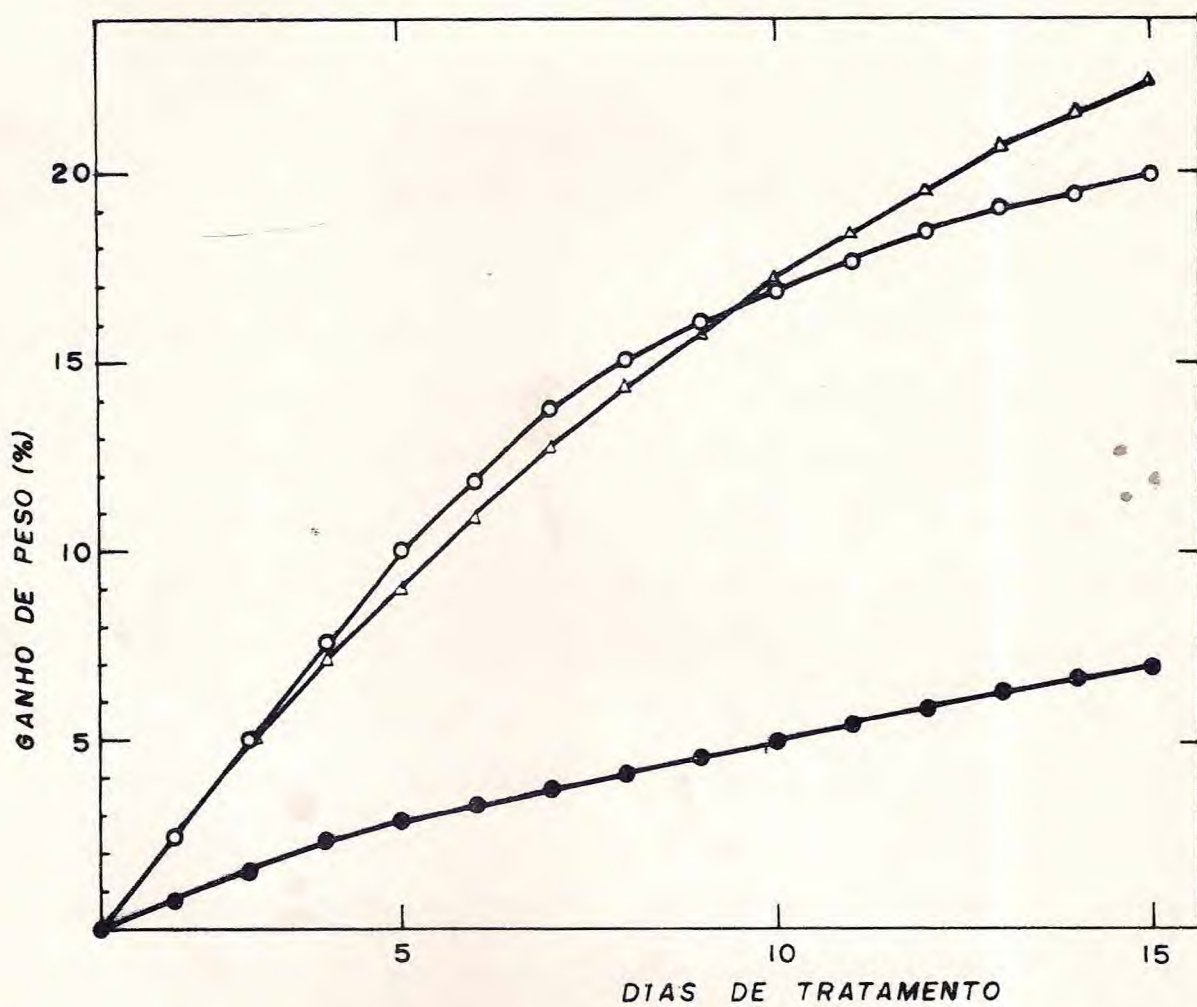


Figura 16 - Variação percentual de peso de camundongos alimentados com diferentes dietas. (—●—) dieta A caseína, (—△—) dieta B farelo de trigo, (—○—) dieta C farinha delipidada de favela.



experimento. Por outro lado, o tratamento B constou de uma dieta controle, na qual foi utilizado farelo de trigo, que é uma ração de crescimento normalmente utilizada na alimentação de animais de pequeno porte. Este tratamento mostrou um aumento acentuado no ganho de peso dos animais, durante todo o experimento. O tratamento C, dieta à base de farinha de favela, amido de milho e óleo, mostrou um comportamento semelhante ao tratamento B, sendo que, nos dez primeiros dias de alimentação, houve um aumento acentuado no ganho de peso, tornando-se mais lento do 11º ao 15º dia, mantendo-se constante até o 20º dia e decrescendo em seguida.

A perda de peso a partir do 20º dia, no tratamento C, deve-se provavelmente a uma deficiência de vitaminas e/ou sais minerais na ração, o que não foi manifestado nos primeiros dias de tratamento, porque a farinha de favela deve apresentar esses elementos mesmo em pequenas concentrações e, conseqüentemente, sendo capaz de atender às necessidades do organismo nos primeiros dias de experimento. Todavia, com o desenvolvimento do animal, o organismo necessitaria de uma quantidade maior desses sais minerais e vitaminas, e não os encontrando na ração nas proporções adequadas, o animal se ressentirá, o que se reflete numa perda de peso.

Esta afirmação torna-se mais conclusiva quando se analisa a dieta A onde não houve nenhuma suplementação de vitaminas e sais minerais e o ganho de peso é muito baixo. Compor-



tamento oposto ocorre na dieta B, que provavelmente apresenta todos os elementos devidamente balanceados e mostra, consequentemente, um aumento normal no ganho de peso, mesmo após o 20º dia de tratamento.

Todos os animais, após encerrado o experimento, passaram a receber uma ração de crescimento, sendo mantidos em observação durante 60 dias, não se verificando a morte de nenhum animal. Isto sugere a ausência de qualquer substância tóxica, mesmo em pequena quantidade. Assim, a farinha de favela pode ser utilizada, como fonte de proteína, na alimentação animal, desde que seja feita uma suplementação adequada de vitaminas e sais minerais.



#### IV. CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos com a análise elementar das sementes de favela confirmam os dados já apresentados na literatura (25 , 27).

2. As proteínas de favela se mostraram quase totalmente solúveis quando tratadas com NaOH 0,1N, sendo que a grande maioria destas (54,9%) é representada pelas glutelinas. Os restantes 36,9% são representados pelo extrato total aquoso (albuminas, globulinas e peptídios dialisáveis). A relação globulina/albumina é de 1,50.

Os resultados obtidos estão em boa concordância com Ventura, M.M. e Lima, I.H. (27).

3. A maioria das albuminas (70,7%) é precipitada entre 40 e 80% de saturação com sulfato de amônio.

4. A maior parte das proteínas de favela apresenta peso molecular igual ou superior a 125.000 daltons, quando submetidas a fracionamento por filtração em gel de Sephadex G-100 (pH 10), embora tenham sido detectados nas albuminas picos menores com pesos moleculares variando desde 6.300 daltons até igual ou acima de 125.000 daltons.



5. Por cromatografia em DEAE-celulose, as albuminas se mostraram bastante complexas apresentando pelo menos sete frações distintas.

6. A análise de aminoácidos revela a presença de todos os aminoácidos essenciais em quantidades relativamente elevadas, com concentrações próximas ou superiores aos níveis recomendados pela FAO.

7. O escore químico determinado para a farinha da semente de favela, mostra que ela tem um excelente valor nutricional, apresentando valina como aminoácido limitante.

8. Não foi detectada a presença de fitohemaglutinina. Fato que, associado à ausência de inibidores de tripsina e alérgenos, mostra a ausência de fatores tóxicos de natureza proteica.

9. Quando camundongos foram alimentados por 15 dias com rações contendo farinha de favela como única fonte de proteína, apresentaram um comportamento semelhante a experimentos controle, quando o farelo de trigo foi usado como única fonte proteica.



10. Tendo em vista os dados obtidos, verifica-se que semente de favela constitui uma fonte promissora de proteína para a alimentação tanto humana como animal.



## V. BIBLIOGRAFIA

1. FAO - Food & Agriculture Organization Production, 1967. Itália, Yearbook, 21.
2. Alves, A.S. 1971. *Cultura do carã da costa*. Banco do Nordeste do Brasil, 66p.
3. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; Estado Mundial de la Agricultura e la Alimentación*. 1958. FAO, Roma, 225p.
4. Scrinshaw, N.S. and Young, V.R. 1976. The requirements of human nutrition. *Scient. Amer.*, 235(3):51.
5. Potter, N.W. 1973. *La ciencia de los alimentos*. Trad. Americana. 1ª ed. Mexico, 749p.
6. Basha, S.M.M. and Cherry, J.P. 1976. Composition solubility and gel electrophoretic properties of protein isolated from florunner (*Arachis hypogaea*, L.) peanutseeds. *J. Agric. Food Chem.*, 24(2): 359-65.
7. Dimler, R.J. 1971. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 48: 400. Citado em 16.
8. Watt, B.K., Merrill, A.L. 1965. Composition of food agriculture. *Handbook*, 8. Revised Dec. Washington. D.C. Consumer and Food Economics Research Division of Agriculture Research Service, Department of Agriculture. Citado em 16.
9. Sgarbieri, V.C. 1977. Importância dos aminoácidos em nutrição e ciência dos alimentos. *Ciência e Cultura*, 29(10): 1552-58.



10. Silva, V.R. 1974. *Proteínas de variedades de feijão comum (P. vulgaris)*. Rio de Janeiro-UFRJ. Tese de mestrado em Bioquímica, 101p.
11. Porter, J.G. and Lolis, B.A. 1973. *Protein in human nutrition*. New York, Academic Press, 560p.
12. Block, R.J. and Mitchell, H.H. 1946/47. *Nutr. Abstr. Rev.* 16: 249-78. Citado em 11.
13. Mitchell, H.H. and Block, R.J. 1946. *J. Biol. Chem.*, 163: 599. Citado em 11.
14. Rao, P.B.R., Norton, H.W., Johnson, B.C. 1946. The amino acid composition and nutritive value of protein. V. Amino acid requirements as a pattern for protein evaluation. *J. Nutrition*, 82: 88-92. Citado em 10.
15. Rose, W.C. et al. 1955. The amino acid requirements of man. XV. The valine requirement. Summary and final observation. *J. Biol. Chem.*, 217: 987-95. Citado em 10.
16. Karakoltsidis, P.A. and Constantinidis, S.M. 1975. Okra Seed. A new protein source. *J. Agric. Food Chem.*, 23(6): 1204-07.
17. Liener, J.E. 1961. Toxic factors in edible legumes and their elimination. *American J. Clinical Nutr.*, 11: 281-98.
18. Almquist, H.J., Mecchi, E., Kratzer, F.H., Gran, C.R. 1942. Soybean protein as a source of amino acids for the duck. *J. Nutrition*, 24 : 385-91.
19. Puzstai, A. 1967. Trypsin inhibitors of plant origin, their chemistry and potential role in animal nutrition. *Nutr.*



- Abstr. Rev., 37: 1-9.
20. Cabral, L.C. 1978. *Contribuição ao estudo da farinha de soja integral*. Fortaleza-UFC. Tese de mestrado em Tecnologia de Alimentos.
  21. SUDENE/IPEAL. 1967. *Contribuição ao estudo das plantas alimentares*. 2: 216p.
  22. Brasil - Presidência da República. 1976. *II Plano Básico de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*.
  23. Duque, G. 1974. *O Nordeste e as lavouras xerófilas*. 2 ed. Mossoró, RN, 238p.
  24. Braga, R. 1976. *Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará*. 3 ed. Col. Mossoroense, 42: 540p.
  25. Machado, R.D., Orlando, J.C. e Fernandes, J.S. 1950. *Favela*. Rev. *Química Industrial*, 14-5.
  26. Rosa, J.S. 1943. Publicação 83. Instituto Nacional de Tecnologia. Rio de Janeiro. Citado em 27.
  27. Ventura, M.M. e Hollanda, I.H. 1959. *Proteína da semente de Favela (Cnidoscolus phyllacanthus, Pax & K. Hoffm)*. I. Solubilização e comportamento eletroforético. *An. da Acad. Bras. Ciências*, 31(4): 536-46.
  28. Hiller, A., Plazin, J. and Slyke, D.V. 1948. A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in proteins. *J. B. C.*, 176: 1401-20.
  29. Baker, P.R.W. 1961. The microkjeldahl determination of nitrogen. *Talanta*, 8: 57-70.



30. Triebold, H.O. 1946. *Quantitative analysis with applications to agricultural and food products*. New York, D. Van Nostrand Co., 331p.
31. Bailey, J.L. 1967. *Techniques in protein chemistry*. 2nd. New York, revised and expanded edition, Elsevier Publishing Co., 406p.
32. Moreira, R.A. 1975. *Isolamento e caracterização de uma lectina de Phaseolus vulgaris*. Rio de Janeiro UFRJ, Tese de doutorado, 111p.
33. Determann, H. 1969. *Gel chromatography - gel filtration, gel permeation, molecular sieves*. 2nd. ed. New York, Springer - Verlag, 202p.
34. Peterson, E.A. 1975. *Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. New York, North-Holland Publishing Co. Amsterdam Oxford.
35. Clarke, J.T. 1964. Simplified "disc" (polyacrylamide gel) electroforesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 121: art. 2, 428.
36. Weber, K. and Osborn, M. 1969. The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244(16):4406-12.
37. Spackman, D.H., Stein, W.H. and Moore, S. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, 30: 1190.
38. Piez, K.A. and Morris, L. 1960. A modified procedure for automatic analysis of amino acid. *Anal. Biochem.*, 1: 187.



39. Schram, E., Moore, S.C., Bigwood, E. J. 1954. Chromatographic determination of cystine as cysteic acid. *J. Biochem.*, 57: 33.
40. Blackburn, S. 1968. *Amino acid determination, methods and technique*. New York, Marcel Dekker, 271p.
41. Goodwin, T.W. and Morton, R.A. 1964. The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Biochem. J.*, 40: 628.
42. Beaven, G.H. and Holliday, E.R. 1952. Ultraviolet spectro of protein and amino acids. In: Neurath H.ed. *Advances in Protein Chemistry*, 7: 319.
43. Xavier-Filho and Moreira, R.A. 1978. Visualization of proteinase inhibitors in SDS-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 84: 296-303.
44. FAO/W.H.O. 1965. Protein requirements. *F.A.O. Nutr. Mtg. Req. Sci.* n° 37 (Food and Agricultural Organization, Rome). Citado em 45.
45. Pirie, N.W. 1971. *Leaf protein its agronomy, preparation, quality and use*. IBP Handbook n° 20. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, U.K.
46. Lehninger, A.L. 1976. *Bioquímica; Componentes moleculares das células*. 2ed. São Paulo. Edgard Blücher, 262p.
47. Akeson, W.A. and Stahmann, M.A. 1964. A pepsin pancreatic digest index of protein quality evaluation. *Journal of Nutrition*, 83 (3): 257-61.