



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

NATHANNA MATEUS DE SOUSA

**ISOLADO PROTEICO DE *Amburana cearensis* (ALLEMAO) A. C. SMITH COMO
NOVA FONTE DE PROTEÍNAS ALIMENTARES: CARACTERIZAÇÃO
FUNCIONAL E ANÁLISE TOXICOGENÔMICA COMPARATIVA COM OUTRAS
PROTEÍNAS VEGETAIS**

FORTALEZA

2014

NATHANNA MATEUS DE SOUSA

**ISOLADO PROTEICO DE *Amburana cearensis* (ALLEMAO) A. C. SMITH COMO
NOVA FONTE DE PROTEÍNAS ALIMENTARES: CARACTERIZAÇÃO
FUNCIONAL E ANÁLISE TOXICOGENÔMICA COMPARATIVA COM OUTRAS
PROTEÍNAS VEGETAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof^a. Dra. Ana F.F. Urano Carvalho.

Coorientador: Dr. Ad. A.C.M. Peijnenburg.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- S967i Sousa, Nathanna Mateus de.
Isolado proteico de *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith como nova fonte de proteínas alimentares: caracterização funcional e análise toxicogenômica comparativa com outras proteínas vegetais / Nathanna Mateus de Sousa. – 2014.
141 f.; il., color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Profª. Dra. Ana F. F. Urano Carvalho.
Coorientação: Prof. Dr. A. C. M. Peijnenburg.
1. Leguminosa. 2. Alimentos - Teor proteico. 3. Proteínas vegetais. 4. Sementes. I. Título.

CDD 574.192

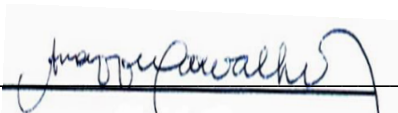
NATHANNA MATEUS DE SOUSA

**ISOLADO PROTEICO DE *Amburana cearensis* (ALLEMAO) A. C. SMITH COMO
NOVA FONTE DE PROTEÍNAS ALIMENTARES: CARACTERIZAÇÃO
FUNCIONAL E ANÁLISE TOXICOGENÔMICA COMPARATIVA COM OUTRAS
PROTEÍNAS VEGETAIS**

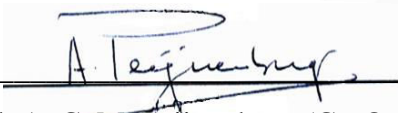
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Bioquímica.
Área de concentração: Bioquímica.

Aprovada em: 09 / 05 / 2014.

BANCA EXAMINADORA

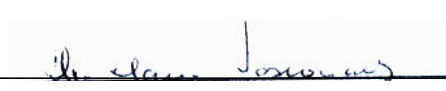


Prof^ª. Dr^ª. Ana F.F. Urbano-Carvalho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

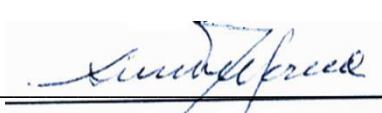


Dr. Ad. A. C. M. Peijnenburg (Co-Orientador)

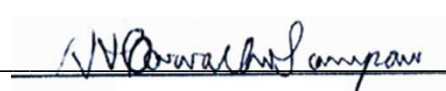
RIKILT - Institute of Food Safety, Wageningen University and Research (WUR)



Prof^ª. Dr^ª. Ilka Maria Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)



Prof^ª. Dr^ª. Helena Alves de Carvalho Sampaio
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

Após 12 anos fazendo parte da Universidade Federal do Ceará, me sinto privilegiada por todas as oportunidades que tive até aqui e, como não poderia ser diferente, tenho muito a agradecer a todos os que participaram dessa jornada até aqui.

À minha orientadora, Dra. Ana Urano Carvalho, com quem tive o primeiro contato no segundo semestre da graduação, por me aceitar em seu laboratório há 10 anos e me encantar com um mundo novo a ser descoberto. Professora de duas das melhores disciplinas da graduação, em minha opinião, seus métodos de avaliação são algo que me marcaram muito e que eu já tomei pra mim. Obrigada por confiar em mim, me incentivar, me guiar na vida científica desde a graduação e pela amizade e apoio nas questões pessoais. Você se tornou uma referência não só pra mim, mas também para Luana, que muito lhe admira.

Ao co-orientador de parte deste trabalho, Dr. Ad. Peijnenburg, por aceitar tão prontamente realizar este trabalho, acreditando em mim e aceitando o desafio de uma amostra fora da sua rotina. Obrigada pela acolhida, quando em seu país, e pela amizade. Você está na lista das pessoas que eu passei a admirar profundamente, não apenas pelo profissionalismo, mas também pela simplicidade. *Dankjewel*.

À professora Dra. Ilka Vasconcelos, por estar sempre disponível, desde a graduação, para ajudar no que fosse preciso. Obrigada pelas melhores aulas de bioquímica e das outras disciplinas, vc é uma inspiração. Obrigada pela confiança que muito me lisonjeia e ainda por aceitar o convite de compor a banca deste trabalho. Suas contribuições são muito bem vindas e muito valiosas.

À professora Dra. Helena Sampaio, que também teve participação no meu intercâmbio, pois confiou me recomendar como membro externo. Obrigada por isso e também por ter aceitado contribuir com este trabalho ao participar da banca. Sua visão de nutricionista, fora da minha rotina, enriquece muito este trabalho.

Ao professor Dr. Renato Moreira, que eu também tive o imenso prazer de ter como professor em uma disciplina da pós-graduação (uma das mais proveitosas e intensas, diga-se de passagem). Obrigada por ter participado da banca deste trabalho, contribuindo com ótimas críticas, correções e sugestões.

Aos demais professores dos Departamentos de Bioquímica e Biologia Molecular e de Biologia, da Universidade Federal do Ceará, eu agradeço pelas lições recebidas, experiências compartilhadas e tempo disponibilizado. Aos funcionários do DBBM e do Dep. de Biologia, sem os quais seria inviável a realização do nosso trabalho de cada dia. Dois

desses funcionários foram muito especiais em todo este tempo, pois participaram diariamente da minha vida ao longo desses anos. Berenice Alves, o braço direito (e o esquerdo) do Biopropec, não mede esforços para conseguir melhorias para o lab, por isso tudo te admiro e te agradeço Berê. E o indispensável Valdenor, sem o qual o Bloco 909 não seria o mesmo, sem seu sonoro *Yes!* e o radinho nas manhãs de sábado. Obrigada por deixar nosso bloco sempre impecável e pela alegria no dia-a-dia.

À minha “família BIOPROSPEC”, Laboratório de Bioprospecção de Produtos Regionais, mesmo com as idas e vindas, com as despedidas e chegadas de novos membros, essa equipe é incomparável. Ainda bem. Cada um que passou por lá teve sua importância no meu caminho, mesmo não estando mais atualmente, mesmo nem tendo mais contato, guardo todos com muito carinho. Quem me conhece sabe que minha memória não é das melhores, então não vou citar nomes dos ex-Bioprospec pra fugir do inevitável. A essa turma que todo ano faz a melhor confraternização de natal, que sempre se ajuda nos momentos de desespero, que compartilha as maravilhosas pausas para café na copa, muito obrigada. Nayana Soares, Leonardo Rogério, Pedro Matheus, Thaís Borges, Luna Vasconcelos, Paulo Ricardo, Igor Parra, Jackeline Medeiros e Fernanda Maia, obrigada por tudo. Thiago Almeida, obrigada especialmente por ter me ajudado com a correção do texto quando eu já não enxergava mais nada.

Agradeço aos meus especiais, não por serem melhores que os outros, mas que por serem mais próximos e/ou terem mais afinidade, acabaram compartilhado mais da minha vida pessoal e o cérebro não entende isso e faz com que tenhamos maior apego por eles. Gabrielle Freire, a primeira aluna que eu ajudei a formar na iniciação científica e agora no mestrado, é um prazer ver seu crescimento. Muito obrigada por aguentar minhas *nathannices* e me seguir sem reclamar nos fins de semana, feriados ou até mais tarde quando preciso. Torço muito por ti. Martônio Viana, por quem no começo nutria um sentimento quase que de amor e ódio por não conseguir decidir qual dos dois era o mais teimoso! Ainda não tenho essa resposta, mas isso não me incomoda mais. Sou muito grata a você por todas as vezes que já me socorreu e que me deu seus sempre maduros conselhos, científicos ou não. Você tem um coração enorme, e um grande senso de justiça. Torço muito por você, que você tenha tudo o que merece vivendo o seu *American dream* com sua esposa. Luiz Filho, mais um de quem fui me aproximando aos poucos e que só depois de conhecer mais de perto vi que era um amor de pessoa. É engraçada essa coisa de repente gostar de alguém que por muito tempo você não se permitia aproximar. Muito obrigada por compartilhar tantos cafés na copa e por sempre ajudar quando preciso, inclusive como revisor de texto. Davi Farias, com quem compartilho quase

todo o trajeto dessa caminhada até aqui, obrigada por toda ajuda, conselhos e dicas. Obrigada por me socorrer nos momentos em que ligava lá do RIKILT perguntando como você tinha feito algum ensaio. Sua amizade é algo precioso. Por fim, Lady Clarissa Rocha, minha *gêmea acadêmica*, desde a graduação até a metade do doutorado, época das primeiras divergências no percurso. Sua amizade me dá muita força e é algo que espero levar por muito tempo.

A todos os colegas do RIKILT, sendo os mais próximos, além do Ad Peijnenburg, Geert Stoop, Peter Hendriksen, Liza Portier, Eveline Kramer, Jia Shao, Si Wang e a querida Astrid Hamers, que foi um grande apoio desde o início, por quem eu tenho um imenso carinho. Obrigada por toda ajuda e amizade. Aos brasileiros, expatriados com eu, que conheci por lá, dentro e fora do RIKILT. Pela essencial ajuda no começo, na adaptação à nova rotina, tão diferente, agradeço a Gis Bremer, Andrea Martins e Joseph Evaristo. Aos que foram chegando depois por todos os momentos agradáveis, os cafés nos corredores, os almoços no Forum, os jantares e comemorações. Boas lembranças principalmente de Ana Paula Martins, Cristina e Luiz Batista (e seus filhos lindos), Roberta Mariot, Anna Patrícia Florentino, Diego Pujoni e Marcelo Murad. E minhas vizinhas em Beringhem, Bennekon: Juliana, Lidiane, Lisiane, Sofia e Mariana, que apesar de pertinho passei pouco tempo junto. Especialmente a querida Ianna Dantas, que foi realmente uma *irmã*. Talvez vocês não saibam, mas foram importantes em algum momento pra mim.

Saindo do geral e indo para o particular, agradeço à minha mãe e meu pai, por serem exemplos e inspiração pra mim. Foi por vocês, pra lhes dar orgulho que, em muitos momentos, decidi continuar. Aos meus irmãos, Roberta e Henrique, mesmo estando distantes (física ou emocionalmente) seremos sempre irmãos. Agradeço muito pelas minhas sobrinhas lindas, Luisa e Letícia, e em breve Robertinho. À minha filha do coração Luana Paula, essa menina que eu adotei pra mim, por ser minha amiga, companheira, conselheira, *personal stylist* e a lista continua... Sua coragem e determinação me inspiram. Muito obrigada, Lulu. E meu maior incentivador, o principal responsável por eu ter chegado até aqui, quem me dava aquele empurrãozinho nos vários momentos de fraqueza, meu marido, meu namorado e meu amigo Othon Aguiar. Obrigada por ser você e por sempre estar aqui do meu lado, mesmo antes de eu perceber que preciso de sua ajuda.

Muito obrigada meu Deus, por mais este passo nessa longa jornada.

Deus é o dono de tudo. Devo a Ele a oportunidade que tive de chegar aonde cheguei. Muitas pessoas têm essa capacidade, mas não têm essa oportunidade. Ele a deu para mim, não sei por quê. Sei que não posso desperdiçá-la.

Ayrton Senna

Este trabalho foi financiado com recursos do projeto de pesquisa “Valorização de Espécies Vegetais de Áreas Semi-Áridas Susceptíveis à Desertificação no Estado do Ceará: Desenvolvimento de Bioprodutos Alimentícios e Inseticidas/Repelentes com Elevado Valor Sócio-Ambiental Agregado” e foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que concedeu uma bolsa de doutorado no país e uma de bolsa de doutorado sanduíche no exterior, que proporcionou que parte do trabalho fosse conduzido no RIKILT, Universidade de Wageningen, Holanda.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

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.

RIKILT – Institute of Food Safety e Zodiac, WUR – Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Holanda.

Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

"O maior serviço que pode ser prestado a qualquer país é acrescentar uma planta a sua [agri]cultura" Thomas Jefferson.

RESUMO

Amburana cearensis (cumaru) é uma leguminosa subutilizada da Caatinga. O alto teor proteico das sementes faz delas uma possível nova fonte de proteínas alimentares. Foram determinadas as melhores condições de extração proteica para posterior produção do isolado proteico de cumaru (IPAc). As análises também foram conduzidas com a farinha delipidada (FDAc) e com um isolado proteico de soja comercial (IPS). IPAc apresentou teor proteico > 90% e composição de aminoácidos comparável a IPS, com notável deficiência em metionina. Foram determinadas algumas propriedades funcionais para predizer sua adequação como ingrediente na indústria alimentícia. Os resultados para FDAc, IPAc e IPS foram, respectivamente: solubilidade 20-79; 9-99 e 3-76%; capacidade de retenção de água 1,7; 3,9 e 7,5 g/g; capacidade de retenção de óleo 1,5; 6,3 e 1,6 g/g; capacidade emulsificante / estabilidade 52 / 46%; 55 / 51% e 53 / 21%; capacidade espumante / estabilidade 47 / 32%; 65 / 53% e 33 / 8 e menor concentração geleificante 18, 16 e 12%. Para investigar se IPAc e IPS apresentam indícios de toxicidade, células de adenocarcinoma humano foram expostas por 24 h aos isolados. Para comparação, também foi realizada exposição com os isolados de soja (IPGm), feijão comum (IPPv), feijão de porco (IPCe) e mamona (IPRc), a fração proteica de mamona (FPRc), as lectinas PHA-E e ConA e o controle químico (Ctrl_Quim). O RNA das células foi hibridizado em microarranjos contendo o genoma humano completo. Os perfis de expressão gênica após exposição às proteínas foram comparados aos de PBS e Ctrl_Quim e agrupados hierarquicamente. Ctrl_Quim, IPAc e IPGm se mostraram inadequados para a continuação das análises por provocar um efeito superestimado. A análise de vias e processos biológicos afetados apontou que genes envolvidos com a biossíntese de colesterol, estresse do RE e resposta imune foram superexpressos e genes envolvidos com o ciclo celular e replicação do DNA foram subexpressos após exposição a IPPv, IPCe, PHA-E e ConA. As amostras IPRc e FPRc regularam para cima genes envolvidos com a apoptose e resposta imune e para baixo genes envolvidos com o ciclo celular e sinalização do cAMP. Análise do mapa conectivo mostrou alta correlação de ConA, PHA-E e IPCe com drogas bloqueadoras de canais de Ca^{2+} e de K^{+} ; enquanto IPRc e FPRc apresentam função biológica semelhante a pelo menos seis drogas inibitórias da síntese proteica. Conclui-se que IPAc tem grande potencialidade como novo alimento proteico com grande aplicabilidade na indústria de alimentos, devendo, no entanto, sofrer modificações no método de obtenção visando a melhora na solubilidade e a eliminação do sal residual. **Palavras-chave:** *Amburana cearensis*. Isolado proteico. Propriedades funcionais. Toxicogenômica. Transcriptômica.

ABSTRACT

Amburana cearensis (cumaru) is an underutilized legume from Caatinga. Because of their high protein content its seeds are a possible novel source of food protein. Were determined the best conditions for protein extraction and preparation of protein isolate (IPAc). Analysis were carried out also with the defatted flour (FDAc) and with a marketed soybean protein isolate (IPS). IPAc showed protein content of 90% and amino acid composition compatible with the IPS's composition, with remarkable low methionine content. Some functional properties were measured in order to predict the adequacy of the isolates as an ingredient for food industry. The results for FDAc, IPAc and IPS were, respectively: solubility 20-79; 9-99 e 3-76%; water holding capacity 1.7; 3.9 e 7.5 g/g; oil holding capacity 1.5; 6.3 e 1.6 g/g; emulsion formation / stability 52 / 46%; 55 / 51% e 53 / 21%; foamability / stability 47 / 32%; 65 / 53% e 33 / 8; least gelling concentration (LGC) 18, 16 and 12%. In order to investigate whether IPAc e IPS exhibit signs of toxicity, two cell lines of human adenocarcinoma (MCF-7 e Caco-2) were exposed to these isolates as well as to others prepared from soyabean (IPGm), white bean (IPPv), Jack bean (IPCe) and castor bean (IPRc), to the protein fraction from castor bean (FPRc), to the lectins PHA-E and ConA (50 µg/mL) and to the chemical control (Ctrl_Quim). Subcitotoxic doses were determined by viability test to later exposure assay for 24 h. The MCF-7 cell's RNA were extracted and hybridized to a microarray containing the complete human genome. The expression profiles after the exposition to the proteins were compared to that ones generated after PBS and Ctrl_Quim and hierarchically clustered. Ctrl_Quim, IPAc and IPGm were unsuitable for further analysis by their overestimated effect. Analysis of biological pathways and process showed that genes involved with the cholesterol biosynthesis, ER stress and immune response were upregulated and genes involved with cell cycle and DNA replication were downregulated after exposure of cells to IPPv, IPCe, PHA-E and ConA. The samples IPRc and FPRc upregulated genes involved with apoptosis and immune response and downregulated genes involved with cell cycle and cAMP signaling. Connectivity Map analysis showed high correlation of ConA, PHA-E and IPCe with drugs that are Ca²⁺ and K⁺ channel blockers, while IPRc and FPRc showed biological function similar to at least six drugs inhibitors of protein synthesis. It's possible to conclude that the IPAc has a high potentiality as a novel protein food with wide applicability in the food industry and should, however, be modified in the method of obtaining aiming the improvement in its solubility and eliminating the residual salt. **Keywords:** *Amburana cearensis*. Protein isolate. Functional properties. Toxicogenomics. Transcriptomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biomas do Brasil.....	25
Figura 2 - Planta adulta, folhas, flores, frutos e sementes de <i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A. C. Smith. A) Planta adulta com a folhagem no período chuvoso; B) Planta adulta em frutificação, sem a folhagem, no período seco; C) Folhas; D) Flores; E) Frutos (vagens); F) Sementes aladas (secas).....	30
Figura 3 - Usos de <i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A. C. Smith. A) Sementes vendidas em loja de produtos naturais em São Paulo - SP. B) Rapé (sementes secas e moídas). C) Cascas secas vendidas em feira livre. D) Fitoterápico xarope de cumaru vendido em farmácias em Fortaleza - CE. E) Cerveja artesanal aromatizada em barris de madeira de cumaru em Pinhais - PR. F) Móveis feitos com madeira de cumaru à venda em loja do Reino Unido. G) Óleo aromático relaxante com óleo de cumaru na composição à venda na <i>internet</i>	31
Figura 4 - Os 20 aminoácidos proteicos. Estruturas predominantes em pH 7,0. A porção sombreada representa o ligante variável, ou -R.....	34
Figura 5 - Etapas requeridas pela ANVISA para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes.....	51
Figura 6 - Esquema resumido das etapas de obtenção do isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i>	65
Figura 7 - Série de Hofmeister e sua influência sobre proteínas.....	75
Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	82
Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando o perfil proteico semelhante da suspensão, sobrenadante e resíduo do IPPv e sua baixa solubilidade.....	101
Figura 10 - Imagem digitalizada de gel de poliacrilamida com curva de calibração de BSA (A) e gráfico mostrando alta correlação entre a quantidade de proteína em cada raia e a quantidade de pixels medida em sistema de imagem em infravermelho (B).....	103

- Figura 11 - Imagem escaneada de gel de poliacrilamida com raias contendo 3 concentrações de BSA para calibração e as amostras a serem quantificadas. A: apresentação em escala de cinza e B: apresentação colorida..... 104
- Figura 12 - *Heat-maps* mostrando agrupamento hierárquico supervisionado dos genes diferencialmente expressos por células MCF-7 expostas por 24 h a diferentes amostras. A) 2810 genes regulados pelas amostras quando comparados à média dos três controles químicos; B) 3618 genes regulados pelas amostras quando comparados ao PBS; C) 912 genes regulados pelo controle químico (média de 3 microarranjos) quando comparados ao PBS; Vias ou processos biológicos para os quais os genes super- (n=579) ou subexpressos (n=333) são mais representativos, de acordo com o indicado pela análise com a ferramenta MetaCore..... 109
- Figura 13 - *Heat-maps* mostrando agrupamento hierárquico dos genes diferencialmente expressos por células MCF-7 expostas por 24 h às amostras contendo < 25% de controle químico. A) 3259 genes diferencialmente expressos (> 2,0) por pelo menos um dos tratamentos ConA, PHA-E, IPCe e IPPv quando comparados ao PBS (1650 super- e 1609 subexpressos); B) 647 genes diferencialmente expressos (> 1,62) por pelo menos um dos tratamentos ConA, PHA-E, IPCe e IPPv quando comparados ao PBS (443 super- e 204 subexpressos); C) 604 genes diferencialmente expressos (> 2,0) por pelo menos um dos tratamentos FPRc e IPRc quando comparados ao PBS (405 super- e 199 subexpressos) Vias ou processos biológicos para os quais os genes super- ou subexpressos são mais representativos, de acordo com o indicado pela análise com a ferramenta MetaCore, são mostrados em B e C..... 112
- Figura 14 - Efeitos na expressão diferencial de genes após exposição por 24 h de células MCF-7 às amostras de ConA, PHA-E, IPCe e IPPv. Vias e processos envolvidos na sinalização da IL-6 e na biossíntese de colesterol. (A) via de sinalização da IL-6; (B) biossíntese de colesterol..... 115
- Figura 15 - Efeitos na expressão diferencial de genes após exposição por 24 h de células MCF-7 às amostras de FPRc e IPRc. De acordo com os resultados

fornecidos pela ferramenta MetaCore para análise de vias e processos biológicos, FPRc e IPRc promovem o aumento da expressão de genes envolvidos na apoptose induzida por estresse (A) enquanto causam menor expressão de genes associados com a sinalização do cAMP (B) e com o ciclo celular (C)..... 117

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito de diferentes variáveis sobre a extratibilidade das proteínas de sementes de <i>Amburana cearensis</i> . Quando não estavam sendo testados, os outros parâmetros eram: uma extração de 1 h em água destilada, proporção 1:50 (m/v), pH 7,0, temperatura ambiente). A: proporção farinha:solvente (m/v) e re-extração; B: tempo de extração; C: presença de sais; D: concentração do sal escolhido; E: diferentes pHs de extração....	73
Gráfico 2 - Perfil de solubilidade do nitrogênio e propriedades funcionais de FDAC ¹ , IPAC ² e IPS ³ . A: Perfil de solubilidade do nitrogênio; B: Capacidade de retenção de água (CRA) e capacidade de retenção de óleo (CRO); C: Capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão após 30 min. a 80 °C; D: Capacidade espumante e estabilidade da espuma após 30, 60, 90 e 120 min.....	85
Gráfico 3 - Efeito das amostras testadas em diferentes doses sobre a viabilidade de células MCF-7 (A), e Caco-2 (B), após 24 h.....	106
Gráfico 4 - Rendimento de RNA (ng/μl) isolado de células MCF-7 expostas às amostras selecionadas para posterior hibridização ¹ e análise do perfil de expressão gênica.....	107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Espécies vegetais cujas sementes já foram relatadas como fonte de isolados proteicos. Espécies tradicionalmente já consumidas.....	40
Quadro 2 - Espécies vegetais cujas sementes já foram relatadas como fonte de isolados proteicos. Espécies selvagens, negligenciadas ou subutilizadas....	41
Quadro 3 - Variáveis analisadas durante a determinação das condições ideais de extração das proteínas de <i>Amburana cearensis</i> . Os valores na coluna Condição Neutra são considerados como padrão.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de isolado proteico de cumaru sob diferentes condições. Extração realizada com solução de NaCl 0,5 M, 1 h e proteínas precipitadas em pH 3,5, dialisadas contra água destilada e liofilizadas.....	78
Tabela 2 - Composição de proximal de FIAC, FDAC, IPAC e IPS em comparação com valores mínimo e máximo encontrados em estudo realizado com 14 espécies subutilizadas de leguminosas da Caatinga.....	79
Tabela 3 - Composição de aminoácidos (g / 100 g de proteína) de FDAC, IPAC e IPS comparada à composição de sementes de soja e aos requerimentos diários estabelecidos pela FAO/WHO/UNU para crianças.....	80
Tabela 4 - Perfil de solubilidade do nitrogênio e propriedades funcionais de FDAC, IPAC e IPS.....	86
Tabela 5 - Dados do Mapa Conectivo obtido a partir das assinaturas de expressão das lectinas ConA e PHA-E, das preparações proteicas IPCe, IPPv, IPRc e FPRc em células MCF-7.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGM	Alimentos Geneticamente Modificados
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
Caco-2	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano NCI-PBCF-HTB36
CDB	Convenção de Diversidade Biológica
cDNA	DNA complementar
CEm	Capacidade emulsificante
CEs	Capacidade espumante
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
ConA	Concanavalina A de <i>Canavalia ensiformis</i>
CRA	Capacidade de retenção de água
CRO	Capacidade de retenção de óleo
DMEM	Meio de cultura de células Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM	Meio de cultura de células <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EB	Extrato bruto
EEm	Estabilidade da emulsão
EEs	Estabilidade da espuma
EP	Extrato proteico
EPd	Extrato proteico dialisado
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i> (sigla em inglês para Marcador de Sequência Expressa)
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FBS	Soro fetal bovino
FDAc	Farinha delipidada de <i>Amburana cearensis</i>
FIAc	Farinha integral de <i>Amburana cearensis</i>
FPRc	Fração proteica de <i>Ricinus communis</i>
FTSS	Floresta tropical sazonalmente seca
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (sigla em inglês para cromatografia líquida de alta eficiência)
IP	Isolado proteico

IPAc	Isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i>
IPCe	Isolado proteico de <i>Canavalia ensiformis</i>
IPPv	Isolado proteico de <i>Phaseolus vulgaris</i>
IPRc	Isolado proteico de <i>Ricinus communis</i>
IPS	Isolado proteico de soja
kDa	Unidade de massa atômica quilo Dalton (Dalton x 1.000)
KI	Iodeto de potássio
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> (lipoproteínas de baixa densidade)
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano NCI-PBCF-HTB22
MCG	Menor concentração geleificante
MMA	Ministério do Meio Ambiente
OMS	Organização Mundial da Saúde
p. ex.	por exemplo
P.A.	Reagente em grau analítico (pró-análise)
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA-E	Eritroaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PI	Ponto isoelétrico
RB	Rendimento bruto
RLP	Rendimento líquido de proteínas
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SDTF	<i>Seasonally Dry Tropical Forest</i> (Floresta Tropical Sazonalmente Seca)
U/T	Solução de ureia/tiourea (7:2 v/v)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 CAATINGA.....	23
1.2 BIODIVERSIDADE E ALIMENTAÇÃO.....	26
1.3 <i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A. C. Smith.....	29
1.4 PROTEÍNAS VEGETAIS.....	33
1.5 ISOLADOS PROTEICOS.....	38
1.6 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE PROTEÍNAS EM ALIMENTOS.....	43
1.6.1 Solubilidade.....	43
1.6.2 Capacidade de retenção de água e de óleo.....	44
1.6.3 Capacidade emulsificante.....	45
1.6.4 Capacidade espumante.....	45
1.6.5 Capacidade geleificante.....	46
1.7 SEGURANÇA DE ALIMENTOS.....	47
1.8 TOXICOGENÔMICA.....	52
<u>2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE</u>	
<u>ISOLADO PROTEICO DE SEMENTES DE <i>Amburana cearensis</i>.....</u>	56
2.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA / JUSTIFICATIVA.....	57
2.2 OBJETIVOS.....	59
2.2.1 Objetivo geral.....	59
2.2.2 Objetivos específicos.....	59
2.3 MATERIAIS.....	60
2.3.1 Sementes de cumaru e isolado proteico de soja.....	60
2.3.2 Material biológico, reagentes químicos e outros materiais.....	60
2.4 METODOLOGIA.....	61
2.4.1 Processamento das sementes.....	61
2.4.2 Determinação das melhores condições para extração das proteínas de	
FDAC.....	61
2.4.3 Produção dos isolados proteicos.....	63
2.4.4 Composição proximal.....	64
2.4.4.1 Umidade.....	64
2.4.4.2 Proteínas totais.....	64

2.4.4.3 Lipídios totais.....	66
2.4.4.4 Matéria mineral.....	66
2.4.4.5 Fibra alimentar total (FAT).....	66
2.4.4.6 Carboidratos digeríveis.....	67
2.4.5 Composição de aminoácidos.....	67
2.4.6 Perfil eletroforético - eletroforese em gel de poliacrilamida.....	67
2.4.7 Determinação do perfil de solubilidade proteica e propriedades funcionais.....	68
2.4.7.1 Perfil de solubilidade proteica.....	68
2.4.7.2 Capacidade de retenção de água e óleo.....	68
2.4.7.3 Capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão.....	69
2.4.7.4 Capacidade espumante e estabilidade da espuma.....	69
2.4.7.5 Menor concentração geleificante.....	70
2.4.8 Análise estatística.....	70
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
2.5.1 Determinação das melhores condições para extração das proteínas de FDAC.....	71
2.5.2 Produção do isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i>	76
2.5.3 Composição proximal.....	77
2.5.4 Composição aminoacídica.....	77
2.5.5 Perfil Eletroforético - eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS.....	81
2.5.6 Determinação do perfil de solubilidade proteica e propriedades funcionais.....	83
2.6 CONCLUSÃO.....	87
3 - ANÁLISE TOXICOGENÔMICA IN VITRO DE ISOLADO PROTEICO DE SEMENTES DE <i>Amburana cearensis</i> (Allemao) A. C. Smith.....	88
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA / JUSTIFICATIVA.....	89
3.2 OBJETIVOS.....	91
3.2.1 Objetivo geral.....	91
3.2.2 Objetivos específicos.....	91
3.3 MATERIAIS	92
3.3.1 Sementes e proteínas controle.....	92

3.3.2 Materiais para quantificação de proteínas e eletroforeses.....	92
3.3.3 Linhagens celulares e manutenção das culturas.....	92
3.3.4 Materiais para testes de viabilidade celular.....	93
3.3.5 Materiais para exposição das células MCF-7 e Caco-2 às amostras e posterior isolamento e purificação de RNA total.....	93
3.4 METODOLOGIA.....	94
3.4.1 Processamento das sementes e produção de isolados proteicos.....	94
3.4.2 Perfil Eletroforético - eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS.....	94
3.4.3 Quantificação indireta de proteínas.....	95
3.4.4 Preparo de soluções das amostras em diferentes doses para teste de viabilidade celular e de exposição.....	95
3.4.5 Teste de viabilidade celular.....	96
3.4.6 Ensaios de exposição de células MCF-7 e Caco-2 às proteínas teste para análise do perfil de expressão gênica.....	97
3.4.7 Isolamento, purificação, quantificação e pureza das amostras de RNA total.....	97
3.4.8 Hibridizações em microarranjos de DNA.....	98
3.4.9 Controle de qualidade e normalização dos dados dos microarranjos.....	98
3.4.10 Interpretação biológica.....	99
3.4.10.1 Agrupamento hierárquico e análise de vias biológicas.....	99
3.4.10.2 Análises funcionais dos genes com expressão diferenciada.....	99
3.4.10.3 Análises de Mapa Conectivo (<i>“Connectivity Map Analysis”</i>) dos dados dos microarranjos.....	99
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	100
3.5.1 Produção de isolados proteicos.....	100
3.5.2 Quantificação de proteínas e eletroforeses.....	100
3.5.3 Teste de viabilidade celular.....	102
3.5.4 Hibridização aos microarranjos.....	105
3.5.5 Agrupamento hierárquico e análise de vias biológicas.....	105
3.5.6 Análises do Mapa Conectivo.....	120
3.6 CONCLUSÃO.....	122
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	125

REFERÊNCIAS.....	126
ANEXO A – LEGENDAS PARA AS FIGURAS 3.8 E 3.9. DISPONÍVEL EM <https://portal.genego.com/legends/MetaCoreQuickReferenceGuide.pdf>.....	141

1 - INTRODUÇÃO

1.1 CAATINGA

O território brasileiro está dividido em seis biomas: Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Pampa, Pantanal e Caatinga. Este último é o único que é exclusivamente brasileiro. O nome Caatinga tem origem no tupi-guarani e significa algo como “mata branca” ou “mata esbranquiçada”. Este bioma tem área aproximada de 850.000 quilômetros quadrados, o que representa cerca de 10% do território nacional (Figura 1), estando presente em todos os estados da região Nordeste, além do norte do estado de Minas Gerais. O estado do Ceará é o único totalmente inserido na área de ocorrência deste bioma (LEAL; TABARELLI; SILVA, 2003; PRADO, 2003; BRASIL, 2004; MAIA, 2004; QUEIROZ, 2009; BRASIL, 2014).

O bioma Caatinga é fisionomicamente muito heterogêneo, mas sua vegetação predominante é composta por plantas com adaptações do tipo xerófilas (aptas a resistir à deficiência hídrica). Talvez por isso esse tipo de vegetação também seja denominada como caatinga. A presença de um tipo vegetacional homônimo gera alguma confusão no meio científico, porém, além da vegetação do tipo caatinga, o bioma Caatinga também apresenta a vegetação aquática presente em corpos d’água e alagados, as ilhas de Mata Atlântica em serras com mais de 700 m de altitude, além da vegetação característica de cerrados e campos rupestres. Por isso, costuma-se referir a essa área mais ampla, com ambientes compostos por diferentes tipos vegetacionais e climáticos como Domínio Caatinga. Há uma tendência recente de se denominar a vegetação predominante da Caatinga como Floresta Tropical Sazonalmente Seca (FTSS), ou *Seasonally Dry Tropical Forest* (SDTF), em inglês (GIULIETTI *et al.*, 2003; SAMPAIO, 2010; SANTOS *et al.*, 2011).

A população deste bioma é estimada em cerca de 27 milhões de pessoas, sendo que grande parte dessa população é carente e utiliza os recursos naturais da região diariamente em diversas atividades do dia-a-dia. As plantas da região são frequentemente utilizadas como combustível ou matéria-prima na construção de casas, cercas e fabricação de móveis, além de usos medicinais, enquanto que seu emprego na alimentação é menos comum (NASCIMENTO *et al.*, 2011; BRASIL, 2014). A extração de madeira para uso como combustível (lenha) merece atenção especial, pois a exploração é quase sempre feita de forma exploratória, não sustentável.

Essa exploração dos recursos naturais é uma das mais graves ameaças a esse ecossistema, juntamente com o desmatamento e prática de queimadas para a atividade agrícola. Dessa forma, cerca de 80% dos ecossistemas originais da Caatinga já foram alterados em algum grau. Ainda assim, o bioma ainda apresenta cerca de 50% de sua

cobertura vegetal nativa (LEAL *et al.*, 2003, MENEZES *et al.*, 2012; PAREYN *et al.*, 2012; BRASIL, 2014).

As FTSS são ambientes frequentemente reconhecidos como *hotspots* globais - ou áreas de elevada diversidade biológica - devido a níveis consideráveis de riqueza de espécies e de endemismo. Ao contrário do que se imaginava no passado, hoje é sabido que a Caatinga é um ecossistema muito rico em biodiversidade; na verdade, é o ambiente semiárido mais biodiverso do mundo. O bioma abriga cerca de 178 espécies de mamíferos, 591 de aves, 177 de répteis, 79 espécies de anfíbios, 241 de peixes e 221 abelhas. Dados recentes apontam para a existência de 932 espécies vegetais na Caatinga. A família Leguminosae está representada por 77 gêneros e 293 espécies com elevada taxa de endemismo. Apesar de sua riqueza e inegável importância, a Caatinga é também o ecossistema menos conhecido do Brasil, devido à carência de estudos e é também o mais negligenciado no sentido de conservação ambiental (SANTOS; ARAÚJO; ALBUQUERQUE, 2008; QUEIROZ; LAVIN, 2011; SANTOS *et al.*, 2011; BRASIL, 2014).

A riqueza natural da Caatinga, reconhecida apenas há poucas décadas, dá ao bioma um potencial grandioso de desenvolvimento, bastando para isso que se aprenda a utilizar seus recursos de maneira racional e sustentável. Esse potencial, caso seja bem explorado, poderá levar a região a um nível de desenvolvimento satisfatório. Dentre as atividades que podem contribuir com esse progresso estão as atividades econômicas voltadas para fins agrosilvopastoris e industriais, especialmente nos ramos farmacêutico, de cosméticos, químico e de alimentos (LEAL *et al.*, 2003, BRASIL, 2014).

Figura 1 - Biomas do Brasil



Fonte: IBGE (2004).

1.2 BIODIVERSIDADE E ALIMENTAÇÃO

A biodiversidade trata do grau de variação de formas de vida dentro de um determinado ecossistema e pode ser visto como um reflexo da integridade do ambiente (FAO, 2013). O Brasil é um dos centros de megabiodiversidade mundial e conta com a flora mais diversa do planeta, com mais de 55 mil espécies descritas (22% do total mundial). Dentre seus ecossistemas, os mais diversos são a Mata Atlântica, a Amazônia e o Cerrado, contudo o Pantanal, os Pampas e a Caatinga contribuem de forma significativa para a biodiversidade do país (SANTOS *et al.*, 2011; BRASIL, 2014).

Desde a década de 1980, a vulnerabilidade dos ambientes naturais e a iminente perda de biodiversidade se tornou um assunto preocupante não apenas para entidades ambientalistas não-governamentais, mas também para os governos e, principalmente, para a comunidade científica internacional. Neste contexto, foram criadas algumas iniciativas com participação internacional no intuito de estabelecer diretrizes para a proteção e conservação dos recursos biológicos. O Brasil é signatário de importantes acordos e convenções internacionais, sendo que dois deles têm relação mais direta com o bioma da Caatinga (BRASIL, 2014). Um deles é a Convenção de Diversidade Biológica (CDB), coordenada pelas Nações Unidas e assinada por 168 países (entre os anos de 1992 e 1993) entrou em vigor em 29 de dezembro de 1993. Este acordo representou um passo decisivo na conservação da diversidade biológica, no uso sustentável de seus componentes e na distribuição mais justa dos benefícios derivados do uso dos recursos genéticos (BRASIL, 2000, CBD, 2014). A observância desta convenção pode ajudar na conservação da Caatinga caso haja união de esforços por parte dos responsáveis pela implementação destas convenções no país, neste caso, da Secretaria de Biodiversidade e Florestas e a Secretaria de Extrativismo e Desenvolvimento Rural Sustentável, ambas sob responsabilidade do Ministério do Meio Ambiente (MMA), e seus parceiros nas esferas governamental e não-governamental.

No que diz respeito à Caatinga, as estratégias para a sua recuperação e conservação passam pela divulgação e encorajamento de práticas sustentáveis de exploração dos recursos naturais, pela educação ambiental e pelo incentivo à bioprospecção e pesquisa de seus recursos naturais, o que já começa a ser observado para produtos farmacológicos. A exploração de plantas típicas da Caatinga (frutos, raízes e sementes) como alimento, apesar de raro, ocorre em muitas regiões, especialmente longe dos grandes centros urbanos. No entanto, há poucos estudos a respeito, o que faz com que este consumo seja pontual. Além disso, o conhecimento tradicional está se perdendo tanto mais rápido quanto maior a participação dos

alimentos industrializados na alimentação das famílias (TABARELLI; SILVA, 2003; CRUZ; PERONI; ALBUQUERQUE, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Ao longo da história da humanidade, algo entre 40.000 e 100.000 espécies vegetais já foram utilizadas em algum momento como fonte de alimento, forragem, fibras, combustível, matéria-prima para artesanato, para fins industriais, culturais ou medicinais. Cerca de 3.000 espécies já foram utilizadas alguma vez como alimento humano. Pelo menos 7.000 espécies vegetais são utilizadas pelo homem atualmente, sendo que menos de 300 destas são cultivadas pelo homem. Desde o século XVI, fatores como o contato de civilizações humanas anteriormente isoladas entre si e o desenvolvimento de uma rede de comércio global levaram à redução do número de espécies consumidas como alimento. Apenas cerca de 30 espécies constituem hoje a base da agricultura mundial. Segundo Wittwer (1980 *apud* DESHPANDE, 1992) apenas 24 plantas separam o homem da fome, são elas: arroz, trigo, milho, batata, cevada, batata-doce, mandioca, soja, aveia, sorgo, milheto, cana-de-açúcar, beterraba, centeio, amendoim, favarola, grão de bico, feijão-guandu, feijão verde, feijão-caupi, fava, inhame, banana e coco. Este panorama fica ainda mais dramático se considerarmos que cerca de 60% da ingestão calórica total é tem como base arroz, trigo e milho (DESHPANDE, 1992; DINI; GARCÍA; VIÑA, 2012; IPGRI, 2012).

A perda de diversidade alimentar e a aculturação alimentar se traduzem em homogeneização das fontes de alimento ao redor do mundo, o que por si só é uma ameaça à segurança alimentar. No período de 48 anos, entre 1961 e 2009, culturas tradicionais como mandioca, sorgo e milheto tiveram participação cada vez menor no consumo de calorias pela população mundial. Essa redução gradual do consumo de espécies tradicionalmente utilizadas pode avançar até o ponto que elas não sejam mais consumidas. Por outro lado, soja, trigo e arroz estão entre as sementes que mais cresceram em importância para o suprimento calórico. Para suprir essa demanda, a produtividade precisa acompanhar o crescimento e isso vem sendo atingido principalmente com a modernização e globalização da agricultura e com o uso de genótipos altamente produtivos, obtidos através de seleção artificial. O uso desses cultivares cada vez mais padronizados geneticamente é o principal responsável pela perda de variabilidade genética, processo conhecido como erosão genética. Isso tem feito com que muitas espécies tenham sua importância tão reduzida a ponto de ficarem restritas ao consumo de subsistência, levando à perda permanente de cultivares selvagens e à extinção de várias espécies (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2009, DINI; GARCÍA; VIÑA, 2012; KHOURY *et al.*, 2014).

Desde o fim da década de 1980 a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) procura chamar a atenção global para a relação entre conservação ambiental / biodiversidade / alimentação. Este tema foi trazido à tona pela primeira vez no Dia Mundial da Alimentação de 1989. Com o tema ‘Alimentação e Meio Ambiente’, foi destacado que a crise ambiental representa uma ameaça à produção alimentar. Segundo a FAO divulgou naquele ano, nas florestas tropicais existem, pelo menos, 80 mil espécies de plantas comestíveis, sendo que nenhuma é cultivada. O Brasil, juntamente com Quênia, Sri Lanka e Turquia, participa do projeto "Conservação e Uso Sustentável da Biodiversidade para Melhoria da Nutrição e do Bem Estar Humano", coordenado pelo Biodiversity International, que visa, entre outros objetivos, a ampliação do número de espécies nativas utilizadas na alimentação (COELHO *et al.*, 2005; BRASIL, 2014).

A domesticação de plantas nativas, independente de já serem consumidas localmente, mas com pouca penetração no mercado nacional ou internacional, é uma grande oportunidade a ser explorada. Dietas que incluem espécies vegetais menos conhecidas ou subutilizadas costumam ser nutricionalmente mais ricas e mercados consumidores nacionais e internacionais estão ávidos por novas opções de produtos. Considerando isto, os recursos biológicos e genéticos do Brasil apresentam enorme potencial para satisfazer as demandas de mercado e gerar riquezas (GOLD; MCBURNEY, 2012; BRASIL, 2014). Muitas das espécies vegetais, sobretudo os grãos de leguminosas, presentes na Caatinga cearense têm composição que lhes candidatam à introdução na alimentação (alto conteúdo de proteínas, fibra alimentar, carboidratos, vitaminas e minerais), mas apesar disso são negligenciadas para este fim (CARVALHO *et al.*, 2011; CRUZ; PERONI; ALBUQUERQUE, 2013). Em meio a esse contexto, pode se destacar a espécie *Amburana cearensis*, uma leguminosa presente na Caatinga cearense cujo potencial farmacológico e madeireiro já vem sendo explorado de forma extrativista.

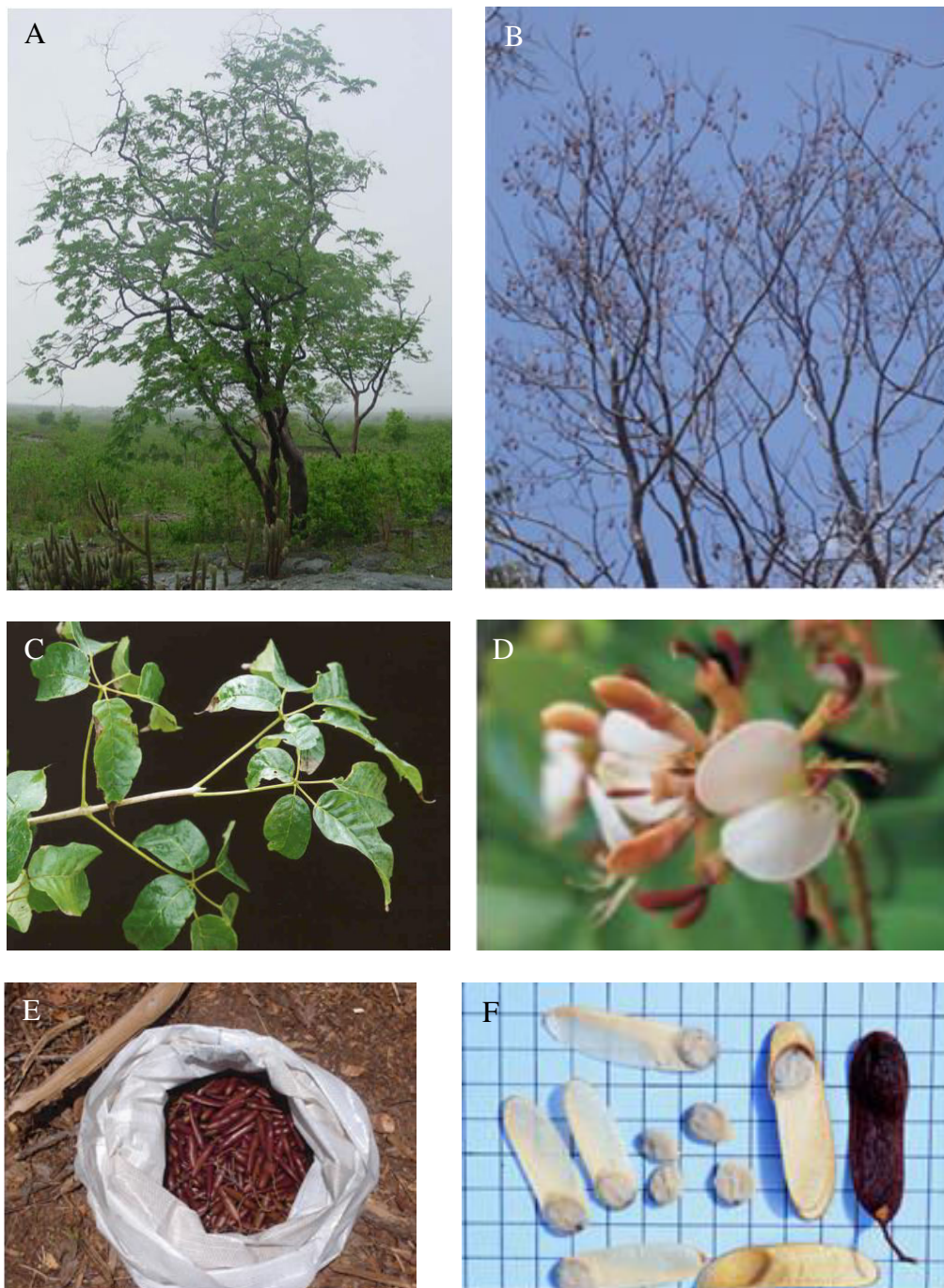
1.3 *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith

Amburana cearensis (Allemão) A. C. Smith, é uma leguminosa arbórea da subfamília Papilionoideae, frequente em áreas semi-áridas do Brasil, especialmente na região do domínio Caatinga e na floresta pluvial de Minas Gerais, no Vale do Rio Doce. É nativa do sertão nordestino brasileiro, mas pode ser encontrada em praticamente toda a América do Sul (do Peru à Argentina). Dependendo da região, é conhecida por diversos nomes populares como imburana-de-cheiro, umburana-de-cheiro, amburana, cerejeira, cumaru-do-Ceará ou apenas cumaru. Esta espécie lenhosa, quando adulta, pode atingir entre 15 e 20 m de altura, com folhas compostas e flores brancas. A vagem é achatada e de cor vermelho escuro, medindo entre 7 e 9 cm de comprimento, e contém geralmente apenas uma semente alada em seu interior. Na Caatinga, a floração se inicia ao término da quadra chuvosa, entre maio e julho, e os frutos estão presentes na estação seca, de agosto a outubro (Figura 2) (LORENZI; MATOS, 2002; LEITE, 2005; CANUTO *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2010; PAREYN *et al.*, 2012).

Por se tratar de uma espécie não domesticada, a exploração ocorre quase sempre de forma extrativista, o que a levou a figurar na lista de espécies ameaçadas de extinção (LEITE, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2010; PAREYN *et al.*, 2012). Canuto e colaboradores (2008) sugeriram o cultivo de plantas jovens exclusivamente produzidas para a extração dos princípios ativos farmacologicamente ativos como forma de poupar as plantas adultas do extrativismo.

A espécie é explorada para diversos usos (Figura 3). As sementes são utilizadas como aromatizante de roupas e fonte de compostos aromáticos para a perfumaria. As cascas e sementes dessa espécie são amplamente usadas na medicina popular, especialmente pelas atividades cicatrizante, anti-inflamatória, antiespasmódica, emenagoga, antidiarreica, para o tratamento de várias afecções no trato respiratório, como bronquite, asma, gripe e resfriado. O banho com cozimento das cascas é usado para tratar dores reumáticas. A madeira é usada com potencial lenhoso e forrageiro, mas também é valorizada na movelaria e carpintaria por ser resistente ao ataque de fungos e insetos, sendo muito utilizada para a confecção de portas e janelas (LORENZI; MATOS, 2002; MAIA, 2004; CANUTO *et al.*, 2008; FARIAS, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2010). Um uso não muito tradicional, mas que vem ganhando importância é a fabricação de tonéis com a madeira de cumaru para a maturação de cachaças (SOUZA *et al.*, 2014) e de cervejas (DREDGE, 2013).

Figura 2 - Planta adulta, folhas, flores, frutos e sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith. A) Planta adulta com a folhagem no período chuvoso; B) Planta adulta em frutificação, sem a folhagem, no período seco; C) Folhas; D) Flores; E) Frutos (vagens); F) Sementes aladas (secas)



FONTE: A e D) CANUTO *et al.*, 2008; B e E) Arquivo pessoal; C e F) PAREYN *et al.*, 2012.

Figura 3 - Usos de *Amburana cearensis* (Allemao) A. C. Smith. A) Sementes vendidas em loja de produtos naturais em São Paulo - SP. B) Rapé (sementes secas e moídas). C) Cascas secas vendidas em feira livre. D) Fitoterápico xarope de cumaru vendido em farmácias em Fortaleza - CE. E) Cerveja artesanal aromatizada em barris de madeira de cumaru em Pinhais - PR. F) Móveis feitos com madeira de cumaru à venda em loja do Reino Unido. G) Óleo aromático relaxante com óleo de cumaru na composição à venda na *internet*



FONTE: A) BJORGUM, 2009 (<http://saborsaudade.blogspot.com.br/2009/06/experimentos-com-amburana.html>); B) CALDAS, 2014 (<http://scienceblogs.com.br/podeimburana/oblog/>); C e D) CANUTO *et al.*, 2008; E) WAY BEER, 2014 (<http://www.waybeer.com.br/cerveja/amburana-lager/>); F) RIVERSIDE, 2014 (<http://www.riversidegardencentre.co.uk/bbq/alexander-rose-roble-garden-furniture-companion-set.html>); G) TUNUPA, 2014 (<http://tunupa.com.br/produto/ground>).

Várias partes da planta exalam forte cheiro característico, sobretudo as sementes. O aroma é devido à presença de cumarina, o fitoquímico mais característico do cumaru. O conhecimento fitoquímico de *A. cearensis* está mais concentrado no estudo dos constituintes químicos da casca do caule, em razão desta parte ser a mais utilizada na medicina popular. Alguns dos principais compostos presentes na espécie são cumarina, isocampferídio, amburo-sídio A e B, ácido vanílico, ácido *p*-hidroxi-benzoico, aiapina, ácido protocatecuico, 6-hidroxicumarina, ácido o-cumárico (LORENZI; MATOS, 2002; MAIA, 2004; CANUTO *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2010; CANUTO; SILVEIRA, 2010).

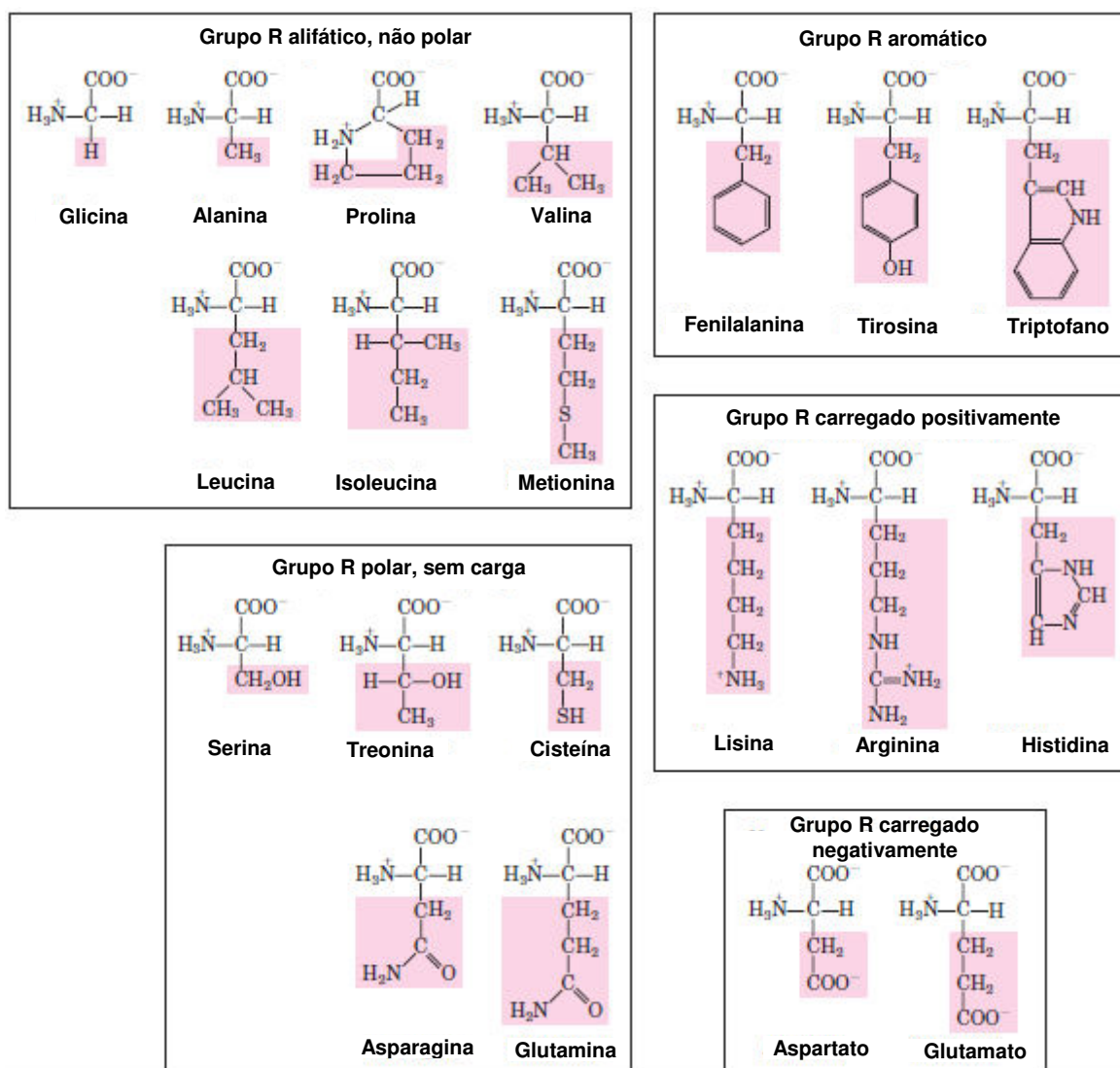
Não há na literatura referência do uso de *A. cearensis* na alimentação humana. Farias (2009) estudou o potencial nutricional das sementes de cumaru e de suas proteínas isoladas. As proteínas isoladas eram compostas majoritariamente por proteínas dos tipos albumina e globulina. O autor observou que os animais de experimentação (ratos machos em crescimento) aceitavam melhor as dietas contendo uma fração proteica de cumaru (obtida por precipitação em 0-90% de saturação com sulfato de amônio) do que a dieta que continha a farinha da semente. Assim, o autor concluiu que se trata de uma espécie com alta potencialidade para inclusão na dieta humana e que, portanto, merece ser estudada com mais profundidade.

1.4 PROTEÍNAS VEGETAIS

Proteínas são macromoléculas biológicas formadas pela ligação em cadeia de vários resíduos de aminoácidos, que são, por sua vez, moléculas de estrutura semifixa, composta por um átomo de carbono central unido a quatro ligantes: três fixos (um hidrogênio, um ácido carboxílico, uma amina) e um variável. É o ligante variável que dá a identidade do aminoácido. Um total de 20 aminoácidos existentes na natureza são normalmente incorporados em proteínas (Figura 4), sendo comumente chamados de aminoácidos proteicos. Aminoácidos ligados covalentemente em sequência são normalmente chamados de peptídeos e nomeados de acordo com o número de aminoácidos (mono-peptídeos, dipeptídeos, tripeptídeos etc.). A partir de 10 aminoácidos é chamado polipeptídeo e a partir de, aproximadamente, 100 resíduos de aminoácidos é considerado uma proteína, que pode se organizar em até quatro níveis estruturais. Os aminoácidos que compõem a cadeia se aproximam mais ou menos em ligações não covalentes com outros aminoácidos próximos, formando padrões estruturais dependentes desta mesma composição aminoacídica. Esta forma é a estrutura secundária. A estrutura terciária é a conformação tridimensional funcional de uma cadeia polipeptídica e se forma quando esta se dobra, permitindo a interação de aminoácidos afins, mas não vizinhos. Uma proteína que, na sua forma nativa, seja composta por dois ou mais peptídeos no estado terciário é uma proteína de estrutura quaternária (LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998; NELSON; COX, 2004; PHILLIPS; WILLIAMS, 2011).

As proteínas são encontradas em todas as células do organismo, sendo assim componentes essenciais da dieta humana, devendo estar presente diariamente na alimentação. No entanto, a simples presença de proteínas não garante uma nutrição adequada, pois um fator determinante é a qualidade proteica. Isto se refere ao fato de que para poder ser aproveitada pelo organismo no anabolismo de proteínas próprias, as proteínas consumidas devem conter quantidades adequadas dos diferentes aminoácidos (FRIEDMAN, 1996; LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998; FCN, 2011; PHILLIPS; WILLIAMS, 2011). Dos vinte aminoácidos, nove são considerados essenciais ou indispensáveis, uma vez que não temos a capacidade de sintetizá-los e devemos, obrigatoriamente, obtê-los da dieta; são eles: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Outros seis (alanina, ácido aspártico ou aspartato, asparagina, ácido glutâmico ou glutamato, glicina e prolina) são dispensáveis ou não essenciais, pois nosso organismo é capaz de sintetizá-los em quantidades adequadas a partir de intermediários metabólicos por desaminação. Os cinco aminoácidos restantes (arginina, cistina, glutamina, serina, e tirosina) não são sintetizados em quantidades

Figura 4 - Os 20 aminoácidos proteicos. Estruturas predominantes em pH 7,0. A porção sombreada representa o ligante variável, ou –R



FONTE: Adaptado de NELSON; COX, 2004.

satisfatórias apenas sob algumas situações (p. ex. na fase de crescimento ou em situações de estresse). O aminoácido essencial cujo teor em uma fonte proteica esteja mais distante dos requerimentos nutricionais é denominado aminoácido limitante (FCN, 2011).

Alimentos de diversas origens podem ser fonte de proteínas; entre as mais comuns estão as proteínas: (i) animais (carne, aves, peixes, sangue, leite, ovos, insetos); (ii) vegetais (cereais: trigo, arroz, milho, aveia; leguminosas: feijão, soja, ervilha, amendoim, grão-de-bico, lentilha; tubérculos: batata, inhame; sementes oleaginosas: colza, girassol, algodão); (iii) algais (spirulina, nori, alface do mar) e (iv) fúngicas (champignon, trufas, maatsutake, shiitake, cantarelo). O percentual de proteínas nos alimentos é muito variável, assim, a quantidade a ser consumida para atingir os requerimentos nutricionais também é. No entanto, mais importante do que o consumo total de proteínas é o balanço entre os diferentes aminoácidos, além do que a quantidade relativa de aminoácidos indispensáveis e dispensáveis depende da fonte da proteína. Por exemplo, o milho é deficiente em triptofano, o arroz e outros cereais em lisina, enquanto que a metionina é o aminoácido limitante em grãos de soja, feijão e outras leguminosas. Quanto maior a proporção de aminoácidos indispensáveis, maior o valor biológico ou a qualidade da proteína. Este parâmetro pode ser reduzido mesmo quando a proteína é deficiente em apenas um aminoácido indispensável específico. Proteínas que atendem aos requerimentos nutricionais para todos os aminoácidos são também chamadas proteínas completas; as proteínas de origem animal são exemplos típicos de proteínas completas. Opostamente, as proteínas vegetais são normalmente incompletas. No entanto, é possível atingir valores satisfatórios de ingestão de todos os aminoácidos ao combinar duas proteínas incompletas com diferentes aminoácidos limitantes na mesma refeição. Por isso, combinações do tipo cereal-leguminosa, como é o caso do feijão com arroz tão popular no Brasil, garantem uma ingestão proteica balanceada (DESHPANDE, 1992; FRIEDMAN, 1996; DURANTI; GIUS, 1997; LAJOLO; TIRAPEGUI, 1998; THARANATHAN; MAHADEVAMMA, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2011; FCN, 2011; PHILLIPS; WILLIAMS, 2011; DAY, 2013; GARBA; KAUR, 2014).

As leguminosas são uma importante fonte de proteínas alimentares no mundo todo, especialmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, por serem economicamente mais acessíveis do que as proteínas de origem animal. Este fato, inclusive, fez com que fossem por muito tempo conhecidas como ‘carne de pobre’ (DURANTI; GIUS, 1997; THARANATHAN; MAHADEVAMMA, 2003). Entretanto, esta visão está desgastada, já que ultimamente o consumo de vegetais é cada vez mais estimulado. Vários motivos

justificam esta tendência, entre eles: (i) o crescimento da população mundial tem aumentado a demanda por alimentos muito rapidamente; (ii) a produção animal é muito ineficiente, p. ex. 6 kg de proteína vegetal são convertidos em apenas 1 kg de proteína animal; (iii) atualmente, a maioria das terras agriculturáveis é utilizada para a produção animal, pois além das terras utilizadas para a criação, há ainda grandes extensões onde crescem plantas para alimentar os animais e (iv) a produção de 1 kg de carne bovina consome 1.000 vezes mais água fresca do que de 1 kg de cereal (KAUR; SINGH, 2007; GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009; AIKING, 2011; VAN DER SPIEGEL; NOORDAM; VAN DER FELS-KLERX, 2013).

Não bastasse isso, os benefícios do consumo de proteínas vegetais para a saúde humana vão além da satisfação dos requerimentos nutricionais. Certos aminoácidos, peptídeos e proteínas têm ação antioxidante no organismo através da combinação de diferentes mecanismos, como a habilidade de inativar espécies reativas de oxigênio (EROs), capturar radicais livres, quelar metais pró-oxidativos, reduzir hidroperoxidasas, eliminar enzimaticamente oxidantes específicos e alterar propriedades físicas dos alimentos de forma a separar espécies reativas (ELIAS; KELLERBY; DECKER, 2008). Essa multiplicidade de mecanismos de ação diferencia as proteínas dos compostos secundários, apesar de Aydemir e Yemenicioglu (2013a) terem mostrado que parte da ação antioxidante das proteínas é indireta, podendo ser atribuída à presença de compostos fenólicos ligados em sua superfície.

Proteínas vegetais, especificamente de leguminosas, são frequentemente relatadas como nutracêuticos, que são alimentos que além de fornecer nutrientes, trazem ainda benefícios à saúde, prevenindo ou tratando diversas doenças. Apesar de ser sabido que os efeitos positivos do consumo de sementes integrais são atribuídos não apenas às proteínas, mas à sua rica composição (fibra alimentar, carboidratos com baixo índice glicêmico, lipídeos, compostos fenólicos e outros compostos secundários), vários efeitos já foram demonstrados também para proteínas individuais e para conjuntos de proteínas. As proteínas podem desempenhar papéis bioativos por si próprios e/ou serem os precursores de peptídeos biologicamente ativos com diferentes funções fisiológicas. O consumo regular de proteínas de leguminosas está associado à redução dos níveis séricos de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), colesterol e glicemia. Por isso, seu consumo já foi associado à redução do risco de doenças como câncer de cólon, hipertensão, diabetes, obesidade, dislipidemias e aterosclerose. Sua ação imunomoduladora também pode estar relacionada à uma menor incidência de doenças autoimunes (PHILLIPS *et al.*, 2003; BADGER *et al.*, 2005; DURANTI, 2006; SCARAFONI; MAGNI; DURANTI, 2007; FROTA *et al.*, 2008;

MENDONÇA *et al.*, 2009; SIRTORI *et al.*, 2009; BISWAS; DHAR; GHOSH, 2010; RABETAFIKA *et al.*, 2011; BÄHR *et al.*, 2013; GEBRELIBANOS *et al.*, 2013; SINGHAL; KAUSHIK; MATHUR, 2014).

1.5 ISOLADOS PROTEICOS

Nas últimas décadas, a demanda pelo consumo de proteínas vegetais vem aumentando, seja por questões de saúde (redução do consumo de colesterol, controle de dislipidemias e outras patologias), por receio de doenças transmitidas pelo consumo da carne (como os casos de Encefalopatia Espongiforme Bovina, ou ‘vaca-louca’, nas décadas de 1980 e 1990), pelo seu baixo custo (muito mais barata que proteínas animais), por restrições religiosas (certas religiões limitam ou proíbem o consumo de carnes de diferentes animais, p. ex. hinduísmo, budismo, islamismo), por preferências alimentares ou ideológicas (vegetarianismo) ou por motivos ecológicos e de sustentabilidade. Nesse contexto, as proteínas de origem vegetal se mostram muito tentadoras como uma opção que iria ao encontro de todos os problemas apontados. As sementes de cereais e de leguminosas são as partes vegetais de maior teor proteico, variando entre 7-13% e 17-40%, respectivamente, sendo assim as mais utilizadas para o fim de obtenção de (DESHPANDE; CHERYAN, 1984; CHEL-GUERRERO *et al.*, 2002; MOURE *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009; ASGAR *et al.*, 2010; AYDEMIR; YEMENICIOĞLU, 2013b; GARBA; KAUR, 2014).

Uma maneira cada vez mais popular de consumir proteínas vegetais é na forma de concentrados e isolados proteicos, uma vez que soluciona ou ameniza alguns problemas encontrados no consumo das sementes integrais, como odor e sabor desagradáveis e presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais (DESHPANDE; CHERYAN, 1984; BOYE; ZARE; PLETCH, 2010). A diferença entre esses dois topos de produtos proteicos (concentrados e isolados proteicos) ainda não está bem estabelecida, mas as classificações geralmente se referem ao teor proteico e à forma de obtenção. Um concentrado proteico é o material restante após a eliminação do máximo de compostos não proteicos possível, como lipídeos, carboidratos e fibras da farinha da semente. O produto final deve conter entre 70-90% de proteínas. Já um isolado proteico é obtido pela extração das proteínas diretamente da matéria bruta inicial e resulta em um pó contendo mais que 90% de proteínas (ALIBHAI *et al.*, 2006; SMITH; CIRCLE, 1972 *apud* CARVALHO *et al.*, 2009).

Isolados proteicos são a forma mais pura que se pode obter de proteínas vegetais. A composição do produto final pode variar amplamente, dependendo da espécie utilizada e da forma de obtenção. Em linhas gerais, o processo passa pelas seguintes etapas: (i) trituração para obtenção de uma farinha fina. Quanto menor a granulometria, mais facilmente as proteínas serão extraídas; (ii) extração das proteínas. Esta etapa é determinante para o rendimento proteico do produto final e pode ser realizada por duas abordagens principais: em

meio líquido (extração com água, ácido, álcali, solução salina) ou em meio seco (classificação pelo ar). A extração com solução alcalina (geralmente em pH variando de 8 a 10), contendo ou não sais adicionados, é a forma mais comum de obtenção de isolados proteicos de leguminosas; (iii) separação das proteínas do restante do material em solução. Durante a extração, nada impede que moléculas de natureza não proteica sejam igualmente solubilizadas, sendo necessária a recuperação das proteínas, o que torna este passo também determinante para a qualidade do produto final. Esta etapa é também a que tem a maior possibilidade de ser realizada de diferentes maneiras. As mais comuns são as baseadas na perda de solubilidade das proteínas, como precipitação isoeletrica (geralmente com redução do pH para o seu ponto isoeletrico, que para proteínas de sementes de leguminosas fica entre 3 e 5) e saturação de sulfato de amônio. O método de ultrafiltração vem merecendo muito destaque, pois origina um produto com maior grau de pureza e mais solúvel e (iv) secagem do material para obtenção do produto final. A técnica mais utilizada nesta etapa em laboratórios é a liofilização, no entanto, para a produção comercial de isolados proteicos, a secagem por aspersão (*spray-dry*) é a mais frequente. Esta técnica traz as vantagens de redução de tempo, energia e aumento da solubilidade do isolado proteico quando comparado à liofilização (ALIBHAI *et al.*, 2006; BOYE; ZARE; PLETCH, 2010; MUNE *et al.*, 2011; GARBA; KAUR, 2014).

Já existem relatos de isolados proteicos preparados a partir de várias espécies vegetais, desde aquelas já consumidas como alimento pelo homem até espécies ditas selvagens ou subutilizadas. Dentre os preparados de plantas já consumidas, a soja é sem dúvida a mais difundida e seu isolado proteico já é utilizado há décadas tanto como aditivo pela indústria alimentícia quanto como complemento alimentar vendido diretamente ao consumidor final. Os Quadro 1 e 2 lista outras espécies cujas sementes já serviram como matéria-prima para a fabricação de isolados proteicos. No primeiro (Quadro 1), são apresentadas sementes que já são bem estabelecidas como alimento humano enquanto que o segundo (Quadro 2) relaciona espécies selvagens (não domesticadas ou cultivadas), subutilizadas ou negligenciadas [(i) consumidas apenas por determinadas populações humanas; (ii) utilizadas como forragem animal; (iii) utilizadas para fins não alimentícios; (iv) descartadas após extração da polpa ou obtenção de óleo e (v) apenas outras partes da planta são aproveitadas].

Quadro 1 - Espécies vegetais cujas sementes já foram relatadas como fonte de isolados proteicos. Espécies tradicionalmente já consumidas

NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	FAMÍLIA BOTÂNICA	FONTES
Soja	<i>Glycine max</i>	Fb	FERNÁNDEZ-QUINTELA <i>et al.</i> , 1997; HENN; NETTO, 1998; L'HOCINE; BOYE; ARCAND, 2006
Feijão comum	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fb	MORALES-DE LEÓN <i>et al.</i> , 2007; RUI <i>et al.</i> , 2011; TAN; NGOH; GAN, 2014
Feijão caupi ou feijão-de-corda	<i>Vigna unguiculata</i>	Fb	HORAX <i>et al.</i> , 2004; RANGEL <i>et al.</i> , 2004; FROTA <i>et al.</i> , 2008; MEDEIROS, 2013
Feijão-da-China ou feijão-mungo	<i>Vigna radiata</i>	Fb	AKAERUE; ONWUKA, 2010; LI <i>et al.</i> , 2010
Grão-de-bico	<i>Cicer arietinum</i>	Fb	KAUR; SINGH, 2007; SINGH <i>et al.</i> , 2008a; ZHANGA <i>et al.</i> , 2009
Ervilha	<i>Pisum sativum</i>	Fb	FERNÁNDEZ-QUINTELA <i>et al.</i> , 1997; ADEBIYI; ALUKO, 2011
Amendoim	<i>Arachis hypogaea</i>	Fb	WUA <i>et al.</i> , 2009; HE <i>et al.</i> , 2014
Fava	<i>Vicia faba</i>	Fb	FERNÁNDEZ-QUINTELA <i>et al.</i> , 1997
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	Pa	WANG <i>et al.</i> , 1999
Gergelim	<i>Sesamum indicum</i>	Pd	BANDYOPADHYAY; GHOSH, 2002; BISWAS; DHAR; GHOSH, 2010

FONTE: Elaborado pelo autor;

Fb: Fabaceae; Pa: Poaceae; Pd: Pedaliaceae.

Quadro 2 - Espécies vegetais cujas sementes já foram relatadas como fonte de isolados proteicos. Espécies selvagens, negligenciadas ou subutilizadas

NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	FAMÍLIA BOTÂNICA	FONTES
Cumaru, Imburana	<i>Amburana</i> <i>cearensis</i>	Fb	FARIAS, 2009
Feijão-de-porco	<i>Canavalia</i> <i>ensiformis</i>	Fb	CHEL-GUERRERO <i>et al.</i> , 2002
Feijão-de-lima	<i>Phaseolus lunatus</i>	Fb	CHEL-GUERRERO <i>et al.</i> , 2002
Tremoço	<i>Lupinus albus</i> , <i>Lupinus sp.</i>	Fb	PORRAS-SAAVEDRA <i>et al.</i> , 2013
Eritrina-verde-amarela	<i>Erythrina variegata</i>	Fb	SAMANTA; LASKAR, 2010
Mucuna ou feijão-da-Flórida	<i>Mucuna pruriens</i>	Fb	ADEBOWALE, 2008; MUGENDI <i>et al.</i> , 2010
Lablab	<i>Lablab. purpureus</i>	Fb	SUBAGIO; MORITA, 2008
Cezirão-das-torres	<i>Lathyrus clymenum</i>	Fb	PASTOR-CAVADA <i>et al.</i> , 2010
Agrião-roxo	<i>Lathyrus annuus</i>	Fb	PASTOR-CAVADA <i>et al.</i> , 2010
Colza	<i>Brassica napus</i>	Bs	YOSHIE-STARK; WADA; WÄSCHE, 2008
Cupuaçu	<i>Theobroma</i> <i>grandiflorum</i>	Mv	CARVALHO <i>et al.</i> , 2009
Ginkgo biloba	<i>Ginkgo biloba</i>	Gk	DENG <i>et al.</i> , 2011
Saponária	<i>Sapindus mukorossi</i>	Sp	YIN <i>et al.</i> , 2011
Melão-de-São-Caetano	<i>Momordica</i> <i>charantia</i>	Cc	HORAX <i>et al.</i> , 2011
Bayberry*	<i>Myrica rubra</i>	Mr	CHENG <i>et al.</i> , 2009
Gingerbread plum*	<i>Neocarya</i> <i>macrophylla</i>	Cb	AMZA <i>et al.</i> , 2011

FONTE: Elaborado pelo autor;

Fb: Fabaceae; Bs: Brassicaceae; Mv: Malvaceae; Mr: Myricaceae; Cb: Chrysobalanaceae; Gk: Ginkgoaceae; Sp: Sapindaceae; Cc: Cucurbitaceae;

*Nome comum na língua inglesa.

A produção de isolados proteicos vem ganhando destaque, pois além de sua aplicação no consumo direto, eles são também adicionados a formulações alimentícias para o enriquecimento proteico e para alterar características físicas, como sabor, cor, textura, cremosidade, viscosidade etc. Exemplos de alimentos que podem levar proteínas isoladas em sua composição são massas, bebidas, iogurtes, produtos cárneos, barras de cereais e sobremesas. Apesar da maioria das proteínas vegetais isoladas serem destinadas para a indústria alimentícia, outros ramos industriais também empregam isolados proteicos. Proteínas podem ser utilizadas na fabricação de produtos tão diversos quanto fibras, colas, adesivos, tintas, emulsificantes e até mesmo cosméticos (DE GRAAF, 2000; MOURE *et al.*, 2006; ADEBOWALE, 2008; SINGH *et al.*, 2008b; GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; MUGENDI *et al.*, 2010; SAMANTA; LASKAR, 2010).

Produtos derivados de soja são tradicionalmente consumidos na Ásia e hoje se encontram presentes em todo o mundo. Estima-se que pelo menos 60% dos alimentos processados contenha algum ingrediente derivado de soja. As proteínas da soja são de alta qualidade nutricional, contendo todos os aminoácidos indispensáveis e muito frequentemente são encontradas na forma de produtos proteicos (farinha, concentrado e isolado de soja). Com teor proteico acima de 90%, o isolado proteico de soja oferece vantagens nutricionais, funcionais e econômicas em relação a outras proteínas vegetais, mantendo assim a liderança nesse mercado. (APO, 2000; LIU *et al.*, 2008; ASGAR *et al.*, 2010; LIANG; TANG, 2013).

Frente a essa tendência de que a alimentação humana dependa de um número cada vez menor de espécies, a inclusão de novos alimentos ao leque de possibilidades é sempre bem vinda (KHOURY *et al.*, 2014). No entanto, não é raro que sementes selvagens, subutilizadas ou negligenciadas venham a enfrentar dificuldades de aceitação. Uma forma de contornar problemas dessa natureza seria o preparo de isolados proteicos a partir dessas sementes, já que a apresentação não seria muito diferente do que o consumidor já está habituado; na forma de pó bem semelhante a outros isolados proteicos já consumidos, como o de soja ou do soro de leite, ou incluído como ingrediente na fabricação de alimentos industrializados.

1.6 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE PROTEÍNAS EM ALIMENTOS

Alimentos preparados utilizando novos compostos ou fontes de proteínas, como concentrados e isolados proteicos, precisam apresentar propriedades comparáveis aos já existentes para se estabelecer no mercado. Por isso, a caracterização das propriedades de proteínas oriundas de novas fontes, como é o caso de sementes de leguminosas subutilizadas, é necessária para fundamentar os estudos básicos e aplicados sobre mesmas (NEVES; LOURENÇO, 1998).

As propriedades funcionais dos isolados proteicos são características que devem ser investigadas fundamentalmente, pois delas dependem o comportamento físico do alimento durante o preparo, o processamento e a estocagem. Mesmo em quantidade muito pequena, como 1 ou 2%, já é possível observar a alteração causada pela adição de proteínas. Várias características sensoriais dos alimentos também dependem das propriedades funcionais, p. ex. sabor, textura, consistência e viscosidade. As propriedades funcionais clássicas de proteínas são definidas por Foegeding e Davis (2011) como a habilidade de formar e/ou estabilizar teias (géis e filmes), espuma, emulsão e solução coloidal (sol). Ultimamente tem crescido o interesse no estudo das propriedades funcionais de proteínas vegetais com potencial de aproveitamento em diversos ramos da indústria (CHEL-GUERRERO *et al.*, 2002; KAUR; SINGH, 2007; CHENG *et al.*, 2009; ASGAR *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010; SAMANTA; LASKAR, 2010; ADEBIYI; ALUKO, 2011; AMZA *et al.*, 2011; GARBA; KAUR, 2014).

1.6.1 Solubilidade

A solubilidade é a propriedade funcional mais importante das proteínas, visto que influencia muitas outras, especialmente espumabilidade, emulsibilidade e geleificação. É uma propriedade primária e de crucial importância, por isso costuma ser a primeira a ser avaliada (MORR, 1990; PELEGRINE; GASPARETTO, 2005; FOEGEDING; DAVIS, 2011; SHAN *et al.*, 2012; GARBA; KAUR, 2014).

Um fator que pode interferir bastante na solubilidade de uma proteína é sua condição tridimensional. As proteínas são comumente conhecidas nos seus estados nativo e desnaturado, no entanto, há um estado intermediário, quando a estrutura tridimensional começa a se desdobrar. As propriedades funcionais das proteínas são muito mais dependentes desse estado de transição de nativo para intermediário do que da forma nativa em si. Assim, fatores que provocam a desnaturação proteica também influenciam a solubilidade de proteínas. Alguns desses fatores são a variação do pH, de temperatura, presença de sais etc. A

desnaturação proteica pode tornar as proteínas mais ou menos solúveis, a depender do grau em que ocorra. Se por um lado é sabido que a perda de solubilidade é uma das consequências da completa desnaturação proteica, por outro, o estado de subdesnaturação (desnaturação parcial) pode favorecer interação da proteína com o solvente, uma vez que afrouxa a estrutura da proteína.

No processo de desnaturação completa, as porções hidrofóbicas da cadeia que anteriormente se encontravam no interior da molécula são expostas. Esses grupos hidrofóbicos interagem entre si, formando agregados proteicos que coagulam e precipitam. As proteínas costumam se apresentar mais solúveis em extremos de pH e em temperaturas entre 40 e 50 °C e o menor grau de solubilidade pode ser observado no ponto isoelétrico (pH no qual a carga líquida total da proteína é nula) e sob temperaturas muito elevadas. Em temperaturas acima de 50 °C, as interações não covalentes que estabilizam as estruturas secundária e terciária dos polipeptídeos começam a se desfazer, o que aumenta a hidrofobicidade superficial da proteína. Diferente do que ocorre na insolubilidade causada por alteração do pH, a provocada por elevação da temperatura é geralmente irreversível (MORR, 1990; RAGAB; BABIKER; ELTINAY, 2004; PELEGRINE; GASPARETTO, 2005; MOURE *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2008; PAPALAMPROU *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010; FOEGEDING; DAVIS, 2011; SHAN *et al.*, 2012; GARBA; KAUR, 2014). A presença de cloreto de sódio (NaCl) em diferentes concentrações também pode alterar a solubilidade de um isolado proteico, como mostrado por Ragab, Babiker e Eltinay (2004) e Yuliana e colaboradores (2014).

1.6.2 Capacidade de retenção de água e de óleo

A capacidade de retenção de água diz respeito à capacidade da proteína reter água contra a gravidade. A quantidade de água retida pode variar dependendo da carga elétrica dos resíduos de aminoácidos, da conformação da proteína, da hidrofobicidade, do pH, da temperatura, da força iônica e da concentração proteica (MOURE *et al.*, 2006). A natureza anfifílica (quando a mesma molécula tem a capacidade de interagir com compostos polares e apolares) das proteínas explica muitas das suas propriedades funcionais, já que permite que elas interajam tanto com água quanto com óleo quando presentes como ingrediente em um alimento.

Teoricamente, as proteínas que têm maior razão de aminoácidos polares:apolares na superfície mostram maior capacidade de hidratação, o que se reflete em maior capacidade

de retenção (ou absorção) de água. Já as proteínas com maior razão de aminoácidos apolares:polares são melhores retentoras de óleo (FOEGEDING; DAVIS, 2011; GARBA; KAUR, 2014). No entanto, o conhecimento da composição aminoacídica de uma proteína (ou grupo de proteínas) não é o bastante para predizer se ela será melhor retentora de água ou óleo, pois no estado intermediário (parcialmente desnaturada) a proteína não se encontra como uma cadeia linear. Essa predição só seria possível se fosse conhecida a forma tridimensional da proteína semidesnaturada e quais aminoácidos estão expostos na superfície nessa condição. A propriedade de retenção de água é importante na formulação de alimentos como salsichas, queijos e pudins, enquanto que a de retenção de óleo é aplicada na fabricação de substitutos de carnes (KINSELLA; MELACHOURIS, 1976).

1.6.3 Capacidade emulsificante

Uma emulsão é um sistema de duas fases que se encontram mais ou menos dispersas entre si. As proteínas formam emulsões, graças ao seu caráter anfifílico, ao envolver o componente (água ou óleo) que estiver em menor quantidade na mistura. A capacidade de formar emulsões é uma propriedade intimamente ligada à composição aminoacídica e à proporção entre aminoácidos polares:apolares na superfície da proteína. (YASUMATSU *et al.*, 1972, LAM; NICKERSON, 2013).

A eficiência das proteínas em formar e estabilizar emulsões pode ser influenciada não só por sua estrutura, mas também pelo pH e pela presença de sais, como NaCl. Algum grau de desnaturação também pode favorecer a formação de emulsões, pois aumenta a hidrofobicidade da superfície proteica e promove a interação com a fase oleosa. Outro fator que também pode afetar a estabilidade da emulsão formada é a solubilidade do nitrogênio. A formação de emulsões é empregada na fabricação de produtos cárneos, sorvetes e produtos de panificação (YASUMATSU *et al.*, 1972; MOURE *et al.*, 2006; LIANG; TANG, 2013).

1.6.4 Capacidade espumante

Espuma é definida como uma dispersão de ar, na forma de bolhas, em líquido ou sólido. As proteínas atuam na interface entre o ar e o líquido ou sólido. A capacidade espumante é influenciada pela adsorção do agente de formação de espuma na interface ar-água e a sua capacidade para reduzir rapidamente a tensão superficial. A formação de um filme visco-elástico atua na estabilização da espuma. A espuma em um alimento reduz sua

densidade, modifica sua textura, aparência, sensação na boca e até o tempo de prateleira (FOEGEDING; DAVIS, 2011; GERMAIN; AGUILERA, 2014).

A formação de espuma pode ser influenciada pela presença de diferentes substâncias, como o ácido ascórbico que aumenta a espumabilidade por induzir a formação da ligação proteína-proteína e o etanol que a reduz pela quebra dessas ligações. A hidrólise parcial da proteína pode promover aumento na expansão da espuma. A proteína precisa estar bem dispersa no meio para poder formar espuma satisfatoriamente, mas para manter essa espuma estável por mais tempo, certo grau de desnaturação (subdesnaturação) é um aspecto mais importante. Exemplos de alimentos que empregam a funcionalidade de espumabilidade são produtos cárneos, merengues, coberturas, chocolate aerado, bolos, mousses, sorvetes e produtos de panificação (YASUMATSU *et al.*, 1972; NARSIMHAN, 1996; MARTÍNEZ, 2009; FOEGEDING; DAVIS, 2011; GERMAIN; AGUILERA, 2014).

1.6.5 Capacidade geleificante

Um gel pode ser considerado como um estado intermediário entre o líquido e o sólido. A geleificação (ou gelificação) é a conversão de um fluido em um semissólido pela formação de uma rede tridimensional macromolecular. Essa matriz pode se formar através de ligações entre as proteínas do tipo covalente, não covalente ou um misto das duas. A formação de gel é afetada por fatores intrínsecos (interações eletrostáticas, pontes de sulfeto, massa molecular, composição de aminoácidos, hidrofobicidade) e extrínsecos (concentração proteica, pH, temperatura, força iônica, tipo de sal, pressão) (TOTOSAUS *et al.*, 2002; MOURE *et al.*, 2006; FOEGEDING; DAVIS, 2011).

A geleificação proteica é um processo que se dá em duas etapas principais: (i) desnaturação proteica e (ii) agregação proteica. Proteínas globulares, quando aquecidas, sofrem desnaturação e a estrutura da molécula é desdobrada. Quando isto acontece, moléculas do solvente se posicionam irreversivelmente no espaço aberto no interior da molécula da proteína. Ao ser novamente resfriada, as moléculas proteicas formam tramas tridimensionais que caracterizam o estado de gel. Diferentemente, géis formados por proteínas fibrosas são termorreversíveis. A malha tridimensional formada no gel proteico é estabilizado pelo mesmo tipo de interações não covalentes que estabilizam a estrutura terciária da proteína (interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio ou interações eletrostáticas). Exemplos de alimentos que empregam a funcionalidade de geleificação são queijo, gelatina, tofu, iogurte (TOTOSAUS *et al.*, 2002; PAPALAMPROU *et al.*, 2009; FOEGEDING; DAVIS, 2011).

1.7 SEGURANÇA DE ALIMENTOS

Segurança alimentar é um termo que causa muita confusão no seu e isso se deve à falta de uma exata correspondência entre palavras de diferentes idiomas. Existem na língua inglesa dois termos de significados diferentes, porém interligados: *food security* e *food safety* que em alguns idiomas encontram somente uma forma de tradução. É o caso da língua portuguesa, na qual ambas as expressões foram inicialmente traduzidas como ‘segurança alimentar’ (NITZKE *et al.*, 2010; SIMON, 2012).

O termo *food security* começou a se desenvolver em meados da década de 1910, durante a primeira guerra mundial, quando a escassez de alimentos deixou, pela primeira vez, de ser um problema de cidades ou países e passou a ter importância mundial. Segundo a FAO, há segurança alimentar (no sentido de *food security*) quando todas as pessoas, em todos os momentos, têm acesso físico, social e econômico a alimentos suficientes, seguros e nutritivos, que satisfaçam suas necessidades nutricionais e preferências alimentares para uma vida ativa e saudável. No entanto, este tópico trata do outro significado possível, quando se refere à tradução de *food safety*. Nesta denotação, segurança alimentar indica que um alimento é seguro para o consumo, não oferecendo riscos relacionados à presença de componentes ou aditivos tóxicos, microrganismos e suas toxinas ou contaminantes de qualquer natureza (ANDRADE, 2004; BORÉM; SANTOS, 2008; TIBOLA; SANTI, 2008; NITZKE *et al.*, 2010; FAO, 1996 *apud* SIMON, 2012).

Apesar de ainda hoje o termo *food safety* ser traduzido como Segurança Alimentar, outros termos estão sendo utilizados. Dois termos normalmente encontrados na língua portuguesa são Biossegurança e Segurança de Alimentos. O primeiro deles, Biossegurança, começou a ganhar força no início da década de 1970, com o surgimento da engenharia genética, por isso está fortemente atrelado às modernas técnicas de biotecnologia, especialmente à tecnologia do DNA (sigla em inglês para Ácido Desoxirribonucleico) recombinante. Na década de 1980, biossegurança foi definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como práticas de prevenção a serem adotadas nos trabalhos com agentes patogênicos em laboratórios. Na década seguinte, os programas de biossegurança passaram a tratar também de temas como ética em pesquisa, meio ambiente, animais e processos envolvendo tecnologia de DNA recombinante. Quando tais tecnologias começaram a desenvolver Alimentos Geneticamente Modificados (AGM) ou quaisquer outros resíduos que potencialmente entrassem na cadeia alimentar, surgiu a preocupação de assegurar sua inocuidade à saúde humana. Neste momento o termo Biossegurança ganhou a variante

Biossegurança Alimentar (ANDRADE, 2004; GUIMARÃES *et al.*, 2007; BORÉM; SANTOS, 2008; NITZKE *et al.*, 2010; PENNA *et al.*, 2010; FARIAS, 2013). O segundo termo, Segurança de Alimentos, define o objetivo de assegurar a qualidade nos produtos comercializados, garantindo que estão isentos de contaminantes biológicos, físicos e químicos no momento do consumo (TIBOLA; SANTI, 2014). Alinhando-se a este conceito, o termo Segurança de Alimentos será utilizado neste trabalho como a garantia de que um alimento não ofereça risco à integridade ou à saúde do seu consumidor.

O número de relatos de estudos toxicológicos de proteínas vegetais continua em expansão na literatura científica, sendo eles divididos em duas áreas principais: (i) avaliação da segurança (de alimentos) de proteínas de plantas tradicionalmente consumidas, incluindo testes de toxicidade, ingestão diária máxima e porção diária adequada e (ii) avaliação da segurança (de alimentos) de novas fontes proteicas obtidas de plantas não convencionais (WU; SUN, 2012). Atualmente, devido a diversos fatores já discutidos (ver tópico 1.4), há uma grande preocupação em estabelecer fontes de proteínas alternativas à proteína animal, especialmente à carne bovina. Muito se tem avançado no sentido de elencar candidatos (plantas, algas, insetos), porém ainda pouco se sabe sobre a segurança do consumo dessas novas proteínas (VAN DER SPIEGEL; NOORDAM; VAN DER FELS-KLERX, 2013). Segundo Borchers e colaboradores (2010), um alimento nunca será completamente seguro, pois além das potenciais toxinas que ocorrem naturalmente em alimentos de diversas fontes, há ainda os aditivos químicos ou biológicos e os perigos decorrentes do processamento industrial ou caseiro. Analisar individualmente cada componente de todos os alimentos que consumimos é uma prática inviável, entre outros motivos, porque tornaria os alimentos caros demais para serem consumidos. Alguns aditivos são tolerados em uma quantidade máxima que garanta uma “certeza razoável de nenhum dano”, enquanto outros não são aceitos. Cada país tem uma agência encarregada de estabelecer que substâncias são toleradas e em que níveis, além de fiscalizar o cumprimento de tais medidas.

No Brasil a responsabilidade de regulamentar e fiscalizar a segurança de alimentos recai sobre a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dentre suas atribuições, está a exigência legal de comprovação pré-mercado da segurança de uso de determinados alimentos e ingredientes. Os produtos enquadrados nas categorias de novos alimentos ou novos ingredientes são alguns dos que devem atender esta exigência. Além disso, alguns alimentos, ingredientes ou modificações devem atender a regulamentos técnicos específicos, só sendo liberados para o mercado após comprovação prévia da sua segurança.

(BRASIL, 2013). Portanto, para que se possa fazer uma avaliação da segurança do isolado proteico de sementes de cumaru como um novo alimento, faz-se necessário primeiro conhecer como a agência define alimentos. De acordo com a ANVISA, alimentos e ingrediente são definidos como se segue:

“...todas as substâncias ou misturas de substâncias destinadas à ingestão por humanos, que tenham como objetivo fornecer nutrientes ou outras substâncias necessárias para a formação, manutenção e desenvolvimento normais do organismo, independente do seu grau de processamento e de sua forma de apresentação. Já os ingredientes são definidos como substâncias utilizadas no preparo ou na fabricação de alimentos, e que estão presentes no produto final em sua forma original ou modificada.” (BRASIL, 2013).

Como já mencionado anteriormente, não há histórico de consumo alimentar de sementes de cumaru no Brasil, portanto qualquer iniciativa no sentido de incluir suas sementes ou seus derivados (como é o caso de seu isolado proteico) na alimentação, deverá seguir a legislação determinada pela agência. Neste caso, o novo produto se alinha com o conceito de novo alimento:

Novos alimentos ou novos ingredientes são os alimentos ou substâncias sem histórico de consumo no País, ou alimentos com substâncias já consumidas, que, entretanto, venham a ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos utilizados na dieta regular (BRASIL, 2013, p. 3).

Assim, o isolado proteico de cumaru pode ser considerado um novo alimento, seja para consumo direto ou para uso como aditivo alimentar. Mais especificamente, é categorizado como produto proteico de origem vegetal, definido como se segue:

Produtos Protéicos [sic] de Origem Vegetal são os alimentos obtidos a partir de partes protéicas [sic] de espécie(s) vegetal(is), podendo ser apresentados em grânulo, pó, líquido, ou outras formas com exceção daquelas não convencionais para alimentos. Podem ser adicionados de outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto (BRASIL, 2005).

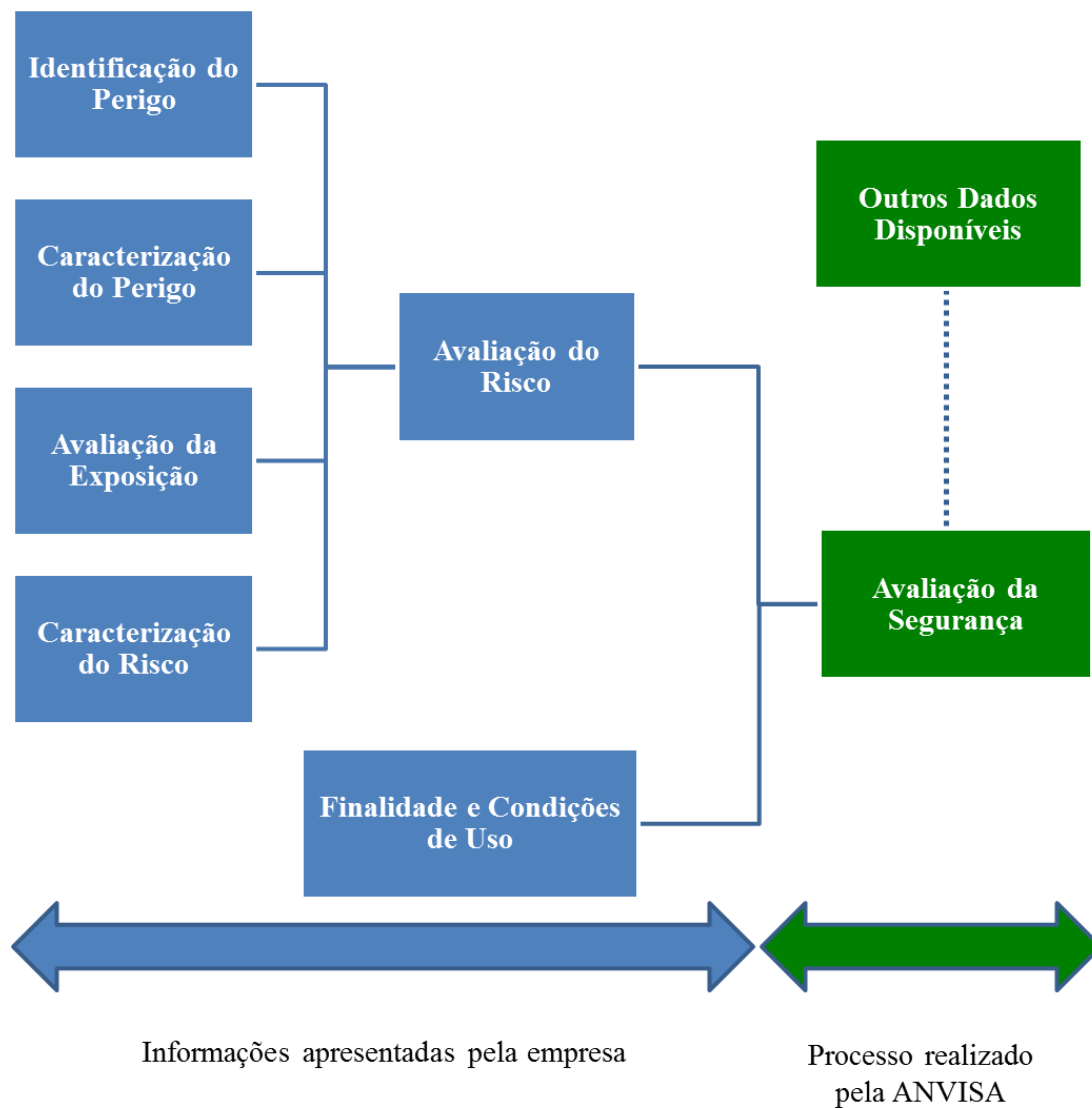
Desta forma, a comprovação de segurança do isolado proteico de cumaru deve atender a regulamento técnico específico para produtos proteicos de origem vegetal (BRASIL, 2005; BRASIL, 2013).

A aprovação de novos alimentos (e ingredientes) no Brasil segue legislação específica e a comprovação de sua segurança deve ser solicitada pela empresa proponente, seguindo critérios estabelecidos pela ANVISA e divulgados no Guia para Comprovação da

Segurança de Alimentos e Ingredientes (BRASIL, 2013). Dentre as informações que devem ser fornecidas estão a finalidade e as condições de uso do alimento ou ingrediente e sua respectiva avaliação do risco (Figura 5). Entretanto, um produto como a proteína isolada de cumaru (ou de qualquer outra planta selvagem, subutilizada ou negligenciada) não encontra nos documentos específicos citados acima uma correspondência exata dentre os produtos proteicos de origem vegetal listados. Nos referidos documentos, os dois produtos que mais se aproximam são (i) proteína isolada de soja, que deve conter no mínimo 88,0% de proteína em base seca e (ii) outros produtos proteicos, contendo 40,0% de proteínas em base seca, no mínimo. No primeiro caso, o fato de ser especificado que a proteína seja isolada de soja parece negar o imenso potencial que outras plantas têm de fornecer proteínas isoladas, enquanto que no segundo caso o baixo teor proteico mínimo exigido tem o efeito de subestimar todas as novas fontes de proteínas vegetais (BRASIL, 2005; BRASIL, 2013). Nesse sentido, a legislação europeia parece bem mais preparada para a entrada dessas novas proteínas no mercado de alimentação humana e animal nos próximos anos, pois proteínas isoladas de plantas não convencionais facilmente se identificam com um dos produtos descritos como novos alimentos: Alimentos ou ingredientes que consistem de plantas, ou porções delas isoladas, exceto aqueles obtidos por propagação ou melhoramento convencional ou que tenha histórico de uso seguro (VAN DER SPIEGEL; NOORDAM; VAN DER FELS-KLERX, 2013).

No entanto, como este trabalho trata de uma avaliação preliminar do isolado proteico de sementes de cumaru, não tem como objetivo seguir todos os passos requeridos pela ANVISA, mas sim avaliar preliminarmente se o método de obtenção é adequado e se há indícios de toxicidade que possam guiar o melhoramento deste protótipo até o desenvolvimento de um produto final.

Figura 5 - Etapas requeridas pela ANVISA para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes



FONTE: Adaptado de BRASIL, 2013.

1.8 TOXICOGENÔMICA

A toxicologia clássica se baseia na observação, geralmente *in vivo*, do efeito causado pela administração de drogas ou outros compostos que se queira testar. A avaliação da segurança de alimentos é uma das áreas que tradicionalmente faz uso desta ciência. Os testes são conduzidos majoritariamente em animais modelo, com destaque para ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*). Entre os testes mais utilizados para este fim estão os ensaios de toxicidade aguda, sub-crônica e crônica, estudos histopatológicos, de carcinogenicidade, teratogenicidade e genotoxicidade. Esta abordagem busca identificar quaisquer possíveis efeitos tóxicos, mas esbarra em dificuldades como a escolha da dose a ser testada e a extrapolação dos resultados para uma espécie diferente da que foi estudada. Para garantir a identificação do órgão afetado, é comum a escolha de doses muito superiores às que um humano jamais teria contato normalmente, uma vez que o efeito tóxico só será observado em tecidos ou órgãos se a exposição ao agente tiver certa intensidade e duração. Por diversas razões, a abordagem toxicológica clássica é hoje vista como sendo limitada, dentre as quais é possível destacar: (i) é realizada em espécies modelo, diferentes da qual se deseja a informação; (ii) é muito cara e demanda muito tempo; (iii) a extrapolação dos dados obtidos em animais para os humanos é muito difícil; (iv) não é adequada para análise de numerosas amostras; (v) sua capacidade de detecção de toxicidade é bastante limitada, podendo desvendar apenas um número restrito de modos de ação e (vi) há muitas questões éticas acerca do direito de uso de animais em pesquisa científica (SCHILTER *et al.*, 1996; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007a; NORTH; VULPE, 2010; WU; SUN, 2012; HALDER, 2013).

Atualmente, a demanda por testes toxicológicos está em contínua expansão, pois novos compostos sintéticos, novas drogas, compostos gerados pela nanotecnologia, novos alimentos etc. são criados a cada ano e precisam ser avaliados quanto à sua segurança. No entanto, frente às limitações da abordagem clássica e diante dos avanços da biologia e da biotecnologia, uma nova abordagem para testes toxicológicos vem ganhando cada vez mais força. Baseada em testes que fazem uso de células (preferencialmente humanas) cultivadas *in vitro*, os novos testes toxicológicos se apresentam como uma solução a várias das fragilidades da abordagem tradicional. Com ela é possível a avaliação de vários compostos em curto espaço de tempo, utilizando menos espaço, mão de obra e recursos financeiros. A utilização de tecido humano torna os resultados mais confiáveis, pois não há a necessidade de extrapolação interespecífica, além de poupar a vida de inúmeros animais, cujo uso fica

reduzido a poucos casos. O modo de ação também se torna mais fácil de investigar, pois com as novas técnicas baseadas em cultura de células as alterações são identificadas a nível molecular em estágios iniciais de perturbação do sistema (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007a; NORTH; VULPE, 2010).

Outro campo de pesquisa cujos avanços vêm contribuindo para o desenvolvimento da nova geração dos testes toxicológicos é a biologia molecular. Desde a descoberta da estrutura molecular do DNA, há pouco mais de 50 anos, se viu uma rápida ascensão no entendimento de seu funcionamento e na quantidade de aplicações para o que vinha sendo descoberto. O Projeto Genoma Humano teve por objetivo central desvendar a sequência contida nos cromossomos humanos e a partir do conhecimento gerado a Genômica começou a ganhar forma. Derivadas dela, outras ciências começaram a se desenvolver; coletivamente, tais ciências são denominadas –ômicas. Nos últimos 15 anos, a toxicogenômica vem sendo desenvolvida como uma técnica derivada deste conhecimento, que se propõe a auxiliar, e em muitos casos substituir, os ensaios clássicos de toxicidade. O termo toxicogenômica foi primeiro usado no ano de 1999 e desde então sua popularidade vem crescendo ano após ano. Pode-se confirmar isso buscando o termo em bases de dados de artigos científicos e correlacionando o número de artigos por ano desde aquela data (NUWAYSIR *et al.*, 1999; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007b; ARIAS; FREIRE, 2008; TONG; FANG; MENDRICK, 2009; HALDER, 2013; DADANNAGARI, 2014). Várias definições têm sido propostas para o termo toxicogenômica, não havendo ainda nenhuma que tenha se consolidado. De acordo com Dadannagari (2014), a toxicogenômica integra a genômica com a toxicologia clássica para estabelecer a relação entre a atividade do genoma e a resposta a agentes tóxicos exógenos, identificando um padrão de expressão gênica específico associado à exposição a um xenobiótico.

A toxicogenômica abrange coletivamente três instrumentos que se complementam: (i) a transcriptômica, trata da análise do transcriptoma (conjunto de todo o RNA transcrito a partir do DNA de uma célula, tecido ou organismo em um momento específico); (ii) a proteômica, que analisa o proteoma (as proteínas totais que foram expressas a partir do transcriptoma) e (iii) a metabolômica, que analisa o metaboloma (metabólitos de natureza diversa em um momento específico, geralmente moléculas de baixa massa molecular, < 1.500 Da). A transcriptômica aplicada à toxicogenômica busca identificar quais alterações a célula sofre, em termos de expressão gênica, quando entra em contato com um

composto exógeno, tóxico ou não (HAYES; BRADFIELD, 2005; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007b; NORTH; VULPE, 2010; HALDER, 2013).

A tecnologia de microarranjos é responsável por parte dos avanços na transcriptômica e faz uso das informações geradas pelo sequenciamento do genoma e de vários marcadores de sequência expressa (ESTs). Os microarranjos de DNA contêm sondas com sequências do genoma da espécie de interesse, no caso, da espécie humana. A última geração de microarranjos disponível comercialmente já contém o genoma humano completo, contando com mais de 30.000 genes, em um único chip. A análise transcriptômica se dá quando os RNAs obtidos (transcriptoma) são hibridizados ao microarranjo contendo sondas de DNA (DAVIES, 2010).

Uma das principais aplicações da toxicogenômica desde seu surgimento são os testes voltados para a indústria farmacêutica, uma vez que o estudo de toxicidade de novas drogas, da forma como é realizado atualmente, resulta em produtos efetivos a apenas uma parcela da população. Consequência disso é que a maioria das drogas aprovadas para administração e comercializadas atualmente acarreta efeitos adversos a muitos pacientes, isso porque os testes realizados não contemplam a grande diversidade genética entre diferentes populações e até mesmo dentro da mesma população. Acredita-se que no futuro será possível o desenvolvimento de drogas mais específicas, baseadas em pesquisas personalizadas (HAYES; BRADFIELD, 2005; TONG; FANG; MENDRICK, 2009; HALDER, 2013).

Entre as vantagens da toxicogenômica, pode-se destacar (i) a possibilidade de analisar quantidades enormes de dados simultaneamente, (ii) a especificidade, (iii) a sensibilidade e (iv) a rapidez, quando comparado aos métodos tradicionais. Além das vantagens técnicas, do ponto de vista moral a toxicogenômica também surge como uma valiosa alternativa aos testes com animais de laboratório, que vão contra princípios éticos que se procura solidificar na ciência (HAYES; BRADFIELD, 2005; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007a; TONG; FANG; MENDRICK, 2009; NORTH; VULPE, 2010).

A toxicogenômica se baseia em identificar vias e processos biológicos afetados pela exposição ao composto teste. No entanto, a análise deve ser realizada de forma cautelosa, pois uma alteração no nível de expressão de determinado gene não está obrigatoriamente relacionado à toxicidade, podendo significar apenas um mecanismo de autorregulação em busca de reestabelecer a homeostase. A capacidade preditiva desta técnica a faz adequada para a avaliação de risco de compostos recém-criados ou descobertos, assim como seu modo de ação. Tal predição se baseia na comparação do perfil de expressão gênica gerado pelo

composto em análise com o perfil gerado por drogas ou compostos previamente estudados e que tenham mecanismo de ação conhecido (assinatura de expressão). Esse tipo de abordagem comparativa define a toxicogenômica mecanística, que visa elucidar o modo de ação dos compostos e parte do princípio de que aqueles que promovem o mesmo padrão de expressão gênica têm o mesmo mecanismo de ação. Essa comparação é viabilizada pela manutenção de bancos de dados coletivos onde são depositadas as assinaturas de expressão de inúmeros compostos, os quais facilitam a comparação de resultados de pesquisas realizadas em diferentes laboratórios (WEBER, 2004; HAYES; BRADFIELD, 2005; TONG; FANG; MENDRICK, 2009; HALDER, 2013; DADANNAGARI, 2014).

Como toda técnica ainda em fase de estabelecimento, esta se depara com algumas preocupações quanto a reprodutibilidade dos resultados e as conclusões dos estudos, pois à primeira vista envolve muitas decisões subjetivas e pessoais durante a análise dos dados. No entanto, existem programas desenvolvidos especificamente para esse tipo de análise e frequentemente são estabelecidos novos protocolos (ou atualizados) para padronizar as decisões e minimizar esta possível interferência, tornando os resultados seguramente comparáveis. Além disso, é comum que o mesmo bioinformata participe de todos os experimentos de um determinado grupo de pesquisa, sendo o principal responsável pela interpretação biológica final. Outra implicação da imaturidade da técnica é o alto custo dos experimentos, porém à medida em que for se popularizando, o aumento da demanda resultará em valores cada vez mais acessíveis. Esses desafios ainda são compartilhado por todas as técnicas -ômicas (HAYES; BRADFIELD, 2005; TONG; FANG; MENDRICK, 2009; CHASSY, 2010; DAVIES, 2010; HALDER, 2013).

2 - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO
FUNCIONAL DE ISOLADO PROTEICO DE
SEMENTES DE *Amburana cearensis*

2.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA / JUSTIFICATIVA

As sementes de leguminosas, por possuírem elevado teor proteico, são amplamente utilizadas na alimentação humana e animal, mas a presença de compostos tóxicos e/ou de antinutrientes é frequentemente citada como um ponto negativo. Muitos destes componentes são de natureza não proteica, como os polifenóis (taninos e flavonoides), os fitatos e os glicosídeos (saponinas). No entanto, as populações que incluem as sementes na alimentação normalmente o fazem após algum tratamento para reduzir sua potencial toxicidade – demolho e fervura são alguns exemplos (VASCONCELOS *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2011, 2012; SHARMA; GOYAL; BARWAL, 2013). Além do consumo da semente na íntegra, é cada vez mais comum o uso apenas da porção proteica das sementes em formulações alimentares industriais, geralmente concentrados ou isolados proteicos. Segundo a ANVISA, estes e outros produtos derivados de partes de plantas ricas em proteínas podem ser denominados coletivamente de produtos proteicos de origem vegetal e podem ser comercializados sob várias apresentações (grânulo, pó, líquido e outras) (BRASIL, 2005; FOEGEDING; DAVIS, 2011; LAM; NICKERSON, 2013).

O isolamento as proteínas dos demais componentes das sementes, normalmente é realizado por meio de extração em meio aquoso. Diversos fatores ambientais interferem no rendimento deste processo, dentre eles estão a granulometria da farinha, o tempo e a temperatura de extração, a proporção farinha:solvente, diferentes concentrações de diferentes sais, o pH, extrações sucessivas e a velocidade de centrifugação (ADEBOWALE, 2008; SINGH; OGUNSINA; RADHA, 2011).

A adição de proteínas em preparações alimentícias nem sempre objetiva o enriquecimento nutricional. Muita atenção tem sido dada à capacidade das proteínas em alterar propriedades no produto final, especialmente quanto à forma, textura e consistência. Mesmo em quantidade muito pequena, como 1 ou 2% , já é possível observar a alteração causada pela adição de proteínas. Essas alterações ocorrem principalmente pela interação das moléculas de proteínas com o solvente na qual estão dispersas; por conta disso, a solubilidade é fundamental para que o produto final atinja o resultado esperado. Por sua vez, a solubilidade é altamente dependente da composição das proteínas, uma vez que é influenciada pelas interações entre as moléculas de água e os aminoácidos. Assim, pode-se esperar menor solubilidade de proteínas com maior proporção de aminoácidos apolares (RAGAB; BABIKER; ELTINAY, 2004; LIU *et al.*, 2008; PAPALAMPROU *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010; GARBA; KAUR, 2014).

Para predizer se uma proteína (ou grupo de proteínas) poderá ser adicionada com sucesso em uma formulação alimentar, é necessário que se investigue suas propriedades funcionais. As propriedades funcionais clássicas de proteínas são definidas por Foegeding e Davis (2011) como a habilidade de formar e/ou estabilizar teias (géis e filmes), espuma, emulsão e solução coloidal (sol). Como mencionado acima, quanto maior a interação das proteínas com o solvente, maior será sua capacidade de promover estas propriedades. Sendo assim, a avaliação da solubilidade é fundamental para predizer se o isolado terá boas propriedades funcionais ou não.

Neste estudo, diversas variáveis foram avaliadas durante o processo de obtenção do isolado proteico das sementes de cumaru, visando o melhor aproveitamento das proteínas. Após definir as condições para um bom rendimento, o isolado proteico foi produzido e foram avaliadas várias propriedades funcionais. Os testes também foram conduzidos com a farinha delipidada da semente, material que originou o isolado proteico. Com o objetivo de comparar os resultados com um produto já estabelecido no mercado, os testes foram ainda realizados com um isolado proteico de soja obtido comercialmente.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste capítulo foi estabelecer um protocolo para obtenção de um isolado proteico de sementes de cumaru (*Amburana cearensis*) e predizer seu potencial uso pela indústria alimentícia.

2.2.2 Objetivos específicos

- Testar o efeito de diferentes parâmetros variáveis (pHs, tempos de extração, proporções farinha:solvente, tipos e concentração de sais e número de extrações) sobre a extratibilidade das proteínas da farinha delipidada de cumaru (FDAc);
- Produzir um isolado proteico de sementes de cumaru (IPAc) com base nos testes dos parâmetros variáveis;
- Determinar a composição proximal (proteínas, lipídeos, cinzas, fibra alimentar e carboidratos digeríveis) de FDAc e o teor de proteínas totais dos isolados proteicos de cumaru (IPAc) e de soja (IPS);
- Analisar o perfil proteico de FDAc, IPAc e IPS através de eletroforese em gel de poliacrilamida;
- Examinar a composição aminoacídica de FDAc, IPAc e IPS;
- Avaliar o perfil de solubilidade do nitrogênio e as seguintes propriedades funcionais de FDAc, IPAc e IPS: capacidade de retenção de água (CRA), capacidade de retenção de óleo (CRO), capacidade emulsificante (CEm) e estabilidade da emulsão (EEm), capacidade espumante (CEs) e estabilidade da espuma (EEs), menor concentração geleificante (MCG).

2.3 MATERIAIS

2.3.1 Sementes de cumaru e isolado proteico de soja

As sementes de cumaru utilizadas nesta etapa do trabalho foram coletadas na localidade Vila Naiara, município de Varjota (CE, Brasil). O isolado proteico de soja, da marca Celeiro (Fortaleza, CE, Brasil), foi obtido em loja de produtos naturais na cidade de Fortaleza (CE, Brasil) e está denominado neste trabalho como IPS.

2.3.2 Material biológico, reagentes químicos e outros materiais

O óleo de soja (Liza[®], Cargill, São Paulo, SP, Brasil) (utilizado na determinação das capacidades de retenção de óleo e emulsificante) foi adquirido em supermercado na cidade de Fortaleza (CE, Brasil). Albumina sérica bovina (BSA) utilizada como padrão para quantificação proteica e membranas para diálise com poro de 12 kDa foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EUA).

Todos os demais reagentes utilizados neste estudo foram de grau analítico.

2.4 METODOLOGIA

2.4.1 Processamento das sementes

As sementes de cumaru foram trituradas em moedor de café Cadence MDR301 (Caxias do Sul, SC, Brasil) até obtenção de farinha fina ($< 0,5$ mm) que, após 48 h em estufa a 45°C para desidratação, foi denominada Farinha Integral de *Amburana cearensis* (FIAC). A FIAC foi delipidada com hexano na proporção 1:3 (m/v) a frio, em repouso no interior de uma capela de exaustão de gases. A cada 24 h de contato, o solvente saturado era retirado cuidadosamente com pipeta sorológica e substituído pelo mesmo volume de solvente novo. O processo foi repetido pelo menos três vezes. Após o último hexano saturado ter sido removido e o residual evaporado na capela de exaustão, a farinha foi novamente homogeneizada e denominada Farinha Delipidada de *Amburana cearensis* (FDAC).

2.4.2 Determinação das melhores condições para extração das proteínas de FDAC

Para descobrir quais condições experimentais iriam resultar em maior rendimento de isolado proteico, diversos parâmetros (pH, tempo de extração, proporção farinha:solvente, diferentes sais, concentração do sal escolhido e número de extrações) foram analisados isoladamente. Com exceção do tempo de extração e proporção farinha:solvente, que foram analisadas combinadas, os demais parâmetros foram testados isoladamente, enquanto que os não estavam sendo analisados seguiam condições padrão para facilitar a comparação entre os vários testes realizados. Tais condições foram denominadas coletivamente como ‘condição neutra’ e foram estabelecidas de forma a reduzir o consumo de material (farinha da semente), visto que se trata de espécie não cultivada. A extração nas condições padrão era realizada em água destilada, na proporção 1:50 (m/v), sem nenhum sal adicionado, pH ajustado para 7,0 e monitorado por 1 h em temperatura ambiente e sem re-extração (Quadro 3). A baixa proporção escolhida como padrão (1:50 m/v) objetiva, além de economizar material biológico, assegurar a máxima extratibilidade, evitando que a capacidade extratora do solvente seja reduzida por saturação. Os ajustes de pH foram realizados pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M ou ácido clorídrico (HCl) 0,1 M.

As extrações foram conduzidas em duplicatas, utilizando 1 g de FDAC (com variação máxima de ± 10 μg) em erlenmeyer de 125 mL, sob agitação contínua em banho-maria sem aquecimento (Banho Dubnoff, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil). A

Quadro 3 - Variáveis analisadas durante a determinação das condições ideais de extração das proteínas de *Amburana cearensis*. Os valores na coluna Condição Neutra são considerados como padrão

Parâmetro Avaliado	Condição Neutra	Testes de Condições de Extração				
		Proporção (m/v) Número de Extrações	Adição de Sais	Concentração Salina	Tempo de Extração	pH
Número de Extrações	1 x	1x 2 x	1 x	1 x	1 x	1 x
Proporção (m/v)	01:50	01:10	01:50	01:50	01:50	01:50
		01:20				
		01:30				
Adição de Sais	-	-	NaCl	-	-	-
			NaF			
			CH ₃ COONa KI			
Concentração Salina	-	-	CaCl ₂	0,1 M	0,1 M	-
			C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇			
			0,25 M			
			0,5 M			
			0,75 M			
Tempo de Extração	1 h	1 h	1 h	1 h	1 h	1 h
					2 h	
					3 h	
pH	7	7	7	7	7	2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11

FONTE: Elaborada pelo autor;
Negrito destaca os valores testados para cada variável.

opção de utilizar um banho-maria ao invés de agitadores magnéticos se justifica pela possibilidade de realização de vários testes simultaneamente, (o aparelho tem capacidade para 12 amostras), evitando que seja criada uma nova variável. Após cada extração, as suspensões foram centrifugadas a 10.000 x g, 4 °C, por 30 min (Zentrifugen Rotina 380R, Hettich, Tuttlingen, Alemanha). Em seguida, as proteínas presentes no sobrenadante foram quantificadas fotocolorimetricamente (Espectrofotômetro Genesys 10, Spectronic Unicam, NY, EUA) de acordo com Bradford (1976) por se tratar de um método rápido, barato e de grande sensibilidade para quantificação de proteínas em solução. A proteína utilizada como padrão para a construção da curva de calibração e quantificação proteica foi a BSA.

A escolha de cada variável se baseou principalmente no teor de proteínas presentes nos sobrenadantes; contudo, em algumas ocasiões, fatores como conveniência e o custo final também foram levados em consideração para decidir qual conjunto de condições seria escolhido como protocolo de obtenção do isolado proteico. Considerando que durante a produção de IPAc em escala laboratorial as etapas de centrifugação e liofilização são fatores limitantes, convém evitar protocolos que gerem grandes volumes de extrato. Além disso, como este trabalho visa o desenvolvimento de um produto que futuramente possa ser produzido industrialmente, o custo final de produção também deve ser considerado. Grande volume de extrato para centrifugar e liofilizar implica em grande consumo de água e de energia. A quantidade de sal utilizado também pode elevar os custos de produção. Assim, a decisão final levou em consideração múltiplos fatores.

2.4.3 Produção dos isolados proteicos

Os testes dos parâmetros variáveis foram todos conduzidos em escala piloto, com quantidade de farinha muito inferior ao que seria realizado na rotina de produção do isolado proteico. Para garantir que as diferenças observadas nestes testes ainda se repetiriam quando as extrações fossem realizadas em escala maior, foram conduzidas algumas extrações experimentais utilizando algumas das condições que mostraram bom rendimento.

Assim, a escolha do protocolo utilizado para produção dos isolados proteicos a partir de FDAc considerou múltiplos fatores que serão discutidos adiante. Uma vez determinadas as condições de extração das proteínas, o extrato bruto (EB) foi preparado e este teve suas proteínas isoladas através de precipitação isoelétrica. O pH do EB foi reduzido (para valor com baixa extração proteica, de acordo com os testes anteriores) pela adição de ácido clorídrico (HCl) 1 M e ficou em repouso até o dia seguinte (16-18 h), sob refrigeração (4 °C),

para total precipitação das proteínas. Após esse tempo, o material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriores e as proteínas precipitadas foram coletadas e ressuspensas em água destilada em volume mínimo. A suspensão obtida, denominada extrato proteico (EP), foi dialisada 4 vezes contra água destilada (somando tempo total de pelo menos 24 h e passou a ser denominada extrato proteico dialisado (EPd). Em seguida, o EPd foi liofilizado e denominado Isolado Proteico de *Amburana cearensis* (IPAc). Estas etapas estão sumarizadas em um esquema apresentado na Figura 6. Uma vez produzido o isolado proteico, foi calculado o rendimento bruto (RB) $[\text{IP obtido (g)} / \text{farinha (g)}]$ e o rendimento líquido de proteínas (RLP) $[\text{proteínas no IP obtido (g)} / \text{proteínas na farinha (g)}]$.

2.4.4 Composição proximal

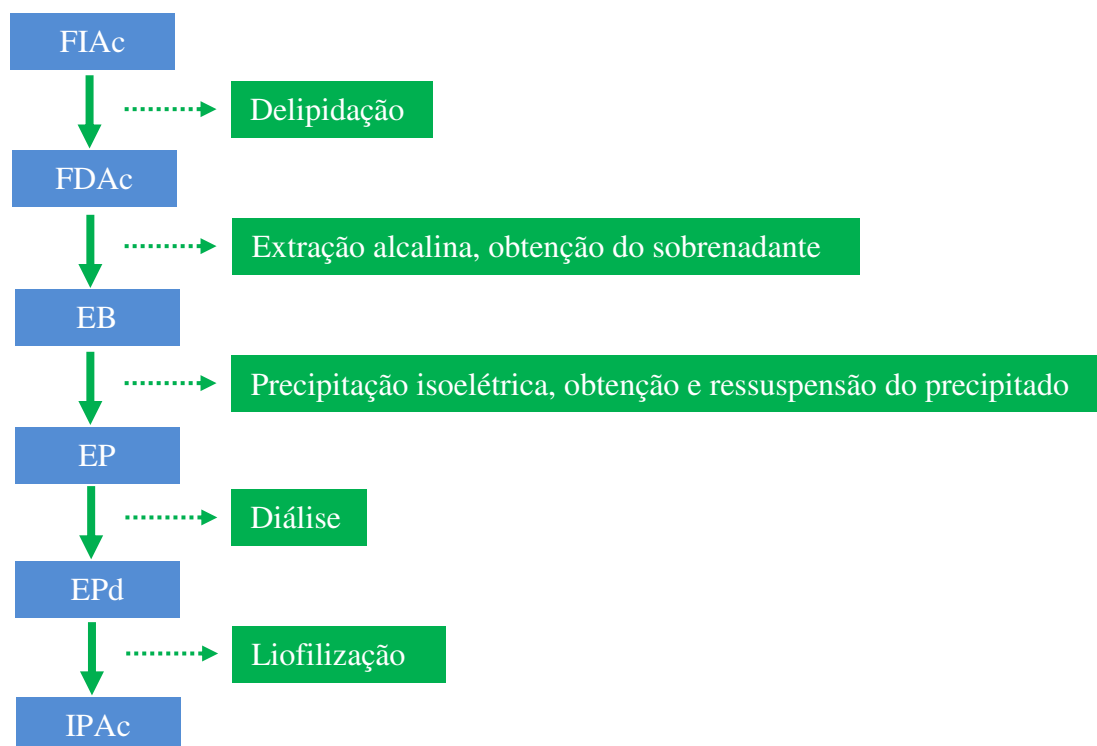
2.4.4.1 Umidade

O teor de umidade de FIAc foi determinado em triplicata seguindo a metodologia descrita pela AOAC (1997), com alterações. Placas de Petri limpas e secas foram aquecidas em estufa de secagem (FANEM, Modelo 002 CB, São Paulo, Brasil) a 105 °C por 24 h e após serem colocadas em um dessecador de vidro e atingirem temperatura ambiente, foram pesadas e taradas em balança analítica (Bioprecisa, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil). Foi pesado 1 g (ao invés de 5 g) de FIAc não desidratada em cada placa e as amostras foram levadas a estufa a 105 °C por 24 h. Após resfriarem até temperatura ambiente (em dessecador), as placas foram novamente pesadas e o teor de umidade foi determinado pela diferença entre as massas final e inicial das amostras, descontando o valor inicial da placa de Petri.

2.4.4.2 Proteínas totais

O teor proteico de FIAc, FDAc, IPAc e IPS foi determinado indiretamente a partir da quantificação de nitrogênio total (AOAC, 1997). Em triplicata, as amostras foram digeridas em sistema de (micro) Kjeldahl onde tubos de digestão contendo amostra, mistura catalítica (sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio metálico, 100:10:1, respectivamente) e ácido sulfúrico concentrado (1:10:50, m/m/v), foram levados a um bloco digestor (Modelo MA 448, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) a 400 °C por 45 min. A quantidade total de nitrogênio contida no material digerido foi determinada através de ensaio fotolorimétrico descrito por Baethgen e Alley (1989), utilizando curva padrão de sulfato de amônio (Merck, Darmstadt, Alemanha). O fator de conversão de nitrogênio para proteína foi $N \times 6,25$.

Figura 6 - Esquema resumido das etapas de obtenção do isolado proteico de *Amburana cearensis*



FONTE: Elaborada pelo autor.

2.4.4.3 Lipídios totais

O teor de lipídios totais de FIAC foi determinado em triplicata, segundo o método preconizado pela AOAC (1997). Envelopes de papel de filtro contendo 5 g de amostra foram acondicionados em sistema Soxhlet 303 mm juntamente com 150 mL de hexano. Após 6 horas, o extrato hexânico foi transferido para um béquer previamente pesado e o solvente foi completamente evaporado em capela de exaustão e estufa de secagem. O teor de lipídios totais foi calculado pela diferença entre a massa inicial e final dos béqueres e expresso como percentual da amostra inicial.

2.4.4.4 Matéria mineral

A matéria mineral de FIAC foi determinada em triplicata de acordo com metodologia descrita pela AOAC (1997). Cadinhos de porcelana contendo 1 g de amostra foram levados a forno mufla (Quimis, Modelo Q-318m24, Diadema, SP, Brasil) e calcinizadas a 550 °C por 4 h. O teor de matéria mineral foi determinado pela diferença entre as massas inicial e final dos cadinhos e expresso como percentual da amostra inicial.

2.4.4.5 Fibra alimentar total (FAT)

A quantificação de fibra alimentar total de FIAC foi realizada segundo PROSKY *et al.* (1988), metodologia recomendada pela AOAC (1997), utilizando o kit TDF-100A (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA). Resumidamente, a amostra foi digerida sequencialmente com alfa-amilase termoestável, protease e amiloglicosidase. Após precipitação das fibras solúveis pela adição de etanol, o resíduo foi filtrado e seco. Em seguida, proteínas totais e matéria mineral foram quantificadas no resíduo. Paralelamente às amostras, foi realizado um ensaio ‘branco’, onde nenhuma amostra estava presente. O teor de fibra alimentar total das amostras foi calculado de acordo com a fórmula:

$$FAT = \frac{[R(a) - P(a) - C(a) - B]}{Pi(a)}$$

Onde:

FAT = Fibra Alimentar Total

R(a) = Massa do resíduo da amostra (mg)

P(a) = Massa das proteínas da amostra (mg)

$C(a)$ = Massa da matéria mineral (cinzas) da amostra (mg)

B = Massa do Resíduo (branco) – Proteínas (branco) – Cinzas (branco) (mg)

$Pi(a)$ = Massa inicial da amostra (mg)

2.4.4.6 Carboidratos digeríveis

O percentual de carboidratos digeríveis foi calculado por diferença dos demais constituintes analisados (proteínas totais, lipídios totais, matéria mineral e fibra alimentar total), de forma que o total somasse 100%.

2.4.5 Composição de aminoácidos

A composição em aminoácidos de FIAC, FDIAC, IPAC e IPS foi determinada através de cromatografia de troca-iônica em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência; HPLC, em inglês), adaptada a partir do método descrito por Spackman, Stein e Moore (1958). Em duplicata, 4 mg de farinha delipidada foram hidrolisadas com 1 mL de HCl 6,0 M contendo 1% de fenol (m/v), por 22 h, a 110 °C em ampolas de vidro fechadas, sob atmosfera de nitrogênio para prevenir a oxidação dos aminoácidos. Concluída a hidrólise, as ampolas foram abertas e o HCl/fenol removido por evaporação, em dessecador com pressão reduzida na presença de NaOH. Em seguida, as amostras foram dissolvidas em tampão citrato de sódio pH 2,2, filtradas em membrana de 40 µm (Millipore®) e submetidas a análise cromatográfica dos aminoácidos. O aminoácido aromático triptofano, sensível a hidrólise ácida, não foi determinado neste trabalho. Visando a melhor comparação dos resultados entre as diferentes amostras, os mesmos foram expressos como g do aminoácido / 100 g do total de aminoácidos analisados.

2.4.6 Perfil eletroforético - eletroforese em gel de poliacrilamida

As proteínas de EB, EP, EPd, IPAC e IPS foram corridas em gel de poliacrilamida para visualização do perfil de suas proteínas constituintes. As amostras líquidas, EB, EP e EPd, no volume de 100 µL, foram inicialmente banhadas em acetona (P.A.) (400 µL) *overnight* para precipitar as proteínas e reduzir a interferência de contaminantes. Após centrifugação (10.000 g, 5 min, 25 °C), o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de solução de ureia/tiourea (7:2 v/v) (U/T) às proteínas precipitadas. As amostras sólidas, IPAC e IPS, foram solubilizadas diretamente em U/T (1 mg / 500 µL). As proteínas foram então dosadas de acordo com Bradford (1976). Para cada raia do gel, foi calculada a

quantidade de 15 µg de proteínas contidas em 20 µL de amostra/tampão de amostra. O tampão de amostra preparado foi Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e azul de bromofenol 0,02% (para a marcação da frente de corrida eletroforética). Em todas as corridas foram utilizados géis de aplicação contendo 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 1% e os géis de separação contendo 15% de poliacrilamida em uma solução tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,9 e SDS 1%. Os géis foram corados com solução de com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,05% em metanol, ácido acético glacial e água (1:3,5:8, v/v/v). A visualização das bandas proteicas ocorreu após descoloração utilizando solução de metanol, ácido acético glacial e água (1:3,5:8, v/v/v). Como marcadores de massa molecular padrão foram utilizadas as seguintes proteínas: fosforilase b de coelho (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina de galinha (45 kDa), anidrase carbônica bovina (30 kDa) e alfa-lactalbumina bovina (14,4 kDa) (GE Healthcare Life Sciences, USA).

2.4.7 Determinação do perfil de solubilidade proteica e propriedades funcionais

O perfil de solubilidade proteica e as propriedades funcionais foram determinados para FDAc, IPAc e IPS.

2.4.7.1 Perfil de solubilidade proteica

O perfil de solubilidade proteica foi determinado indiretamente a partir da razão entre nitrogênio solúvel e nitrogênio total da amostra. As amostras foram postas em suspensão com água (1% m/m) e o pH ajustado para 2, 4, 6, 8 ou 10 (duplicata para cada pH). Em tubos plásticos previamente pesados, foram adicionados 150 mg da amostra e 8 g de água destilada. Após o ajuste do pH (com NaOH 0,1 M ou HCl 0,1 M), foi acrescentado mais água à suspensão até que a mistura atingisse 15 g. Depois de 10 min de agitação em vortex, os tubos foram centrifugados a 3.000 x g, 20 °C, por 20 min, o sobrenadante foi recolhido e o nitrogênio solúvel quantificado por (micro) Kjeldahl, como descrito no tópico 4.4.1. O resultado para cada pH foi calculado como o nitrogênio solúvel dividido pelo nitrogênio total na amostra inicial e expresso como percentual.

2.4.7.2 Capacidade de retenção de água e óleo

A capacidade de retenção de água (CRA) e a capacidade de retenção de óleo (CRO) foram determinadas, em triplicata, de acordo com Aydemir e Yemenicioğlu (2013b),

com pequenas modificações. Em tubos de micro centrífuga previamente pesados, foram colocados a amostra e água destilada ou óleo de soja na proporção 5% m/v (enquanto que o trabalho original utilizou 3,3%). As suspensões foram brevemente homogeneizadas em vortex e os tubos incubados em banho-maria a 30 °C por 30 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 15.000 x g, 25 °C, por 20 min, a água ou óleo sobrenadantes foram removidos cuidadosamente com o auxílio de pipeta automática e os tubos foram novamente pesados. CRA e CRO foram calculados por diferença de massa inicial e final dos tubos e expressos como a massa (g) de água ou óleo, respectivamente, retida por g de amostra.

2.4.7.3 Capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão

A capacidade emulsificante (CEm) e a estabilidade da emulsão (EEm) foram determinadas, em triplicata, segundo Yasumatsu *et al.* (1972). Cada amostra (350 mg) foi suspensa em 5 mL de água destilada em um tubo plástico graduado, onde foram acrescentados 5 mL de óleo de soja. Os tubos foram agitados em vortex por 5 min e centrifugados (1.300 x g, 20 °C, 5 min). A CEm, expressa como o percentual da altura total representada pela camada emulsificada, foi calculada de acordo com a fórmula:

$$CEm = \frac{\text{altura da camada emulsificada}}{\text{altura total da mistura no tubo}} \times 100$$

Para verificar a estabilidade da emulsão, os mesmos tubos foram aquecidos em banho-maria a 80 °C por 30 min e resfriados em banho de gelo por 5 min. Em seguida, foram novamente centrifugados (sob as mesmas condições anteriores). A EEm foi calculada da mesma forma que CEm.

2.4.7.4 Capacidade espumante e estabilidade da espuma

A capacidade espumante (CEs) e a estabilidade da espuma (EEs) foram determinadas, em triplicata, baseadas no trabalho de Aydemir e Yemenicioğlu (2013a), com pequenas alterações. Inicialmente, a suspensão de 400 mg da amostra em 15 mL de água destilada (2% m/v ao invés de 1% m/v no trabalho original) teve o pH ajustado para 7,0 (com NaOH 0,1 M ou HCl 0,1 M). Em seguida o volume foi ajustado para 20 mL com água destilada e misturada por 5 min com aparelho Ultra-Turrax (IKA T180, Staufen, Alemanha) na velocidade 2 (de 3), em temperatura ambiente. A mistura foi transferida imediatamente

para uma proveta volumétrica e a altura da camada da espuma foi registrada nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min. A CEs, expressa como o aumento percentual do volume total (além dos 20 mL iniciais) causado pela espuma formada, foi calculada como se segue:

$$CEs = \frac{VT \text{ final} - VT \text{ inicial}}{VT \text{ final}} \times 100$$

A EEs em cada tempo observado foi calculada da mesma forma que a CEs.

2.4.7.5 Menor concentração geleificante

Para determinar a capacidade geleificante das amostras, foi identificada a menor concentração geleificante (MCG) de acordo com Aydemir e Yemenicioğlu (2013a), com pequenas alterações. Para resultados mais facilmente comparáveis entre si e para manter a uniformidade com as demais análises, o pH foi ajustado para 7,0, etapa não existente no trabalho original. Para cada amostra, foram preparadas suspensões nas concentrações 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20% (m/v), em triplicata. As suspensões foram agitadas em vortex por 2 min e distribuídas em tubos de ensaio (1,46 mm de diâmetro), 5 mL em cada tubo. Após 1 h de incubação em banho-maria a 80 °C, seguido de resfriamento em banho de gelo por 5 min, os tubos foram mantidos a 4 °C por 1 h. Após este tempo, foi verificada a formação de gel nos tubos pela observação da fluidez do conteúdo dos tubos quando invertidos manualmente. A MCG corresponde à menor concentração de amostra (g/100g) capaz de formar um gel consistente o bastante para não cair ou escorrer quando o tubo é invertido.

2.4.8 Análise estatística

Foram calculadas médias e desvios padrão de todos os valores obtidos. O teste de Tukey (comparação múltipla de médias), utilizado para definir o grau de semelhança das respostas de diferentes amostras ao mesmo tratamento, foi realizado com auxílio do programa GraphPad Prism, versão 6.05. Diferenças maiores que 5% foram consideradas estatisticamente significantes ($P < 0,05$).

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Determinação das melhores condições para extração das proteínas de FDAC

Para estabelecer um protocolo de obtenção de IPAC algumas variáveis do processo de extração (pH, tempo de extração, proporção farinha:solvente, diferentes sais, concentração do sal escolhido e número de extrações) foram testados. Os resultados foram analisados de forma comparativa para cada variável e as condições escolhidas com base, principalmente, no teor de proteínas solúveis no sobrenadante após as extrações, porém outros fatores, como custo de produção, também foram considerados em alguns casos. O Gráfico 1A mostra o efeito de diferentes proporções farinha:solvente e de uma segunda extração (re-extração) sobre o rendimento proteico. É possível observar que na primeira extração a menor proporção (1:30) foi a mais eficiente na extração das proteínas (238,9 µg prot./g farinha) e que o poder extrator diminuiu com o aumento da proporção para 1:20 e 1:10 (157,1 e 86,8 µg prot./g farinha, respectivamente). Adebowale (2008) encontrou correlação semelhante trabalhando com sementes de *Mucuna pruriens*. Segundo o autor, o mecanismo que regula a extração de proteínas segue uma cinética de dissolução e difusão que é regida por uma força motriz relacionada com o gradiente de concentração da proteína entre as fases sólida e líquida. A concentração do material no líquido no estado de equilíbrio pode ser relacionada com a fase sólida por um coeficiente de partição. As proteínas de *Moringa oleífera* apresentaram correlação semelhante quando extraídas em soluções de CaCl₂ 0,5 M ou de NaCl 0,75 M (SINGH; OGUNSINA; RADHA, 2011), mas quando a solução extratora foi água, o inverso foi observado, sendo que a maior proporção farinha:solvente foi a mais eficiente.

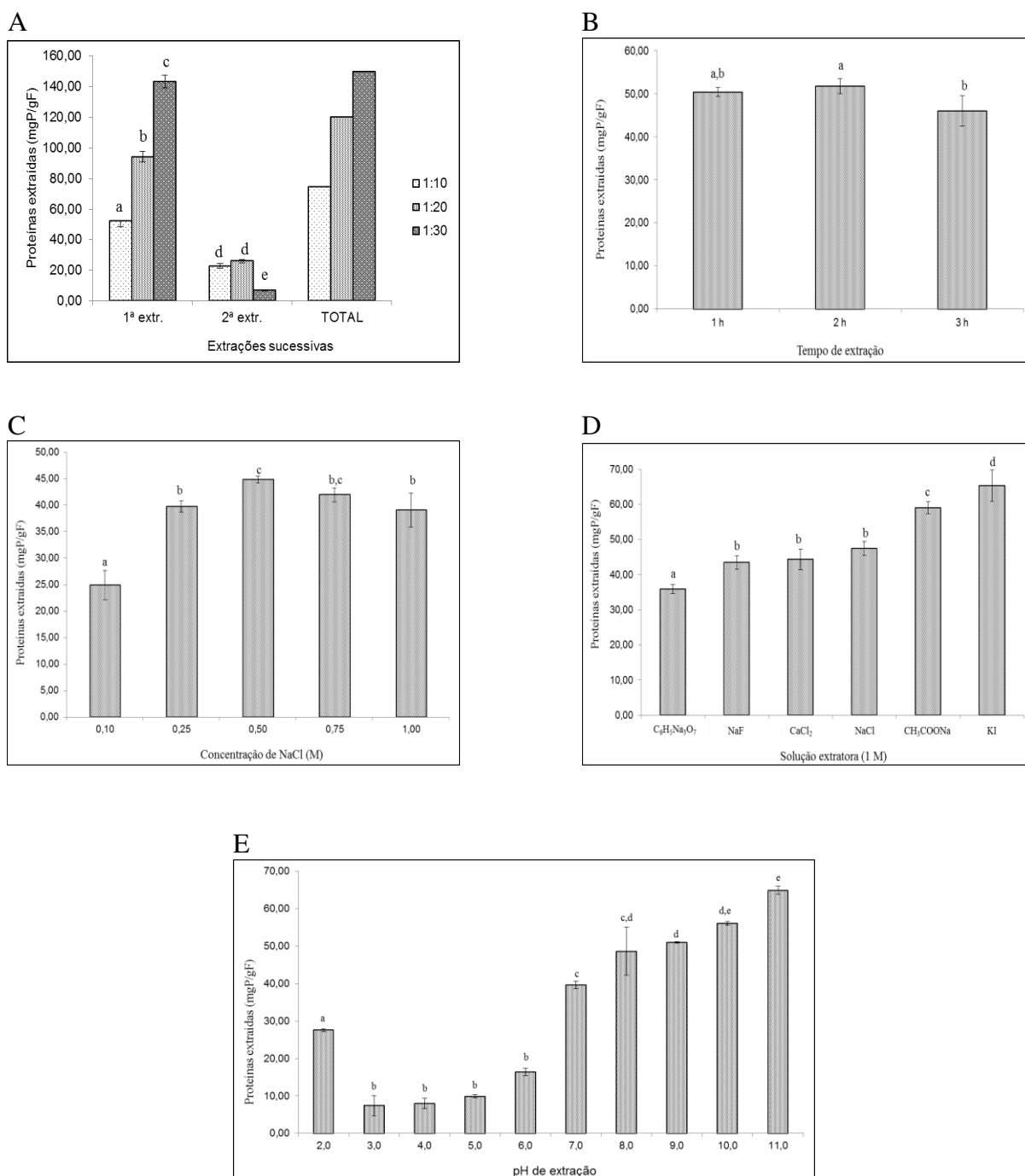
Uma segunda extração do resíduo foi capaz de extrair um pouco mais de proteínas nas proporções 1:10 e 1:20, mas bem menos em 1:30 (22,5; 25,9 e 6,8 µg prot./g farinha, respectivamente). Contudo, considerando a soma das duas extrações, a menor razão farinha:solvente (1:30) ainda foi capaz de extrair mais proteínas, visto seu elevado rendimento na primeira extração. Adebowale (2008) conduziu até seis extrações consecutivas de *Mucuna pruriens* e verificou um aumento gradual até a 4ª extração. As duas últimas extrações não apresentaram aumento no rendimento proteico. O autor comenta que a re-extração é eficiente por que coloca a amostra em contato com solvente não saturado, sendo mais indicado a realização de múltiplas extrações com menor volume do que apenas uma com volume maior. Portanto, para garantir a escolha do melhor protocolo de extração, isolados proteicos serão

produzidos sob na proporção 1:10 com reextração (1:10, 2x) e 1:30 sem re-extração (1:30, 1x) e comparados em termos de rendimento bruto (RB) e líquido de proteína (RLP).

Quando o tempo de extração foi avaliado, observou-se que o aumento do tempo de 1 para 2 h não foi acompanhado pelo aumento do rendimento proteico (50,4 e 51,8 µg prot./g farinha, respectivamente), enquanto que uma extração com 3 h de duração resultou em menor quantidade de proteínas no sobrenadante (46,0 µg prot./g farinha) (Gráfico 1B). Singh, Ogunsina e Radha (2011) e Adebawale (2008) observaram que a maioria das proteínas de *Mucuna pruriens* e *Moringa oleífera*, respectivamente, são extraídas nos primeiros 10-20 minutos. No entanto, no segundo trabalho a extração continua aumentando até 2h. De acordo com estes autores, as proteínas extraídas nos primeiros minutos são majoritariamente albuminas e as demais globulinas e demais proteínas são extraídas posteriormente. Com isso, é possível compreender que o tempo ideal de extração irá variar de acordo com a espécie, visto que é dependente da composição de suas proteínas. Para a produção de IPAc foi escolhido o tempo de 1 h de extração, visto que não houve diferença em relação a 2 h.

O resultado da adição de diferentes sais na solução extratora, todos na concentração de 1 M, pode ser visto no Gráfico 1C. Em ordem crescente de proteínas extraídas, os sais foram: citrato de sódio, fluoreto de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de sódio, acetato de sódio e iodeto de potássio (35,9; 43,5; 44,3; 47,5; 59,0 e 65,3 mg proteínas/g farinha, respectivamente). Este resultado está de acordo com o esperado, pois concorda quase totalmente com a série de Hofmeister que prediz que sais são bons ou maus extratores de proteínas. De acordo com esta série, os íons são divididos em caotrópicos e cosmotrópicos. Os primeiros desestabilizam as pontes de hidrogênio, o que ajuda a afrouxar a estrutura da proteína, aumentando sua solubilidade. Os sais cosmotrópicos têm efeito oposto, estabilizando as pontes de hidrogênio e mantendo a estrutura nativa e a atividade das proteínas. Sabe-se que estes efeitos têm grande influência em muitos fenômenos biológicos e que são causados mais pelos ânions do que pelos cátions. No entanto, até hoje não se sabe ao com certeza como a série de Hofmeister afeta o dobramento / desdobramento de proteínas (KUNZ; HENLE; NINHAM, 2004; SZALONTAI *et al.*, 2013; KUMAR; VENKATESU, 2014). Entre os sais testados, havia cinco ânions diferentes: um iodeto, dois cloretos, um fluoreto, um citrato e um acetato. A ordem dos sais esperada de acordo com a série difere da ordem observada apenas pela posição do acetato de sódio, que foi o sal que menos extraiu proteínas quando o esperado era que ele fosse o segundo melhor, atrás apenas do iodeto de

Gráfico 1 - Efeito de diferentes variáveis sobre a extratibilidade das proteínas de sementes de *Amburana cearensis*. Quando não estavam sendo testados, os outros parâmetros eram: uma extração de 1 h em água destilada, proporção 1:50 (m/v), pH 7,0, temperatura ambiente). A: proporção farinha:solvente (m/v) e re-extração; B: tempo de extração; C: presença de sais; D: concentração do sal escolhido; E: diferentes pHs de extração



FONTE: Elaborada pelo autor;

Resultados são médias de duplicatas $\pm$ desvio padrão e expressos em mg de proteínas extraídas / g farinha inicial;

Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05\%$).

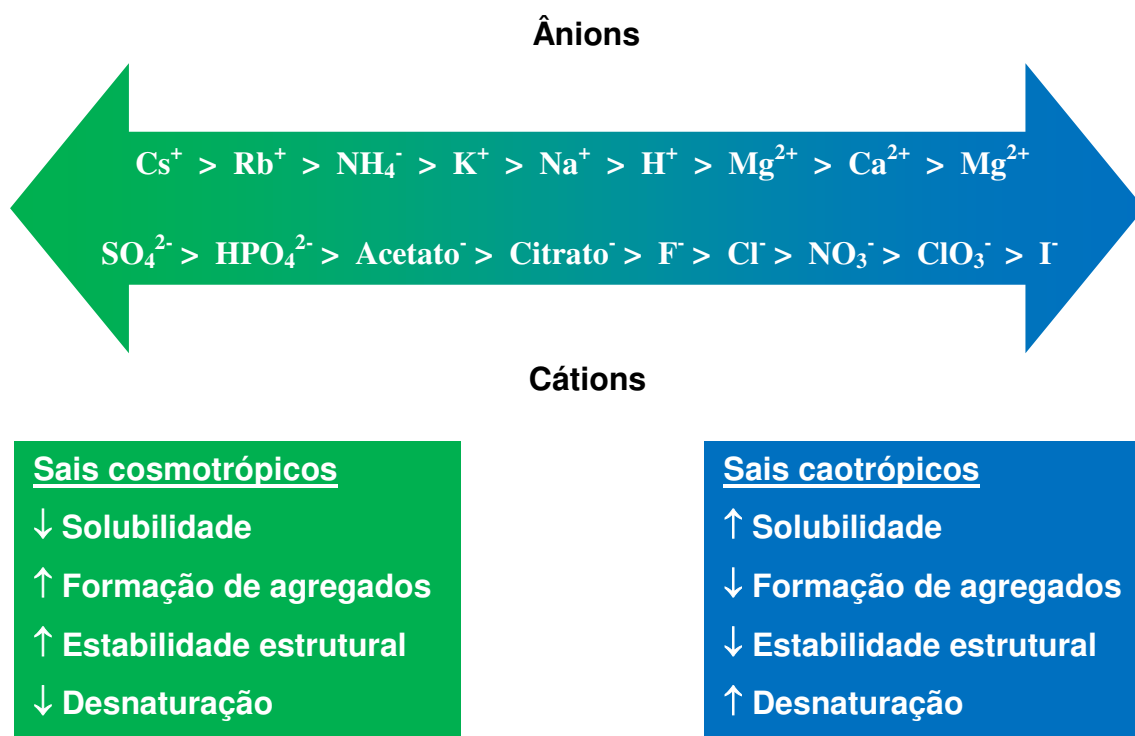
potássio (que foi, de fato, o mais eficiente). A Figura 7 ilustra a posição de alguns íons na série de Hofmeister.

Além do rendimento proteico, o custo de aquisição teve grande influência na escolha do sal. Em pesquisa de preços realizada em sites de venda de produtos químicos (www.quimibras.com.br e www.lojasynth.com) o valor dos sais (R\$/100 g) variou entre R\$ 1,80 e 4,87 para citrato de sódio, R\$ 3,01 e 3,77 para cloreto de cálcio, R\$ 0,63 e 1,91 para cloreto de sódio, R\$ 4,74 e 5,84 para acetato de sódio e entre R\$ 11,02 e 60,15 para iodeto de potássio. Foi encontrada apenas uma oferta de fluoreto de sódio no valor de R\$ 4,16 / 100 g. Assim, o sal escolhido foi o NaCl, pois além de ser o terceiro mais eficiente; apresentou o menor custo, fator muito importante frente a possibilidade de futura exploração comercial.

Em seguida, foram testadas outras concentrações deste sal: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e novamente 1 M. A menor delas (0,1 M) foi também a que apresentou menor extração proteica (24,9 g proteínas/g farinha). O rendimento aumentou gradualmente, atingindo valor máximo na concentração de 0,5 M de NaCl (44,83 mg proteínas/g farinha), e voltou a diminuir em concentrações maiores. As concentrações 0,25; 0,75 e 1 M renderam teores proteicos semelhantes (39,8; 42,0 e 39,1 g proteínas/g farinha, respectivamente) (Gráfico 1D). Singh, Ogunsina e Radha (2011) encontraram o mesmo comportamento quando testaram diferentes concentrações de NaCl e CaCl₂ para extrair proteínas da farinha de sementes de *Moringa oleífera*; nos dois casos a concentração de 0,5 M foi a mais eficiente. Este comportamento se deve ao efeito que a adição de sais tem sobre a solubilidade de proteínas. A adição de sal em pequena concentração melhora a solubilidade proteica, efeito conhecido como *salting in*. No entanto, aumentos posteriores na concentração resultam na interação dos ânions do sal com as cargas positivas das proteínas, resultando na redução da repulsão eletrostática e aumentando as interações hidrofóbicas responsáveis pela diminuição da solubilidade (*salting out*).

Por fim, foi avaliado o efeito de diferentes pHs de extração sobre o rendimento proteico e os resultados podem ser visualizados no Gráfico 1E. O pH 2, o menor dentre os avaliados, resultou na extração 27,6 mg proteínas/g farinha. O rendimento foi reduzido nos pHs 3, 4, 5 e 6 (7,41; 7,99; 9,88 e 16,42 mg proteínas/g farinha, respectivamente) e passou a aumentar gradualmente nos pHs 7, 8, 9, 10 e 11 (39,67; 48,68; 51,01; 56,10 e 64,96 mg proteínas/g farinha, respectivamente). Este comportamento é característico da maioria das proteínas vegetais, que têm ponto isoelétrico (PI) em pH entre 3 e 5 (KAUR; SINGH, 2007; ADEBOWALE, 2008; KAIN *et al.*, 2009). No PI, a carga líquida das proteínas é zero, fazendo com que elas assumam comportamento hidrofóbico e se reúnam formando agregados

Figura 7 - Série de Hofmeister e sua influência sobre proteínas



FONTE: Elaborada pelo autor.

proteicos. O pH 11, o mais eficiente, pode não ser uma boa escolha, pois pode prejudicar as propriedades funcionais do isolado. Por isso, isolados proteicos piloto serão produzidos em pH 9 e 11 e comparados em termos de rendimento bruto e líquido.

Com base nos resultados descritos acima, foi determinado que a extração das proteínas de cumaru seria conduzida sob as seguintes condições: adição de sal: NaCl; concentração salina: 0,5 M; tempo de extração: 1h e pH de precipitação: 3,5. Contudo, antes de escolher o pH de extração, a proporção farinha:solvente e o número de extrações, foram preparados isolados proteicos piloto (em duplicata) sob 4 diferentes condições para verificar se essas diferenças afetariam o rendimento bruto e líquido dos isolados proteicos obtidos. As condições testadas foram: (i) proporção 1:10, 2x, pH 9,0; (ii) proporção 1:30, 1x, pH 9,0; (iii) proporção 1:10, 2x, pH 11,0 e (iv) proporção 1:30, 1x, pH 9,0. Dos isolados proteicos produzidos em pH 11, o que apresentou maior RB foi o preparado na proporção 1:10, 2x (Tabela 2), no entanto foi ele também o que teve o menor teor de proteínas totais, 74,6%, valor muitas vezes não aceitável para um isolado. O tratamento pH 9, 1:30, 1x gerou o IP de menores RB e RLP (4,3 e 12,5%, respectivamente). Os demais tratamentos (pH 9, 1:10, 2x e pH 11, 1:30, 1x) apresentaram RB, RLP e teor proteico total estatisticamente iguais entre si. A produção do IP em pH mais elevado implica em maior consumo de NaOH na extração das proteínas e de HCl para sua precipitação, gerando mais sal para ser removido na etapa de diálise. Além disso, há o risco de causar hidrólise alcalina nas proteínas ou ainda de prejudicar suas propriedades funcionais devido às condições extremas de pH. Dessa forma, as condições escolhidas para o preparo de IPAc foram extração e re-extração em solução de NaCl 0,5 M, 1:10 (m/v), em pH 9.

2.5.2 Produção do isolado proteico de *Amburana cearensis*

Para produção dos isolados proteicos, FDAc foi suspensa em NaCl 0,5 M na proporção 1:10 (m/v) e o pH ajustado para 9,0 pela adição de NaOH 1 M. A suspensão foi mantida sob agitação magnética por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida o material sólido foi filtrado em tecido de nylon e o filtrado foi centrifugado a 10.000 x g, 4 °C, por 30 min. O precipitado foi reunido ao resíduo da primeira extração e submetido a nova extração sob as mesmas condições anteriores. Os dois sobrenadantes foram então reunidos e chamados de Extrato Bruto (EB). O isolamento das proteínas do EB se deu por precipitação isoelétrica, reduzindo o pH para 3,5 pela adição de HCl 1 M. O restante do processo (repouso para floculação das proteínas, centrifugação, diálise e liofilização) foi descrito em detalhes no

tópico 2.4.3 deste capítulo. Para cada 100 g de FDAc, a extração sob estas condições rendeu 5,3 g de IPAc, cujo teor proteico foi de 89,86% no teste piloto (Tabela 1).

2.5.3 Composição proximal

A umidade de FIAc era de $7,63 \pm 0,05\%$. Os resultados da composição proximal de FIAc (em base seca) e de proteínas totais de FDAc, IPAc e de IPS estão mostrados na Tabela 2. Os teores de proteínas, lipídeos, fibra alimentar e cinzas de FIAc (21,9; 27,2; 33,6 e 4,3%, respectivamente) foram muito próxima àqueles encontrados por Farias (2009) (22,7; 24,5; 34,8 e 4,5%, respectivamente). Os conteúdos de proteínas e de fibra alimentar em FIAc estão dentro do intervalo observado por Carvalho e colaboradores (2011) para outras leguminosas da Caatinga e são semelhantes aos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), feijão muito consumido no Brasil, sobretudo nas regiões norte e nordeste (CARVALHO *et al.*, 2012). O teor proteico de IPAc ($91,4 \pm 5,3\%$) se mostrou compatível com o esperado, acima de 90%, e praticamente igual ao do IP produzido por Farias (2009) ($93,2 \pm 4,3\%$). Esse valor foi ainda superior ao encontrado para IPS ($85,9 \pm 2,4\%$) o que pode ser visto como um fator positivo, pois mostra que o IPAc tem poucos componentes não proteicos. Li e colaboradores (2010) obtiveram valores entre 69,22 e 74,85% de proteínas para isolados proteicos de *Vigna radiata* e Medeiros (2013) produziu dois IPs de *Vigna unguiculata* com 92,44 e 95,14% de proteínas.

2.5.4 Composição aminoacídica

Uma das formas de avaliar a qualidade proteica é pela análise da composição de aminoácidos. Uma proteína considerada de boa qualidade deve fornecer todos os aminoácidos indispensáveis (FCN, 2011). Neste trabalho, os aminoácidos foram quantificados e os resultados foram normalizados para que somassem 100 g e expressos em g/100 g proteína na Tabela 3. Asparagina e glutamina estão considerados junto com os ácidos aspártico e glutâmico, respectivamente, e o triptofano não foi quantificado neste trabalho. Dentre os aminoácidos indispensáveis, a metionina foi o mais limitante, pois 100g da proteína é capaz de fornecer apenas 22 e 25% da necessidade de ingestão diária de crianças entre 2-5 anos e 6-12 anos, respectivamente. Todos os demais foram superiores aos requerimentos de crianças na faixa de 6-12 anos, enquanto que na faixa mais exigente (2-5 anos) os requerimentos foram satisfeitos em 97, 93 e 75% pelos aminoácidos lisina, treonina e fenilalanina, respectivamente. O único aminoácido não quantificado neste trabalho, triptofano, foi encontrado por Farias

Tabela 1 - Produção de isolado proteico de cumaru sob diferentes condições. Extração realizada com solução de NaCl 0,5 M, 1 h e proteínas precipitadas em pH 3,5, dialisadas contra água destilada e liofilizadas

Condições de extração	Farinha (g)	IP ¹ total (g)	RB ² (%)	Proteínas (%)	RLP ³ (%)
1:10, 2x, pH 9,0	20	1,07 ± 0,0	5,3 ± 0,0 ^a	89,86 ± 2,55 ^a	15,7 ± 0,4 ^a
1:30, 1x, pH 9,0	15	0,64 ± 0,0	4,3 ± 0,1 ^b	89,56 ± 1,47 ^a	12,5 ± 0,2 ^b
1:10, 2x, pH 11,0	20	1,31 ± 0,1	6,5 ± 0,3 ^c	74,58 ± 4,08 ^b	15,9 ± 0,0 ^a
1:30, 1x, pH 11,0	15	0,81 ± 0,0	5,4 ± 0,0 ^a	91,22 ± 0,26 ^a	16,0 ± 0,1 ^a

FONTE: Elaborada pelo autor;

¹ IP: Isolado Proteico;

² RB: Rendimento Bruto [IP obtido (g) / farinha (g)];

³ RLP: Rendimento Líquido de Proteínas [proteínas no IP obtido (g) / proteínas na farinha (g)];

Resultados são médias de duplicatas ± desvio padrão;

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P < 0,05%).

Tabela 2 - Composição de proximal¹ de FIAc, FDAc, IPAc e IPS em comparação com valores mínimo e máximo encontrados em estudo realizado com 14 espécies subutilizadas de leguminosas da Caatinga²

	FIAc	FDAc	IPAc	IPS	Carvalho <i>et al</i> (2011) ²
Proteínas ³	21,9 ± 1,7 ^a	30,1 ± 2,3 ^a	91,4 ± 5,3 ^b	85,9 ± 2,4 ^b	10,9 - 50,0
Lipídeos ³	27,2 ± 0,2	4,3 ± 0,17	ND	ND	0,7 - 29,6
Fibra Alimentar ³	33,6 ± 1,3	ND	ND	ND	0,8 - 52,3
Matéria Mineral ³	4,3 ± 0,0	ND	ND	ND	1,8 - 6,8
Carboidratos	13,0	ND	ND	ND	0,3 - 77,8
Digeríveis ³					

FONTE: Elaborada pelo autor;

¹ Composição proximal em base seca;

² CARVALHO *et al.*, 2011;

³ Proteínas aferidas indiretamente pela quantificação de nitrogênio total (Baethgen e Alley, 1989); Lipídeos extraídos por hexano em sistema Soxhlet; Fibra alimentar determinada de acordo com Prosky *et al.* (1988); Matéria mineral obtida após calcinização da amostra em forno mufla e Carboidratos digeríveis calculados por diferença dos demais constituintes para 100 %;

Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras pelo teste de Tukey (P < 0,05%);

ND: Não Determinado.

Tabela 3 - Composição de aminoácidos (g / 100 g de proteína) de FDAc, IPAc e IPS comparada à composição de sementes de soja¹ e aos requerimentos diários estabelecidos pela FAO/WHO/UNU para crianças²

Aminoácidos	FDAc	IPAc	IPS	Soja ¹	Crianças (anos) ²	
					2-5	6-12
Aminoácidos ácidos						
Ác. Aspartico	9,01 ± 0,00 ^a	8,47 ± 0,00 ^a	12,37 ± 0,32 ^b	10,11 ± 1,22 ^{a,b}	-	-
Ác. Glutâmico	22,52 ± 0,00 ^{a,b}	24,86 ± 0,01 ^a	19,79 ± 0,50 ^b	18,53 ± 1,29 ^b	-	-
Aminoácidos básicos						
Histidina	2,94 ± 0,00^a	2,95 ± 0,00^a	2,71 ± 0,09^a	2,40 ± 1,06^a	1,9	1,9
<i>Arginina</i>	<i>13,84 ± 0,01^a</i>	<i>14,26 ± 0,01^a</i>	<i>7,99 ± 0,20^b</i>	<i>6,63 ± 1,23^b</i>	-	-
Lisina	5,40 ± 0,01^a	5,65 ± 0,00^a	5,91 ± 0,15^a	5,41 ± 1,72^a	5,8	4,4
Aminoácidos sem carga						
<i>Serina</i>	<i>4,44 ± 0,00^{a,b}</i>	<i>4,18 ± 0,00^a</i>	<i>5,58 ± 0,14^{b,c}</i>	<i>5,61 ± 0,93^c</i>	-	-
Glicina	4,69 ± 0,01 ^a	4,22 ± 0,01 ^a	4,45 ± 0,10 ^a	4,38 ± 1,17 ^a	-	-
Treonina	3,54 ± 0,00^a	3,15 ± 0,00^a	3,82 ± 0,10^a	3,72 ± 0,92^a	3,4	2,8
<i>Tirosina</i>	<i>4,71 ± 0,01^a</i>	<i>3,36 ± 0,01^b</i>	<i>3,65 ± 0,09^b</i>	<i>3,49 ± 0,80^b</i>	-	-
<i>Cisteína</i>	<i>2,82 ± 0,00^a</i>	<i>2,76 ± 0,03^a</i>	<i>3,68 ± 0,05^b</i>	<i>1,83 ± 1,58^c</i>	-	-
Aminoácidos hidrofóbicos						
Alanina	3,42 ± 0,00 ^a	3,16 ± 0,00 ^a	2,21 ± 2,47 ^a	4,06 ± 0,82 ^a	-	-
Prolina	5,06 ± 0,02 ^{a,b}	4,80 ± 0,01 ^a	5,54 ± 0,12 ^b	5,08 ± 0,65 ^{a,b}	-	-
Valina	3,38 ± 0,02^a	3,51 ± 0,02^{a,b}	4,19 ± 0,14^{b,c}	4,42 ± 0,73^c	3,5	2,5
Metionina	0,41 ± 0,01^a	0,55 ± 0,00^{a,b}	0,83 ± 0,02^b	1,35 ± 1,02^c	2,5	2,2
Isoleucina	3,26 ± 0,00^a	3,09 ± 0,01^a	4,32 ± 0,12^b	4,49 ± 0,72^b	2,8	2,8
Leucina	6,37 ± 0,01^a	6,35 ± 0,01^a	7,75 ± 0,20^b	7,90 ± 0,75^b	2,8	4,4
Fenilalanina	4,20 ± 0,01^a	4,70 ± 0,01^{a,b}	5,22 ± 0,14^b	5,13 ± 0,67^b	6,3	2,2
Triptofano	ND	ND	ND	NC	NC	NC
Total analisado	100,0	100,0	100,0	100,0	-	-

FONTE: Elaborado pelo autor;

FDAc: Farinha delipidada de *Amburana cearensis*; IPAc: Isolado proteico de *Amburana cearensis*; IPS: Isolado proteico de soja (comercial);

¹ CARRERA *et al.*, 2011;

² Requerimentos de aminoácidos para crianças em diferentes faixas etárias estabelecidos pela FAO/WHO/UNU (1985);

Valores médios da composição de aminoácidos da farinha de sementes de feijão-caupi obtidos de duplicatas. Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras pelo teste de Tukey (P < 0,05%);

Negrito indica aminoácidos indispensáveis e itálico indica aminoácidos condicionalmente indispensáveis (FCN, 2011);

ND: Não determinado.

(2009) na farinha de sementes de cumaru em quantidade acima na necessidade de ingestão de crianças na faixa menos exigente. No entanto, a deficiência em metionina tem relevância reduzida, uma vez que é comum entre as leguminosas e pode ser facilmente corrigida se associada a uma dieta complementar, p. ex. cereais (ADEBOWALE *et al.*, 2007).

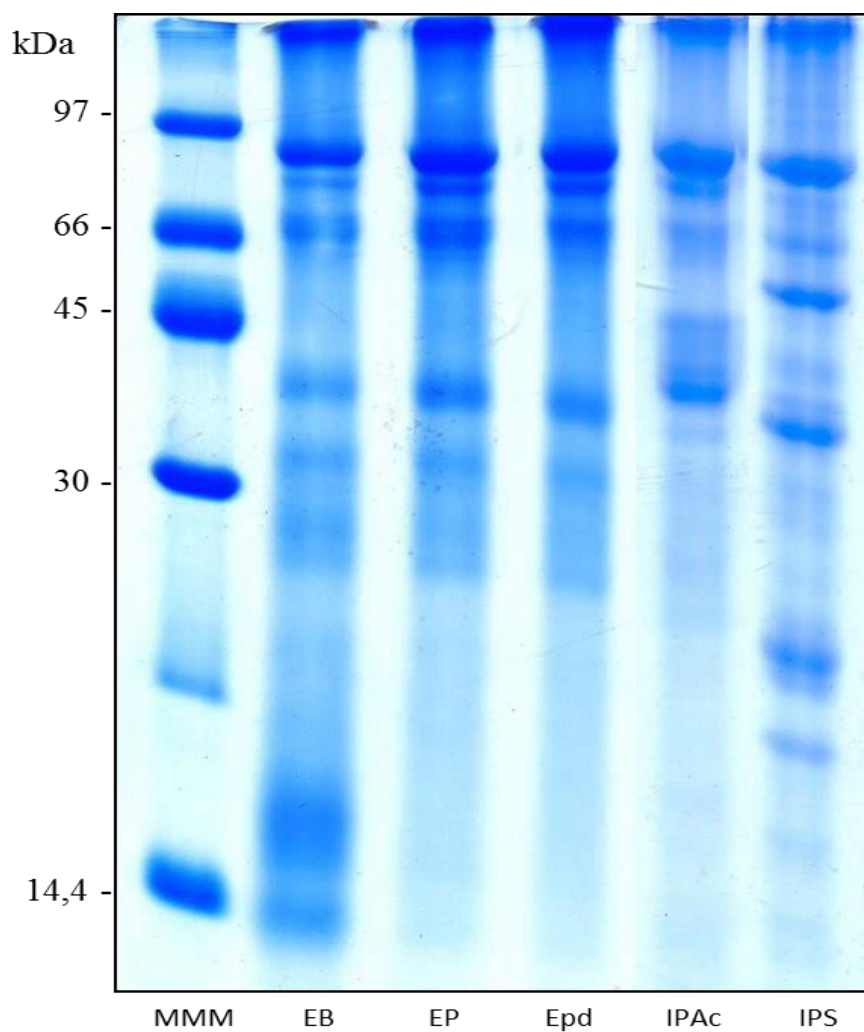
De forma geral, a composição de aminoácidos do isolado proteico foi semelhante à da farinha da semente que a originou, ou seja, IPAc ~ FDAc e IPS ~ Soja. As exceções são tirosina (FDAc > IPAc), cisteína (IPS > Soja) e metionina (IPS < Soja) (a composição aminoacídica da soja foi consultada em Carrera e colaboradores, 2011). Comparando apenas os dois isolados proteicos, IPS apresentou maior conteúdo de apenas quatro aminoácidos não indispensáveis (ácido aspártico, serina, cisteína e prolina) e um indispensável (isoleucina). Para todos os demais aminoácidos, o teor em IPAc foi superior ou igual que o teor em IPS. Considerando que IPS é um isolado proteico já comercializado e IPAc é o primeiro protótipo de isolado proteico de cumaru produzido em escala laboratorial, estas podem ser consideradas muito promissoras devido a suas qualidades nutricionais.

2.5.5 Perfil Eletroforético - eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Os perfis das proteínas do extrato bruto (EB), extrato proteico (EP), extrato proteico dialisado (EPd), IPAc e IPS em gel de poliacrilamida (15%) são apresentados na Figura 8. Na raia 2 estão as proteínas do EB, cuja banda mais expressiva tem massa entre 85 e 95 kDa. Também podem ser visualizadas outras duas bandas logo abaixo desta, uma de aproximadamente 80 e outra entre 66 e 70 kDa. Mais abaixo há uma banda de massa aproximada de 40 kDa e um grupo de outras entre 25 e 33 kDa. Todos estes 5 grupos de proteínas são também observados em EP e EPd (raias 3 e 4); no entanto, as proteínas de baixa massa molecular (abaixo de 20 kDa) presentes em EB já não aparece mais nas etapas seguintes. Isso pode ter acontecido devido ao pI dessas proteínas não ser próximo de 3,5, permanecendo solúveis no sobrenadante que fora descartado após a precipitação das proteínas. A diálise não alterou o perfil eletroforético das proteínas, mas após a secagem por liofilização é possível notar que as proteínas da faixa entre 25 e 33 kDa estão bem menos visíveis, ao passo que surgiu uma faixa com proteínas acima da banda com de massa aproximada de 40 kDa. Isto pode ser explicado pela formação de agregados proteicos provocados pelo processo de liofilização.

O perfil eletroforético do isolado proteico de sementes de cumaru produzido por Farias (2009) através de outra metodologia (fração proteica 0-90% de saturação com sulfato de amônio) foi bem diferente deste trabalho, com predominância de uma grande banda de

Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida



FONTE: Elaborado pelo autor;

MMM: Marcador de massa molecular (GE Healthcare Life Sciences, USA);

EB: Extrato bruto de *Amburana cearensis*;

EP: Extrato proteico de *A. cearensis*;

Epd: Extrato proteico de *A. cearensis* dialisado;

IPAc: Isolado proteico de *A. cearensis*;

IPS: Isolado proteico de soja (comercial).

proteínas do tipo globulinas com massa molecular acima de 45 kDa. Isso evidencia que o método de extração altera profundamente a composição do isolado final e, conseqüentemente, tem efeito sobre as propriedades funcionais do produto.

2.5.6 Determinação do perfil de solubilidade proteica e propriedades funcionais

A Tabela 4 sumariza todos os resultados do perfil de solubilidade e das propriedades funcionais. A solubilidade é uma propriedade importante na fabricação de bebidas, substitutos de laticínios, sopas e molhos (POUR-EL, 1981; GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009; GARBA; KAUR, 2014; DU *et al.*, 2014). O resultado do perfil de solubilidade proteica (ou do nitrogênio) é apresentado no Gráfico 2A. Todas as amostras apresentaram curva de solubilidade característica de proteínas de leguminosas, em forma de U, com solubilidade mínima no ponto isoelétrico que foi pH 4,0 para FDAc e IPS (19,67 e 2,99%, respectivamente) e pH 6,0 para IPAc (8,56%). Muitos isolados proteicos produzidos a partir de sementes de leguminosas têm a menor solubilidade nos pHs 4, 5 e 6 (LI *et al.*, 2010; MEDEIROS, 2013; LIANG; TANG, 2013). A solubilidade máxima foi 69,80% para FDAc, 99,38% para IPAc e 75,55% para IPS. Liu e colaboradores (2008) mostraram que a solubilidade do isolado proteico de soja pode ser afetada pela forma de estocagem da semente antes da produção do IP. Como o IPS foi adquirido comercialmente, não há como ter acesso ao tratamento sofrido pelas sementes que originaram o produto.

A capacidade de retenção de água (CRA) tem aplicações semelhantes às da solubilidade e a capacidade de retenção de óleo (CRO) é importante no preparo de salsichas, bolos, maionese, molhos para saladas e substitutos cárneos. Os resultados para CRA e CRO são mostrados no Gráfico 2B. FDAc não foi bom retentor de nenhum dos dois líquidos, já o IPAc foi melhor retentor de óleo (6,3 g óleo/g). Opostamente, o IPS reteve água melhor óleo (7,4 g água/g). No entanto, este valor pode estar superestimado, pois houve a formação de uma camada superficial após a centrifugação, o que dificultou a retirada da água. Visto que apenas 86% do IPS têm de natureza proteica e que esta camada formada era menos densa que a água, isto pode ter sido ocasionado pela delipidação pouco eficiente das sementes de soja. O fato de o IPAc ter sido capaz de reter mais óleo do que água pode indicar a predominância de aminoácidos hidrofóbicos, enquanto que em IPS é provável que se destaquem aminoácidos carregados positiva ou negativamente na superfície das proteínas (MORR, 1990; RAGAB; BABIKER; ELTINAY, 2004; FOEGEDING; DAVIS, 2011; GARBA; KAUR, 2014).

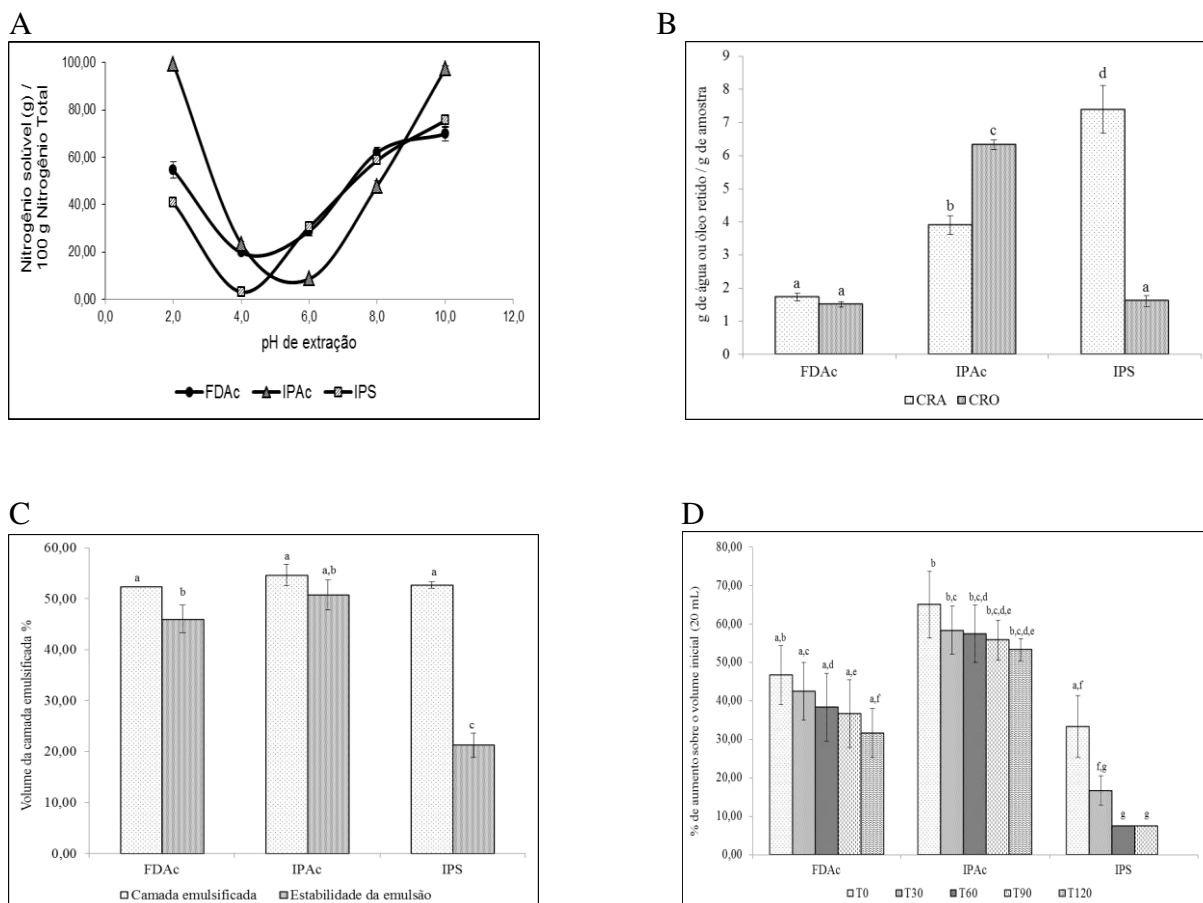
Proteínas com boa capacidade emulsificante (CEm) podem ser empregadas como ingredientes na fabricação de substitutos de laticínios, sorvete, maionese, bebidas proteicas,

refrigerantes, pães, emulsões cárneas, sopas, molhos e coberturas. Neste trabalho, as três amostras apresentaram CEm em torno de 50% (Gráfico 2C), valor muito próximo ao encontrado em outros trabalhos para IPs de *Vigna unguiculata* (48-50%). No entanto, FDAc e IPAc mantiveram cerca de 90% da camada emulsificada após 30 min de aquecimento a 80 °C, enquanto IPS teve redução de 70% da CEm. A semelhança dos resultados encontrados para FDAc e IPAc pode indicar que as proteínas de cumaru são seus principais agentes emulsificantes. As emulsões formadas pela farinha das sementes e pelo IP de *V. unguiculata* mantiveram estabilidade de 46-43 e 26-24%, respectivamente (RAGAB; BABIKER; ELTINAY, 2004; FOEGEDING; DAVIS, 2011; MEDEIROS, 2013; GARBA; KAUR, 2014).

A proteína mais utilizada em alimentos por causa de sua capacidade de formação de espuma é a ovoalbumina presente na clara do ovo, com a qual se faz claras em neve. Esta propriedade é muito desejável em merengues, coberturas, sobremesas aeradas, pães, bolos, substitutos de laticínios e de ovo. No teste de capacidade espumante foi medido o aumento percentual do volume, além dos 20 mL iniciais, provocado pela espuma formada (Gráfico 2D). A maior CE foi observada em IPAc (65%), valor superior ao encontrado por Medeiros (2013) para a farinha e IP de genótipos de feijão-caupi. FDAc teve aumento de 46,7%, e IPS de 33,3%. Assim como visto para estabilidade da emulsão, a estabilidade da espuma de IPS foi a menor dentre as testadas. Após 2 h IPAc ainda mantinha 82% da espuma formada e FDAc mantinha 68%. No entanto, IPS reduziu sua espuma em 50% logo nos primeiros 30 m e em 60 e 90 m só restavam 23% dela. Esta rápida redução pode ter relação com características das sementes que deram origem ao IPS (LI *et al.*, 2010; FOEGEDING; DAVIS, 2011; MEDEIROS, 2013; GARBA; KAUR, 2014).

A capacidade de geleificação é útil na produção de iogurtes, musses, queijos, pães, bolos e substitutos de laticínios e de ovos. Para FDAc, IPAc e IPS a menor concentração geleificante (MCG) foi 18, 16 e 12%, respectivamente. A proteína isolada formou gel em menor concentração do que a farinha, resultado compatível com o encontrado para feijão-caupi (MEDEIROS, 2013). As proteínas, além dos carboidratos, são bons formadores de gel, no entanto, os demais componentes da semente presentes na farinha interferem de forma negativa na formação do gel, pois atuam como obstáculos impedindo a formação da teia tridimensional entre as moléculas proteicas (FOEGEDING; DAVIS, 2011).

Gráfico 2 - Perfil de solubilidade do nitrogênio e propriedades funcionais de FDAc¹, IPAc² e IPS³. A: Perfil de solubilidade do nitrogênio; B: Capacidade de retenção de água (CRA) e capacidade de retenção de óleo (CRO); C: Capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão após 30 min. a 80 °C; D: Capacidade espumante e estabilidade da espuma após 30, 60, 90 e 120 min



FONTE: Elaborada pelo autor;

¹ Isolado proteico de *Amburana cearensis*;

² Farinha delipidada de sementes de *A. cearensis*;

³ Isolado proteico de soja (comercial);

A: Proporção amostra:água destilada 1% (m/m). Nitrogênio quantificado de acordo com Baethgen e Alley (1989);

B: Segundo Aydemir e Yemenicioğlu (2013b), utilizando proporção amostra:água e amostra óleo de 5% (m/v);

C: Segundo Yasumatsu *et al.* (1972), utilizando 350 mg de amostra, 5 mL de água e 5 mL de óleo de soja;

D: Segundo Aydemir e Yemenicioğlu (2013b), utilizando amostra:água 2% (m/v), pH 7,0;

Valores médios obtidos de duplicatas (A) ou triplicatas (B, C e D). Letras iguais no mesmo gráfico indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores pelo teste de Tukey ($P < 0,05\%$).

Tabela 4 - Perfil de solubilidade do nitrogênio e propriedades funcionais de FDAc, IPAc e IPS

Propriedade Funcional	FDAc	IPAc	IPS
Sol.N.pH2 ⁴	54,54 ± 3,4 ^a	99,38 ± 2,8 ^b	40,72 ± 1,5 ^c
Sol.N.pH4 ⁴	19,67 ± 0,7 ^a	23,4 ± 0,9 ^a	2,99 ± 0,1 ^b
Sol.N.pH6 ⁴	28,76 ± 2,1 ^a	8,56 ± 0,5 ^b	30,55 ± 1,6 ^a
Sol.N.pH8 ⁴	62,03 ± 2,3 ^a	47,91 ± 2,1 ^b	58,65 ± 1,4 ^a
Sol.N.pH10 ¹	69,80 ± 3,0 ^a	97,34 ± 1,2 ^b	75,55 ± 2,5 ^c
CRA ²	1,73 ± 0,12 ^a	3,90 ± 0,28 ^b	7,49 ± 0,72 ^c
CRO ³	1,51 ± 0,08 ^a	6,33 ± 0,14 ^b	1,61 ± 0,17 ^a
CEm ⁴	52,38 ± 0,00 ^a	54,71 ± 2,11 ^a	52,75 ± 0,64 ^a
EEm ⁴	46,03 ± 2,75 ^a	50,76 ± 2,96 ^a	21,26 ± 2,4 ^b
CEs T0 ⁵	46,67 ± 7,64 ^{a,b}	65,00 ± 8,66 ^a	33,33 ± 8,04 ^b
EEs T30 ⁵	42,50 ± 7,50 ^a	58,33 ± 6,29 ^a	16,67 ± 3,82 ^b
EEs T60 ⁵	38,33 ± 8,78 ^a	57,50 ± 7,50 ^a	7,50 ± 0,00 ^b
EEs T90 ⁵	36,67 ± 8,78 ^a	55,83 ± 5,20 ^a	7,50 ± 0,01 ^b
EEs T120 ⁵	31,67 ± 6,29 ^a	53,33 ± 2,89 ^b	*
MCG ⁶	18%	16%	12%

FONTE: Elaborada pelo autor;

IPAc: Isolado proteico de *Amburana cearensis*; FDAc: Farinha delipidada de sementes de *A. cearensis*; IPS: Isolado proteico de soja (comercial);

¹ Nitrogênio solúvel/nitrogênio total (%) em pH 2, 4, 6, 8 e 10;

² Capacidade de Retenção de água;

³ Capacidade de Retenção de óleo;

⁴ Capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão após 30 min a 80 °C;

⁵ Capacidade espumante no tempo 0 e estabilidade da espuma nos tempos 30, 60, 90 e 120 m;

⁶ Menor Concentração Geleificante;

Valores médios obtidos de duplicatas (⁴) ou triplicatas (⁵, ⁶, ⁷ e ⁸). Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras pelo teste de Tukey (P < 0,05%).

2.6 CONCLUSÃO

As proteínas de *Amburana cearensis* são uma fonte promissora de proteínas alimentares, pois além de muito ricas nutricionalmente, apresentam propriedades funcionais de interesse industrial, comparáveis às das proteínas de soja já amplamente comercializadas. O isolado proteico de cumaru pode ser facilmente obtido por extração alcalina seguido de precipitação isoelétrica. Apesar dos resultados positivos e muito animadores, este trabalho serviu como guia para indicar quais modificações podem ser realizadas para melhorar ainda mais o produto, como a substituição do método de obtenção do extrato proteico a partir do extrato bruto e da forma de secagem do material. Portanto, é imprescindível que a metodologia de obtenção do IPAc seja melhorada, visando aumentar seu rendimento e funcionalidade, pois se trata de um produto muito promissor e com potencial de agregar valor econômica às riquezas do bioma Caatinga.

3 - ANÁLISE TOXICOGENÔMICA IN VITRO
DE ISOLADO PROTEICO DE SEMENTES DE
***Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith**

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA / JUSTIFICATIVA

As sementes de cumaru (*Amburana cearensis*) se apresentam como candidatas a futura fonte de proteínas alimentares, devido a sua rica composição. O consumo de proteínas isoladas de fontes vegetais é cada vez mais aceito e é grande a demanda por novas proteínas que possam substituir eficientemente as proteínas animais em sistemas alimentícios. No entanto, por se tratar de uma espécie sem tradição de consumo alimentar, existe a preocupação de garantir que estas proteínas não venham a causar prejuízos à saúde do consumidor em curto ou longo prazo. Por isso, são necessários estudos que comprovem sua segurança como alimento (BRASIL, 2005; MOURE *et al.*, 2006; ASGAR *et al.*, 2010; AYDEMIR; YEMENICIOĞLU, 2013b; BRASIL, 2013; GARBA; KAUR, 2014).

Tradicionalmente, os testes toxicológicos, que fazem parte das análises de comprovação de segurança de novos alimentos, são realizados através de estudos *in vivo*, especialmente com roedores. Recentemente, avanços em biologia molecular e biotecnologia levaram ao desenvolvimento de novas abordagens para a avaliação de toxicidade em larga escala, com mais rapidez e sensibilidade, além de outras vantagens. Técnicas que permitem o estudo detalhado das proteínas, ácidos nucleicos e demais metabólitos celulares são a nova ferramenta da toxicologia moderna. Convencionou-se chamar de toxicogenômica o estudo integrado, em nível escala molecular, dos efeitos tóxicos sobre sistemas biológicos. Sustentada por três pilares: transcriptômica (análise dos transcritos de RNA), proteômica (mapeamento das proteínas expressas) e metabolômica (identificação dos metabólitos de massa molecular abaixo de 1,5 kDa), a toxicogenômica tem como principais aplicações: (i) a elucidação dos mecanismos da toxicidade, ou toxicologia preditiva; (ii) a avaliação de segurança ou de risco toxicológico e (iii) o desenvolvimento de alternativas aos testes clássicos que fazem uso de animais (NUWAYSIR *et al.*, 1999; HAYES; BRADFIELD, 2005; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007b; ARIAS; FREIRE, 2008; TONG; FANG; MENDRICK, 2009; NORTH; VULPE, 2010; HALDER, 2013; DADANNAGARI, 2014)

É previsto que o desenvolvimento da toxicogenômica também trará benefícios na área alimentar, aumentando a oferta de alimentos nutritivos e seguros ao consumo, como ressalta o Centro Holandês de Toxicogenômica (NETHERLANDS TOXICOGENOMICS CENTRE, 2014). Nesse contexto, este trabalho busca avaliar a biossegurança do isolado proteico de sementes de *Amburana cearensis* (IPAc). Para este fim, IPAc foi posto em contato com duas linhagens celulares para posterior análise do transcriptoma: Caco-2 (células epiteliais de adenocarcinoma colorretal) e MCF-7 (células epiteliais de adenocarcinoma de tecido mamário). Para comparação, foram também analisados isolados proteicos de *Glycine*

max, *Phaseolus vulgaris*, *Canavalia ensiformis* e *Ricinus communis*, além de uma fração proteica de *R. communis* rica em ricina e as lectinas ConA e PHA-E.

As análises foram conduzidas nas dependências do RIKILT – Institute of Food Safety, da Wageningen University and Research Centre (WUR), na cidade de Wageningen, Holanda.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o isolado proteico de cumaru (*Amburana cearensis*) apresenta potencial de toxicidade, comparando com proteínas de outras espécies sabidamente tóxicas, por meio da análise do transcriptoma de duas linhagens celulares humanas após contato com as proteínas em estudo.

3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir o isolado proteico teste (IPAc) e controles (IPPv, de *Phaseolus vulgaris*, IPCe de *Canavalia ensiformis*, IPGm, de *Glycine max*, IPRc e de *Ricinus communis*);
- Determinar doses sub-citotóxicas de todas as amostras às células MCF-7 e Caco-2 através de teste de viabilidade celular em microplacas e conduzir os testes de exposição nas doses determinadas;
- Amplificar, marcar, fragmentar e hibridizar o RNA isolado das células a microarranjos de DNA com o genoma humano completo;
- Escanear os microarranjos para gerar dados de intensidade de expressão;
- Agrupar hierarquicamente as vias biológicas cujos genes foram diferencialmente expressos quando comparados ao controle químico ou PBS;
- Conduzir análise funcional das vias e processos biológicos diferencialmente expressos;
- Comparar o perfil de expressão gênica das amostras com os perfis de expressão de drogas depositados em banco de dados do Mapa Conectivo.

3.3 MATERIAIS

3.3.1 Sementes e proteínas controle

As sementes de cumaru, originárias do município de Juazeiro do Norte (CE, Brasil), foram adquiridas comercialmente de habitantes locais. Para comparar o efeito das proteínas de cumaru sobre as células, os mesmos tratamentos foram também realizados com isolados proteicos de outras espécies de conhecida toxicidade e suas toxinas: (i) *Phaseolus vulgaris* (feijão comum); (ii) *Canavalia ensiformis* (feijão de porco) e (iii) *Ricinus communis* (mamona). Foi também realizada a comparação com isolado proteico de soja (*Glycine max*) produzido da mesma forma que os demais (não comercial). As sementes de feijão comum, soja, feijão de porco e mamona e foram obtidas da empresa Vreeken's Zaden (Dordrecht, Holanda). A fração proteica de mamona rica em ricina, FPRc, foi cedida pelo Laboratório de Bioprospecção de Produtos Regionais (Bioprospec), da Universidade Federal do Ceará, onde havia sido obtida como descrito em Tang *et al.* (2006). A eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) utilizada foi da marca Vector (Burlingame, CA, EUA) e a concanavalina A (Con A) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EUA).

3.3.2 Materiais para quantificação de proteínas e eletroforeses

O kit DC Protein AssayTM para quantificação fotolorimétrica de proteínas, os géis Mini-PROTEAN[®] TGXTM Precast Gels 12%, o sistema Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell e o marcador de massa molecular Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards para eletroforeses foram adquiridos comercialmente da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). A proteína utilizada como padrão para a quantificação de proteínas foi a albumina sérica bovina (BSA), adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EUA).

3.3.3 Linhagens celulares e manutenção das culturas

As células de adenocarcinoma de glândula mamária MCF-7 (NCI-PBCF-HTB22) e de adenocarcinoma de colorretal Caco-2 (NCI-PBCF-HTB37), ambas originadas de humanos, foram obtidas da ATCC (Manassas, VA, EUA). As células foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido até pelo menos duas semanas antes do experimento, quando foram descongeladas e cultivadas em frascos de cultura de células de 75 cm² (Corning, Nova Iorque, NY, EUA) contendo o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), com 4,5 g/L de glucose e com L-glutamina) (Lonza, Verviers, Bélgica). Para MCF-7, cada frasco de 500 mL de meio de cultura foi suplementado com 50 mL de soro fetal bovino (FBS)

(Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e 5 mL de penicilina-estreptomicina (10.000 unidades de penicilina e estreptomicina 10 mg/mL em NaCl 0,9%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA), sendo desde então denominado DMEM⁺⁺. Para células Caco-2, cada frasco de 500 mL de meio de cultura foi suplementado com 50 mL de FBS, 3 mL de penicilina-estreptomicina e 5 mL de solução de aminoácidos não essenciais 100x (Gibco, Carlsbad, CA, EUA), e passou a ser denominado DMEM⁺⁺⁺. As culturas foram mantidas em estufas incubadoras a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa.

3.3.4 Materiais para testes de viabilidade celular

O kit ATPlite™ para mensuração da viabilidade celular foi adquirido comercialmente da PerkinElmer (Groningen, Holanda). As placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano foram adquiridas da Costar® (Washington, DC, EUA).

3.3.5 Materiais para exposição das células MCF-7 e Caco-2 às amostras e posterior isolamento e purificação de RNA total

As placas de doze poços foram adquiridas da Costar® (Washington, DC, EUA). O isolamento e purificação do RNA foram realizados através de dois kits: RNase-Free DNase Set (50) para digestão de DNA e RNeasy Mini Kit (250) para obtenção do RNA total, ambos adquiridos comercialmente da Qiagen (Westburg bv. Leusden, Holanda). Todos os demais reagentes utilizados neste estudo foram de grau analítico.

3.4 METODOLOGIA

3.4.1 Processamento das sementes e produção de isolados proteicos

Por se tratar de uma espécie selvagem, não cultivada, as sementes de cumaru utilizadas neste capítulo foram obtidas de fonte diferente que as do capítulo anterior, contudo, a forma de obtenção de IPAc foi a mesma descrita no tópico 2.4.3 deste trabalho. As sementes das demais espécies (feijão comum, soja, feijão de porco e mamona) foram obtidas da empresa Vreeken's Zaden (Dordrecht, Holanda).

Para obtenção dos demais isolados proteicos, as sementes de mamona foram moídas em triturador Waring 8010 (Torrington, CT, EUA) e as demais (soja, feijão comum e feijão de porco) em moedor IKA A11B (Staufen, Alemanha) até obtenção de farinha fina. A farinha foi delipidada com hexano na proporção 1:3 (m/v) a frio e em repouso. Após 24 h de contato, o solvente saturado era substituído por novo. O processo foi repetido pelo menos três e no máximo seis vezes (mamona foi extraída 6 x). A produção dos isolados proteicos seguiu exatamente o mesmo protocolo de produção de IPAc. Os isolados proteicos produzidos foram denominados como descrito a seguir:

- IPAc - Isolado Proteico de cumaru (*Amburana cearensis*);
- IPGm - Isolado Proteico de soja (*Glycine max*);
- IPPv - Isolado Proteico de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*);
- IPCe - Isolado Proteico de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*);
- IPRc - Isolado Proteico de mamona (*Ricinus communis*).

A Fração Proteica de mamona foi obtida já preparada e denominada FPRc.

3.4.2 Perfil Eletroforético - eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) foram feitas não apenas para acompanhamento do perfil proteico dos isolados produzidos, mas também para a quantificação indireta de proteínas. Como os isolados proteicos não eram completamente solúveis em PBS e os ensaios fotolorimétricos de quantificação proteica forneciam resultados superestimados, a dosagem de proteínas teve que ser realizada de forma alternativa. Os isolados e FPRc foram suspensos em 500 µL de tampão fosfato-salino (PBS Tablets, Oxoid, Hampshire, Reino Unido) em quantidades não exatas (entre 50 e 200 mg). Para melhorar a solubilidade, as suspensões foram aquecidas a 37 °C por 5 min. (Thermomixer® R, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e centrifugadas (18.000 x

g, 3 min., temperatura ambiente) (Microfuge® 18 Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). O sobrenadante foi reservado e o processo foi repetido mais três vezes (400, 400 e 200 µL) com PBS. O volume total de 1,5 mL de sobrenadante de cada amostra foi então reunido. PHA-E e ConA foram solubilizadas em PBS na proporção de 3 mg/mL. As amostras foram aplicadas no gel de forma a conter 12 µg de proteínas, quando a determinação das proteínas solúveis nas soluções foi realizada por fotolorimetria (LOWRY *et al.*, 1951), ou 10 µg de proteínas, após quantificação indireta por gel. O marcador de massa molecular foi aplicado no volume de 4 µg/L.

3.4.3 Quantificação indireta de proteínas

Para contornar os problemas de quantificação das proteínas por fotolorimetria, a concentração proteica nas soluções dos isolados proteicos foi determinada de forma indireta. Inicialmente, géis contendo as amostras (12 µg de proteínas, fotolorimetricamente) e BSA em concentrações crescentes (0,1; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 32 µg/5 µL) foram produzidos. Os géis foram escaneados para mensuração dos pixels, utilizando o sistema de imagem em infravermelho Odyssey® (Li-Cor®, Lincoln, NE, EUA). Uma curva de calibração foi produzida correlacionando as concentrações de BSA no gel com os pixels na imagem escaneada. A quantidade de proteínas nas amostras foi calculada aplicando os pixels da imagem na curva de BSA gerada. Foi então estabelecido um fator de correção entre a concentração proteica que fora obtida por fotolorimetria e a concentração obtida a partir da aplicação dos pixels na curva de calibração.

3.4.4 Preparo de soluções das amostras em diferentes doses para teste de viabilidade celular e de exposição

As soluções das amostras foram preparadas como descrito no tópico 3.4.2. Para os testes de viabilidade celular e de exposição, foram preparadas soluções de concentração sete vezes maior que a desejada. Isso porque o meio de cultura já presente no poço diluiria a amostra 7x após a aplicação. Foram preparadas soluções para uma dose final de 50 e 100 µg/mL para as amostras IPAc, IPGm, IPPv, IPCe, PHA-E e ConA. Para IPRc e FPRc, além das concentrações já mencionadas, foi também preparada a concentração de 10 µg/mL. Como controle, tanto para o ensaio de viabilidade celular quanto para os teste de exposição, foi preparado um controle químico (Ctrl_Quim), com o objetivo de descobrir qualquer interferência decorrente dos reagentes ou dos procedimentos utilizados na preparação das amostras. Para prepará-lo, foi realizada uma simulação de tudo que seria realizado para a

produção de um isolado proteico a partir de 15 g de uma farinha delipidada qualquer. Primeiro, foi colocado para evaporar em 135 mL de hexano, em seguida realizada a extração da mesma forma que para as demais amostras, passando por todas as etapas: centrifugações, ajustes de pH, diálise e liofilização. O resultado final foi um frasco aparentemente vazio, no qual foi adicionado 10 mL de PBS e denominado Controle Químico (Ctrl_Quim).

3.4.5 Teste de viabilidade celular

Para determinar a dose na qual as amostras seriam aplicadas sobre as células no ensaio de exposição, foi realizado o ensaio de viabilidade celular. As células foram expostas a diferentes concentrações das proteínas e após 24 h a viabilidade celular foi determinada utilizando o kit ATP-Lite™. O ensaio detectou a luminescência emitida quando o ATP das células metabolicamente ativas forneceu a energia necessária para a enzima luciferase converter luciferina em oxiluciferina.

Células de MCF-7 (número de passagem 12 a 18) e Caco-2 (número de passagem 36 a 44), ambas indiferenciadas, foram tratadas com tripsina, contadas em câmara de Neubauer e ressuspensas em seus respectivos meios de cultura. A concentração final para MCF-7 e Caco-2 foi de 15.000 e 9.000 células/poço, respectivamente. Placas de microtitulação de 96 poços foram semeadas com 100 µL da suspensão celular e, em seguida, incubadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa. Após 72 h, 17 µL de cada diluição das amostras foram adicionados cuidadosamente sobre as células perfazendo um volume final de 117 µL em cada poço. Foram realizados controles nas mesmas condições, onde somente o veículo PBS ou somente o controle químico foi adicionado às células.

Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi renovado (100 µL) e foram adicionados 50 µL de solução de lise de células de mamíferos (conteúdo do kit ATP-Lite™) em cada poço. As placas foram agitadas durante 5 min a 800 rpm utilizando um agitador de placas (Microtitre plate shaker - SSM5, Stuart Equipment, Staffordshire, Reino Unido). Foram então adicionados 50 µL de solução de substrato (conteúdo do kit ATP-Lite™) e as placas foram novamente agitadas nas mesmas condições anteriores. Ao término da agitação, as placas foram protegidas da luz, por 10 min e levadas ao leitor de microplacas (BIO-TEK Synergy HT, Winooski, VT, EUA) para medição da luminescência. Para ambas as linhagens celulares testadas, cada concentração de cada amostra foi testada em triplicata e os controles PBS e Ctrl_Quim em sextuplicata.

A concentração subcitotóxica deve causar mortalidade a, no máximo, 20% das células expostas. Isto por que desta forma é possível identificar os primeiros genes que foram expressos diferencialmente em resposta a um composto exógeno.

3.4.6 Ensaio de exposição de células MCF-7 e Caco-2 às proteínas teste para análise do perfil de expressão gênica

Para cada uma das linhagens, as células foram semeadas de forma que cada um dos 12 poços da placa contivesse 100.000 ou 60.000 células suspensas em 1,6 mL de meio de cultura DMEM⁺⁺ ou DMEM⁺⁺⁺, para MCF-7 e Caco-2, respectivamente. Após 24 h, foram removidos 0,9 mL do meio de cultura e 48 h após as células terem sido semeadas, o meio restante foi substituído por 0,7 mL de meio novo. As amostras foram postas em contato com as células, em doses sub-citotóxicas determinadas após ensaio de viabilidade celular, 72 h após o início do experimento, quando estas ocupavam entre 50 a 70% da área dos poços. Isto para garantir que haveria espaço para que as células crescessem no caso de ausência de toxicidade. Após 24 h de exposição, em ambiente livre de RNA, os meios foram removidos e as células foram delicadamente lavadas com 400 µL de PBS gelado (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) para remover completamente o meio de cultura. As células foram lisadas em seguida com 240 µL do tampão de lise contido no kit RNeasy, adicionado de 10% de beta-mercaptoetanol. Este tampão é altamente desnaturante por conter tiocianato de guanidina, o que inativa imediatamente as RNases e garante a purificação de RNA intacto. O lisado celular obtido foi transferido para tubos de microcentrífuga e armazenado a -80 °C até o momento da extração do RNA total. As exposições das células de ambas as linhagens às amostras foram realizadas triplicatas, com exceção das exposições conduzidas com os controles (PBS e Ctrl_Quim), as quais foram feitas em sextuplicatas.

3.4.7 Isolamento, purificação, quantificação e pureza das amostras de RNA total

Os lisados das células MCF-7 e Caco-2, obtidos como descrito no item anterior, foram utilizados para o isolamento do RNA total. De modo geral, o procedimento envolveu várias etapas de lavagens (com tampões específicos e etanol) e centrifugações para forçar a passagem através de micro colunas, onde o RNA se liga por afinidade. Antes de ter o RNA isolado, o material foi passado através de colunas QIAshredder (contidas no kit RNeasy), visando homogeneizá-lo e reduzir sua viscosidade, e tratado com RNase-Free DNase Set para inativação do DNA. Em seguida, o procedimento de isolamento do RNA total prosseguiu como nas instruções do fabricante. O volume de 1,5 µL foi retirado de cada lisado celular e

conduzido para leitura em um espectrofotômetro do tipo NanoDrop (Wilmington, NC, EUA) para dosagem da concentração de RNA.

3.4.8 Hibridizações em microarranjos de DNA

As amostras de RNA total (100 ng/ μ L) foram mantidas em gelo seco e enviadas congeladas, num volume total de 15 μ L, à companhia ServiceXS (Leiden, Holanda). Nesta empresa, foi utilizado o kit Ambion[®] WT Expression (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para amplificar o RNA total (100 ng) e gerar sequências-senso de DNA complementar (cDNA). A partir dele, o cRNA foi replicado para posterior marcação da extremidade 3' com o kit Affymetrix GeneChip[®] WT Terminal Labeling e fragmentação. Esses kits foram especificamente desenvolvidos para o uso com microarranjos Affymetrix GeneChip[®] Sense Target (ST) com genes humanos, de ratos ou de camundongos. Neste estudo foram utilizados microarroatos de DNA do genoma humano completo, contendo 19.732 genes (Genechip[®] Human Gene 1.1 ST, Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA). Todas as etapas realizadas na companhia ServiceXS foram conduzidas de acordo com instruções dos fabricantes.

3.4.9 Controle de qualidade e normalização dos dados dos microarranjos

Os dados dos microarranjos foram submetidos a controle de qualidade para atender a critérios internos do grupo de pesquisa, previamente estabelecidos pela equipe. Posteriormente, os dados foram normalizados por transformação estabilizadora da variância com MADMAX (LIN *et al.*, 2011). Para análise mais aprofundada, uma anotação personalizada foi utilizada com base em sondas de oligonucleotídeos reorganizados, que combina todas as sondas individuais para um gene (DAI *et al.*, 2005). Apenas os genes que apresentaram pelo menos 5 sondas presentes no microarranjo foram consideradas. Os valores de expressão dos genes foram calculados usando o método de média robusta do multichip (RMA, do inglês 'robust multichip average'), que inclui a normalização por quantil (BOLSTAD *et al.*, 2003). Os genes foram nivelados de forma a eliminar os que apresentassem intensidade inferior a 60 (40% dos genes). Em seguida, foi calculado o logaritmo na base 2 (log2) para cada arranjo zerado com a média da intensidade da expressão do tratamento somente com o controle químico (Ctrl_Quim) ou com PBS.

3.4.10 Interpretação biológica

3.4.10.1 Agrupamento hierárquico e análise de vias biológicas

Os dados dos microarranjos foram hierarquicamente agrupados usando os programas Cluster (correlação descentralizada, agrupamento por ligação de médias) e Treeview (EISEN *et al.*, 1998).

3.4.10.2 Análises funcionais dos genes com expressão diferenciada

O MetaCore, uma plataforma virtual para análise funcional e biológica dos dados de expressão gênica, foi utilizado para análise das vias e processos biológicos afetados em cada sub-grupo do mapa gráfico de expressão (*heat map*) do agrupamento hierárquico. A super-representação de genes de vias de sinalização e vias metabólicas foi avaliada pela distribuição hipergeométrica (EKINS *et al.*, 2006). As vias biológicas com valor $p < 10^{-5}$ foram consideradas significantes.

3.4.10.3 Análises de Mapa Conectivo (Connectivity Map analysis) dos dados dos microarranjos

A natureza dos processos e das vias afetadas pelas proteínas foi avaliada por meio do banco de dados e algoritmo de busca Mapa Conectivo (*Connectivity Map database*) (LAMB *et al.*, 2006; LAMB, 2007). O conjunto de alterações na expressão de uma determinada linhagem celular em resposta a um exógeno específico é denominado de assinatura de expressão. Usando o Mapa Conectivo, foi feita uma busca de similaridade entre as assinaturas de expressão gênica obtidas após a exposição das células MCF-7 às proteínas testadas e as assinaturas em resposta a compostos conhecidos, cujo mecanismo de ação é bem estabelecido. O banco de dados contém informações obtidas principalmente a partir da linhagem celular MCF-7, por isso apenas as respostas desta linhagem foi analisada através desta ferramenta. A similaridade entre as assinaturas é classificada de acordo com um escore de conectividade, dando o grau de semelhança das amostras a diversos compostos. Para tal fim, as identidades específicas na plataforma Illumina (Illumina IDs) dos genes significativamente regulados para cima ou para baixo em cada grupo foram primeiramente convertidos em identidades da plataforma Affymetrix U133A IDs, utilizando o programa Martview (<http://www.biomart.org/biomart/martview/>) e, posteriormente, foram baixados para o Mapa Conectivo (<http://www.broad.mit.edu/cmap/>).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

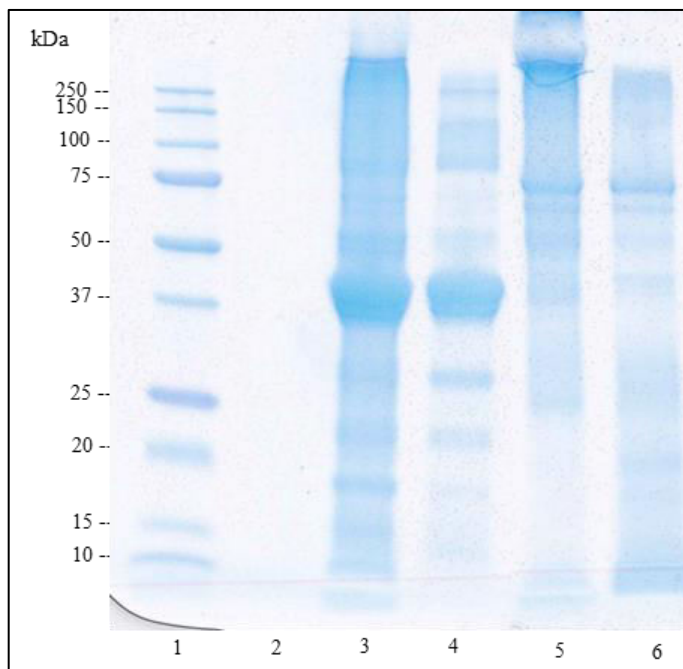
3.5.1 Produção de isolados proteicos

IPAc, IPGm, IPPv, IPCe e IPRc foram produzidos por extração proteica em solução NaCl 0,5 M, pH 9, seguido de precipitação isoelétrica em pH 3,5. Após serem recuperadas por centrifugação, as proteínas foram dialisadas e liofilizadas. As diferentes espécies resultaram em isolados de aspectos diversos quanto à cor, textura e densidade. Com exceção de IPAc, que era de cor marrom, os demais isolados apresentaram coloração clara, entre branco e levemente amarelado. O IPRc era o menos denso, com aspecto esponjoso, enquanto o IPCe aparentava ser mais compactado. O rendimento na produção dos isolados proteicos também foi variado, mas baixo de forma geral. O rendimento bruto (g IP / g farinha delipidada) foi de 4,4% para IPAc, 8,1% para IPGm; 3% para IPPv; 2,6% para IPCe e 7,1% para IPRc. O rendimento bruto da produção de IPAc foi inferior ao obido na outra etapa do trabalho (5,3%), mas considerando que as sementes tiveram diferentes origens, esta diferença não é tão expressiva.

3.5.2 Quantificação de proteínas e eletroforeses

Em diferentes níveis, todos os isolados proteicos apresentaram dificuldades de solubilização em PBS (pH 7,4), mesmo após aquecimento e ciclos de solubilização e centrifugação. Esses problemas fizeram com que o trabalho prosseguisse utilizando apenas os sobrenadantes após centrifugações. Para garantir que a porção solúvel era representativa das amostras totais, foram preparados géis para comparar o perfil proteico da amostra total, do sobrenadante e do resíduo das centrifugações. O resultado (ilustrado apenas para IPPv) pode ser observado na Figura 9. Além disso, a quantificação fotocolorimétrica foi problemática para a maioria das amostras através do kit DC Assay (BioRad) que utiliza a metodologia de Lowry e colaboradores (1951), superestimando as proteínas presentes. Por várias vezes, as amostras para eletroforese eram preparadas de forma que todas as raias do gel contivessem a mesma quantidade de proteínas com base nesse ensaio. No entanto, claramente se percebia nos géis que as raias tinham diferentes quantidades de proteínas (dados não mostrados). Outras formas de quantificação também foram testadas, como o método de Bradford (1976) e leitura de absorbâncias no comprimento de ondas de 280 nm, todos sem sucesso. Lindeboom e Wanasundara (2007) compararam a quantificação de proteínas de extratos de sementes de *Brassica napus*, *B. rapa* e *Sinapis alba* por dois métodos: Lowry (detecta aminoácidos

Figura 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando o perfil proteico semelhante da suspensão, sobrenadante e resíduo do IPPv e sua baixa solubilidade



FONTE: Elaborada pelo autor;

1: Marcador de massa molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad (4 µL); 2: Tampão fosfato-salino (PBS, Tablets, Oxoid); 3, 4, 5: IPPv - Isolado proteico de *Phaseolus vulgaris* (suspensão, sobrenadante e resíduo, respectivamente);

O isolado foi obtido por precipitação isoeletrica em pH 3,5. A linha 4 contém 25 µg de proteínas (DC Protein Assay™, BioRad). As linha 3 e 5 receberam o mesmo volume (7,2 µL).

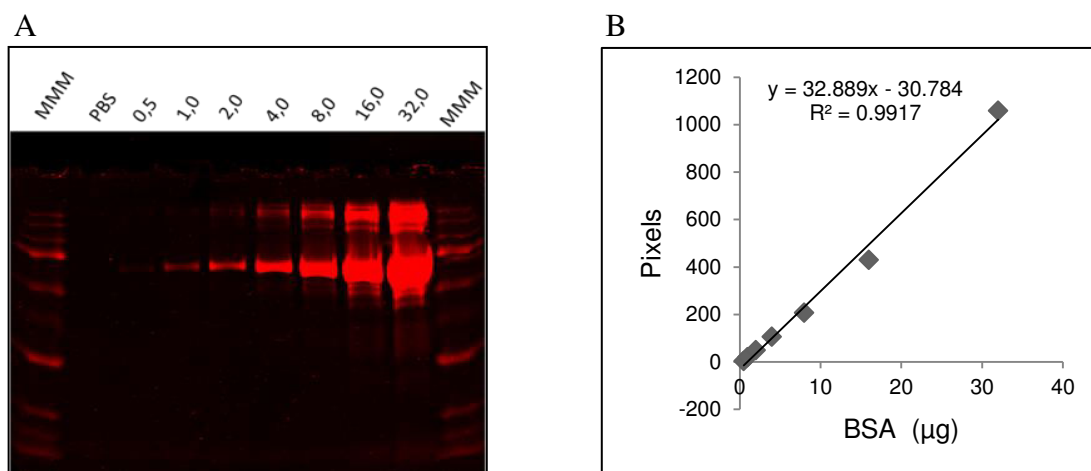
aromáticos em solução) e Kjeldahl (quantificação de nitrogênio total) e encontraram valores mais altos para o primeiro. Eles atribuíram o resultado à presença de compostos fenólicos nos extratos, o que pode ser o caso dos isolados proteicos deste trabalho, pois se sabe que é comum a presença destes compostos em sementes de leguminosas, sendo eles os principais responsáveis pela atividade antioxidante nessas sementes. Apesar das amostras terem sido dialisadas, é possível que haja compostos fenólicos que permaneceram nos isolados proteicos ligados às proteínas (AMAROWICZ; PEGG, 2008; AYDEMIR; YEMENICIOĞLU, 2013a).

As proteínas presentes nos sobrenadantes das amostras foram então quantificadas indiretamente a partir da medição dos pixels da imagem digitalizada de géis de eletroforese em poliacrilamida. Foi observada forte correlação entre as concentrações de BSA (0,1; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 32 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) e os pixels de cada raia do gel, fornecidos pelo sistema de imagem em infravermelho Odyssey[®] (Figura 10). Este resultado mostrou que era possível quantificar as proteínas utilizando concentrações conhecidas de uma proteína padrão, BSA no caso, para produzir uma curva de calibração. Utilizando este conceito, as amostras foram corridas em géis junto com 3 diferentes concentrações de BSA (5, 10 e 15 $\mu\text{g}/\text{raia}$) (Figura 11). Após escanear os géis, o número de pixels em cada raia contendo amostra foi aplicado na curva de calibração do mesmo gel para determinar a concentração proteica (teor proteico de acordo com o gel). Assim, foi estabelecida uma relação entre a concentração proteica determinada por Lowry e a quantidade de proteínas contida no poço, calculada através da curva de calibração. Como o volume aplicado era conhecido, foi possível calcular a real concentração das amostras aplicadas. De acordo com o método fotolorimétrico, todas as raias continham 10 μg de proteínas, mas após a nova quantificação através da quantidades de pixels, foi verificado que a quantidade de proteínas aplicada fora 6,2 (IPAc); 11,4 (IPGm); 16,1 (IPRc); 8,8 (IPV); 12,9 (PHA-E); 4,4 (IPCe); 12,1 (ConA) e 8,6 $\mu\text{g}/\text{raia}$ (FPRc).

3.5.3 Teste de viabilidade celular

Um primeiro teste de viabilidade celular (24 h) havia sido realizado, quando as duas linhagens foram expostas a doses das amostras que variaram de 10 a mais de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (dados não apresentados). Nenhuma amostra se mostrou citotóxica (< 80% de viabilidade) quando aplicadas em doses até 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para as duas linhagens (MCF-7 e Caco-2). Um segundo teste foi realizado paralelamente ao ensaio de exposição e os resultados foram divergentes do primeiro, pois PHA-E, ConA, IPCe, IPRc e FPRc se mostraram tóxicas (< 80% de viabilidade) a células MCF-7 nas doses de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gráfico 3 A). A exposição

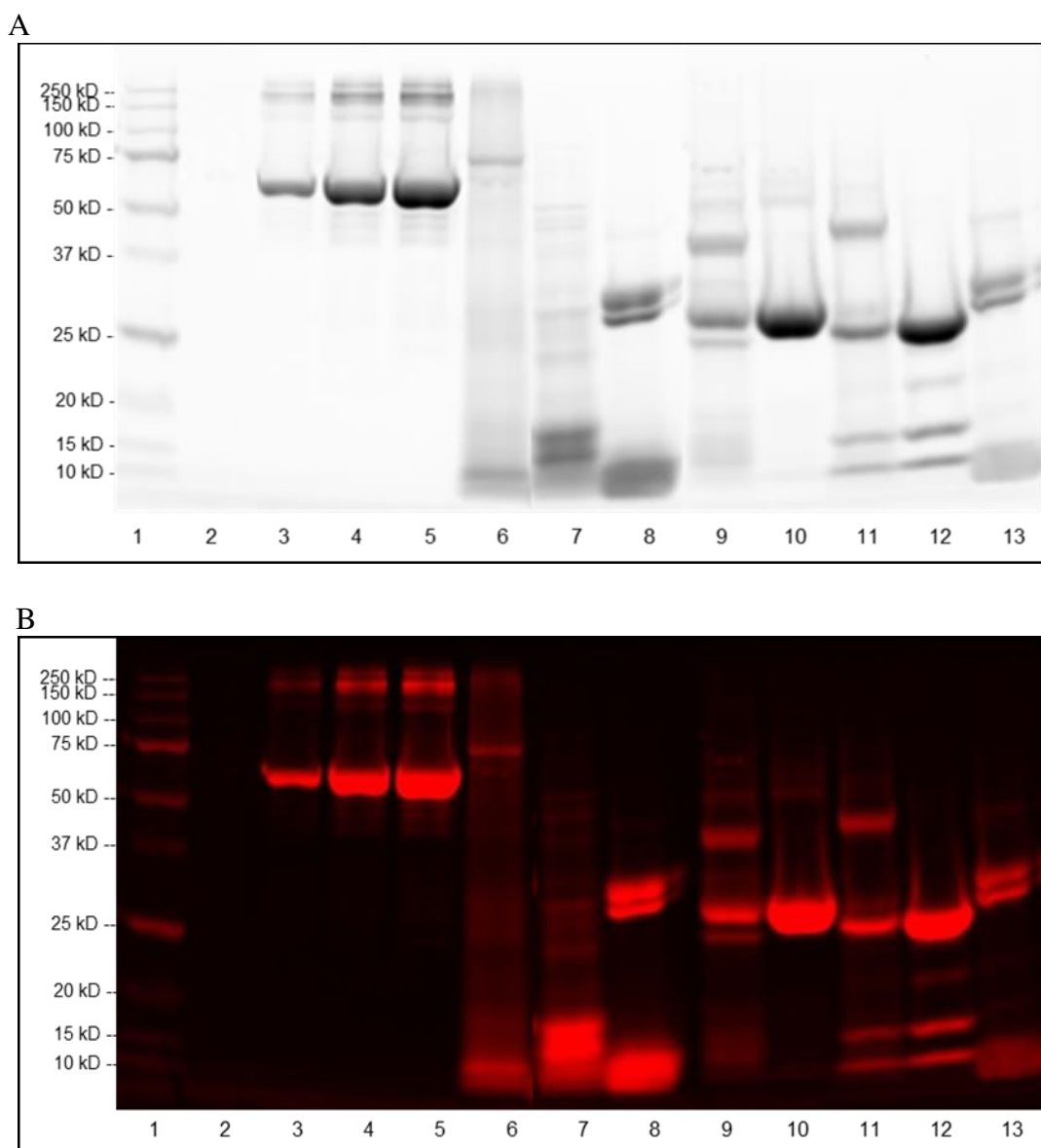
Figura 10 - Imagem digitalizada de gel de poliacrilamida com curva de calibração de BSA (A) e gráfico mostrando alta correlação entre a quantidade de proteína em cada raia e a quantidade de pixels medida em sistema de imagem em infravermelho (B)



FONTE: Elaborada pelo autor;

MMM: Marcador de massa molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards para eletroforeses (Bio-Rad); PBS: tampão fosfato-salino (Tablets, Oxoid); BSA: Albumina sérica bovina; Concentrações proteicas calculadas de acordo com quantificação fotolorimétrica (DC Protein Assay™, BioRad). Foram aplicados 5 µL de solução de BSA + 5 µL de tampão de amostra; Imagem produzida em sistema de imagem em infravermelho Odyssey® 3.0 (Li-Cor®).

Figura 11 – Imagem escaneada de gel¹ de poliacrilamida com raias contendo 3 concentrações de BSA para calibração e as amostras a serem quantificadas. A: apresentação em escala de cinza e B: apresentação colorida



FONTE: Elaborada pelo autor;

¹ Imagem digitalmente combinada de dois géis independentes;

Raias: 1: Marcador de massa molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards para eletroforeses (Bio-Rad); 2: tampão fosfato-salino (PBS Tablets, Oxoid); 3, 4 e 5: BSA preparado em PBS (5, 10 e 15 µg por linha, respectivamente); 6: IPAc; 7: IPGm; 8: IPRc; 9: IPPv; 10: PHA-E; 11: IPCe; 12: ConA; 13: FPRc;

Cada raia (de 6 a 13) foi calculada par conter 10 µg/raia de acordo com quantificação fotocolorimétrica (DC Protein Assay™, BioRad). Foram aplicados 5 µL de solução de BSA + 5 µL de tampão de amostra;

Imagem produzida em sistema de imagem em infravermelho Odyssey® 3.0 (Li-Cor®).

das células Caco-2 às amostras não levou a toxicidade em nenhuma das doses analisadas (Gráfico 3 B).

3.5.4 Hibridização aos microarranjos

Após a exposição das células das linhagens de adenocarcinoma de glândula mamária MCF-7 e de adenocarcinoma colorretal Caco-2 às amostras, o RNA foi isolado para análise do perfil de expressão utilizando microarranjos com o genoma humano completo (Affymetrix GeneChip[®] ST). Considerando (i) o caráter experimental do estudo, (ii) os diversos problemas enfrentados na solubilização das amostras e quantificação proteica, (iii) aliado ao elevado custo destas análises, foram hibridizadas inicialmente apenas 14 amostras de RNA somente das células MCF-7 para uma visão geral da adequabilidade do material. A análise do restante das amostras ficaria condicionada aos resultados observados nesta primeira análise. As amostras utilizadas para esta primeira hibridização e seu respectivo rendimento de RNA (ng/μl) estão mostrados no Gráfico 4. A exposição das células MCF-7 a FPRc e a IPRc (ambas na dose 50 μg/ml) reduziu drasticamente o rendimento de RNA quando comparado a PBS. Também foi observada a redução de rendimento de RNA para as células expostas ao controle químico (Ctrl_Quim). IPAc e IPGm (ambas na dose 100 μg/ml) também provocaram diminuição do rendimento de RNA das células expostas.

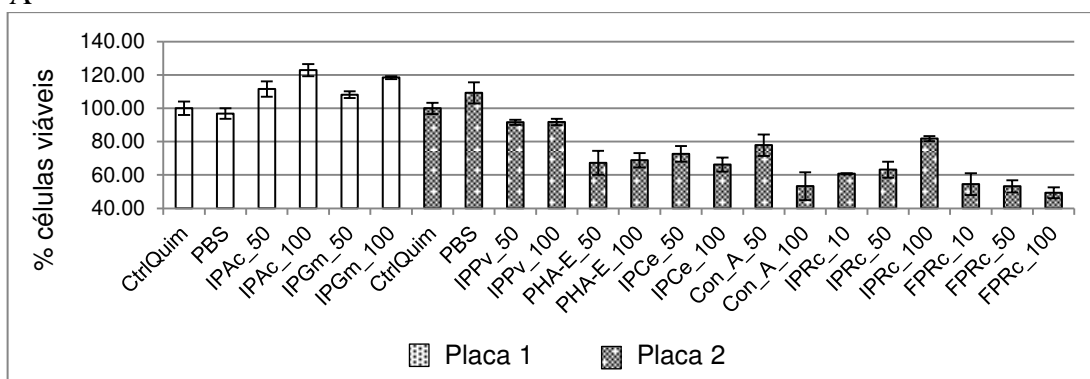
3.5.5 Agrupamento hierárquico e análise de vias biológicas

Após o processamento dos dados brutos dos microarranjos, foi verificado um total de 2810 e 3618 genes diferencialmente afetados, isto é, mais que 2 vezes mais ou menos expressos ($> 2,0$), em pelo menos uma das amostras analisadas, quando comparado com o controle químico e com o PBS, respectivamente. Esta etapa foi realizada apenas com as 14 amostras selecionadas para as análises iniciais.

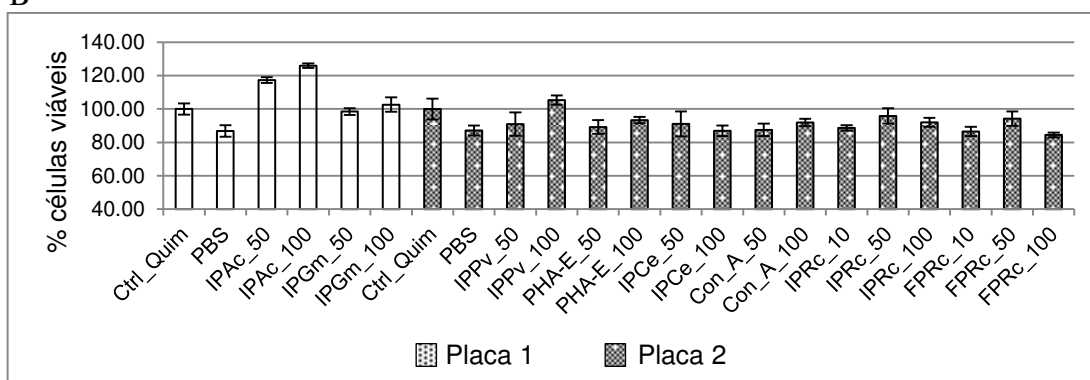
O agrupamento hierárquico supervisionado foi realizado inicialmente para os 2810 genes diferencialmente expressos em relação ao controle químico após exposição das células MCF-7 por 24 h. Como pode ser visto na Figura 12 A, a maioria dos tratamentos resultou em perfis de expressão gênica genéricos e similares entre si. IPRc e FPRc foram os únicos que geraram perfis diferentes dos demais. A surpresa veio da expressão gerada pela exposição ao PBS, que preocupantemente apresentou o mesmo padrão genérico que a maioria das amostras, quando o esperado era que tivesse nenhum efeito por se tratar apenas do veículo. Devido a este resultado inesperado, foi realizado também o agrupamento hierárquico com a expressão das amostras contra o PBS (3618 genes), gerando o mapa gráfico de

Gráfico 3 – Efeito das amostras testadas em diferentes doses sobre a viabilidade de células MCF-7 (A), e Caco-2 (B), após 24 h

A



B



FONTE: Elaborada pelo autor;

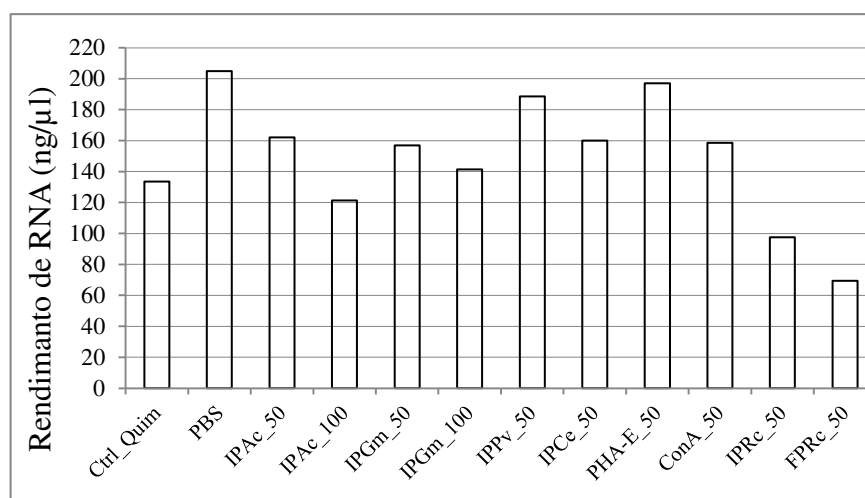
Teste realizado em microplacas de 96 poços e viabilidade celular mensurada por luminescência através do kit ATP-Lite™;

Ctrl_Quim: Controle químico; PBS: tampão fosfato-salino; IPAc: Isolado Proteico de *Amburana cearensis*; IPGm: Isolado Proteico de *Glycine max*; IPPv: Isolado Proteico de *Phaseolus vulgaris*; PHA-E: Eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris*; IPCe: Isolado Proteico de *Canavalia ensiformis*; Con_A: Concanavalina A; IPRc: Isolado Proteico de *Ricinus communis*; FPRc: Fração Proteica de *Ricinus communis*;

_10, _50 e _100: concentração da amostra de 10, 50 e 100 µg/mL, respectivamente;

Resultados são médias ± desvio padrão de triplicatas. Controle químico (Ctrl_Quim) foi assumido como 100%.

Gráfico 4 – Rendimento de RNA (ng/μl) isolado de células MCF-7 expostas às amostras selecionadas para posterior hibridização¹ e análise do perfil de expressão gênica



FONTE: Elaborada pelo autor;

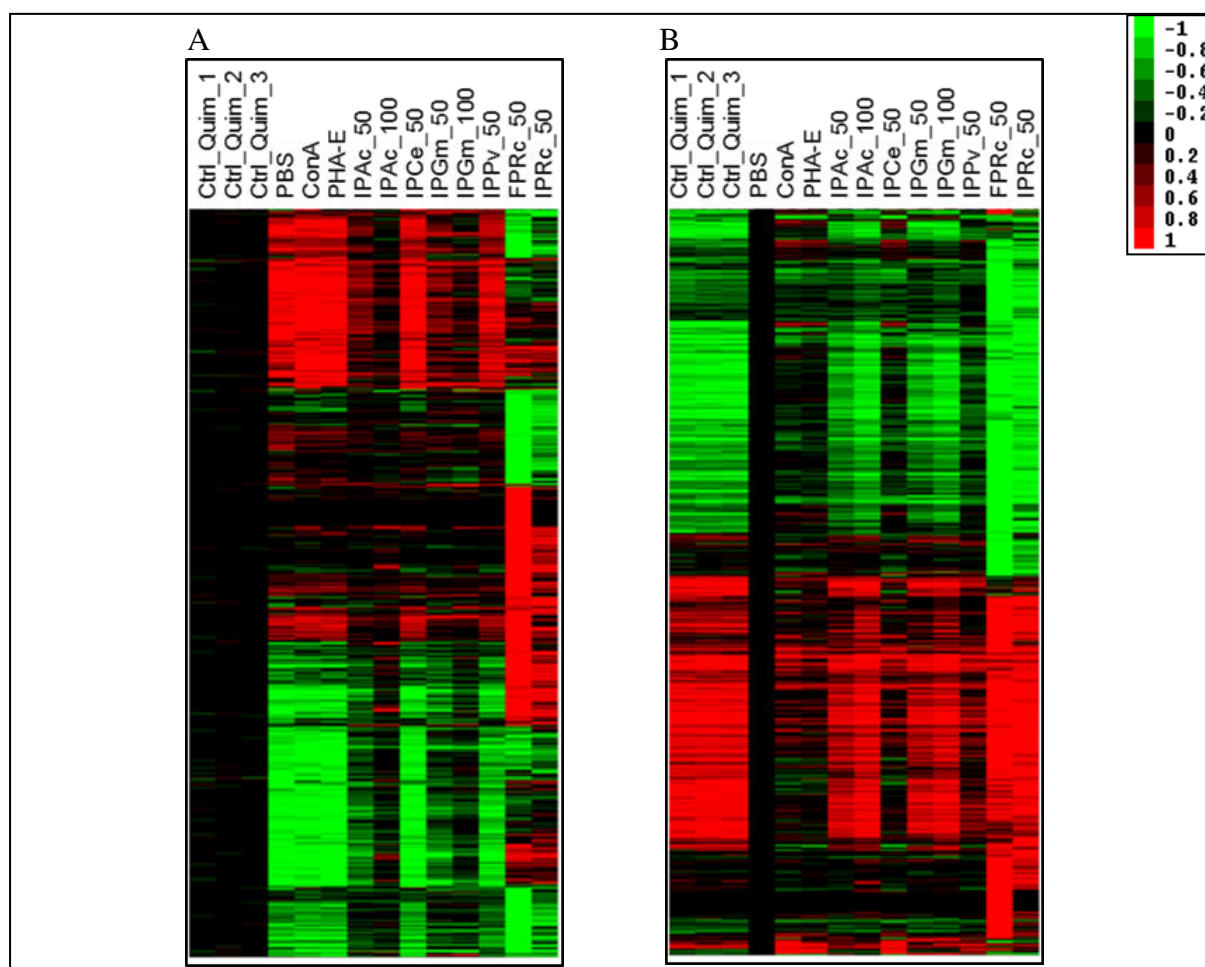
¹ Hibridização em microchips com o genoma humano completo (Affymetrix GeneChip® ST);

Ctrl_Quim: Controle químico; PBS: tampão fosfato-salino; IPAc: Isolado Proteico de *Amburana cearensis*; IPGm: Isolado Proteico de *Glycine max*; IPPv: Isolado Proteico de *Phaseolus vulgaris*; PHA-E: Eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris*; IPCe: Isolado Proteico de *Canavalia ensiformis*; Con_A: Concanavalina A; IPRc: Isolado Proteico de *Ricinus communis*; FPRc: Fração Proteica de *Ricinus communis*; _10, _50 e _100: concentração da amostra de 10, 50 e 100 μg/mL, respectivamente.

expressão (*heat map*) mostrado na Figura 12 B. Esta imagem mostra que controle químico (Ctrl_Quim) interferiu grandemente no perfil de expressão (912 dos 3618 genes) e afetou profundamente o perfil de expressão das amostras em um padrão mais ou menos compartilhado por todas as amostras, inclusive por IPRc e FPRc. Interessante notar que as amostras que tiveram maior grau de semelhança com o perfil de Ctrl_Quim foram IPAc e IPGm (sendo $50 \mu\text{g/mL} < 100 \mu\text{g/mL}$), justamente as que, por apresentarem baixa solubilidade e menor concentração proteica nas soluções preparadas, foram menos diluídas com PBS, tendo em sua composição maior razão Ctrl_Quim:PBS. Paralelamente, as amostras que tiveram mais PBS adicionado no preparo das doses foram as que menor se assemelharam ao perfil de expressão de Ctrl_Quim (PHA-E, ConA, IPPv_50 e IPCe_50), além do próprio PBS. Isto indica que, ao remover qualquer interferência provocada pelo veículo, as amostras provocaram respostas geralmente muito semelhantes às provocadas pelo controle químico, o que pode estar apontando para problemas originados na forma de obtenção dos isolados proteicos, e não nas proteínas em si.

Visando esclarecer o que causava o efeito do controle químico, foi ainda realizado o agrupamento hierárquico apenas com os 912 genes por ele afetados numa intensidade maior que 2 vezes (média de 3 microarranjos) para mais ou para menos, quando comparado com PBS (Figura 12 C). Neste *heat map* a relação entre a proporção Ctrl_Quim:PBS e a semelhança com o perfil de expressão do Ctrl_Quim fica ainda mais evidente. Dois grandes grupos principais podem ser observados, um de genes super- e outro de genes subexpressos. A ferramenta MetaCore foi utilizada para identificar em quais vias ou processos biológicos os genes mais representativos de cada grupamento estão envolvidos. A análise do grupo de genes subexpressos revelou que a exposição ao controle químico provocou a menor expressão de genes envolvidos com processos metabólicos relacionados com (fosfo) lipídeos, e com a via da fosfatidilcolina (o mais abundante fosfolipídeo das membranas celulares) especialmente. Vias relacionadas à adesão celular e ligação do íon cálcio também foram subexpressas, o que também pode indicar alterações na superfície da célula, pois o cálcio livre no interior da célula (Ca^{2+}) atua como segundo mensageiro em processos mediados por moléculas de adesão celular dependentes de cálcio, especialmente as caderinas. Entre os processos superexpressos estão apoptose mediada por proteína quinase ativada por RNA (PKR), resposta imune e sinalização do factor nuclear kappa B (NF-kB). Estes processos estão todos interligados, uma vez que a ativação da PKR leva à indução da apoptose. Por sua vez, a ativação do NF-kB estimula a apoptose induzida por PKR (GIL; ALCAMÍ; ESTEBAN, 1999; SHENG; LESHCHYNS'KA; SYTNYK, 2013).

Figura 12 – *Heat-maps* mostrando agrupamento hierárquico supervisionado dos genes diferencialmente expressos¹ por células MCF-7 expostas por 24 h a diferentes amostras. A) 2810 genes regulados pelas amostras quando comparados à média dos três controles químicos; B) 3618 genes regulados pelas amostras quando comparados ao PBS; C) 912 genes regulados pelo controle químico (média de 3 microarranjos) quando comparados ao PBS; Vias ou processos biológicos para os quais os genes super- (n=579) ou subexpressos (n=333) são mais representativos, de acordo com o indicado pela análise com a ferramenta MetaCore (CONTINUA)



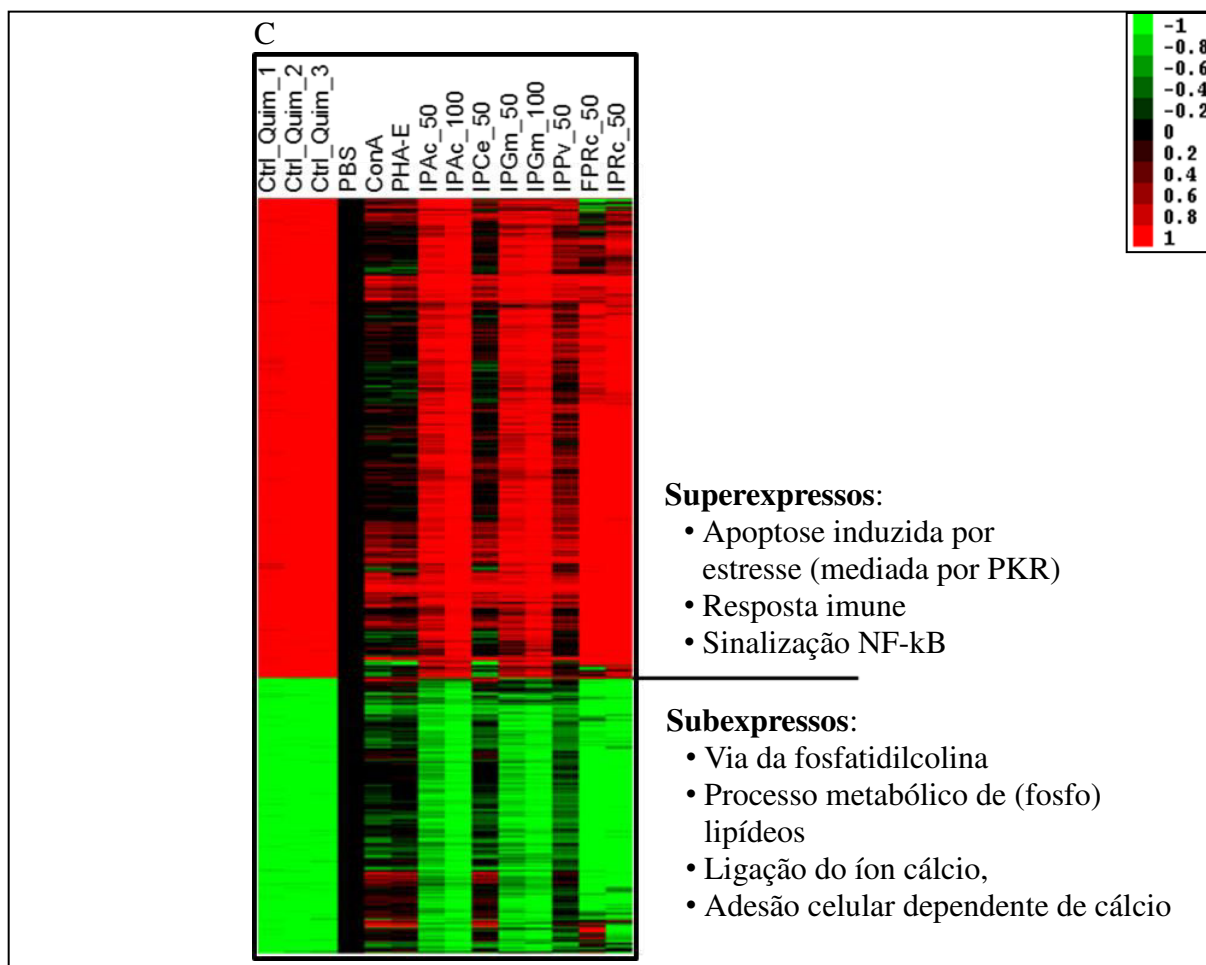
FONTE: Elaborada pelo autor;

¹ Mais que 2 vezes regulados para mais ou para menos;

Ctrl_Quim: Controle químico; PBS: tampão fosfato-salino; IPAc: Isolado Proteico de *Amburana cearensis* (50 e 100 µg/mL); IPGm: Isolado Proteico de *Glycine max* (50 e 100 µg/mL); IPPv: Isolado Proteico de *Phaseolus vulgaris* (50 µg/mL); PHA-E: Eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (50 µg/mL); IPCe: Isolado Proteico de *Canavalia ensiformis* (50 µg/mL); Con_A: Concanavalina A (50 µg/mL); IPRc: Isolado Proteico de *Ricinus communis* (50 µg/mL); FPRc: Fração Proteica de *Ricinus communis* (50 µg/mL);

Verde indica sub- e vermelho superexpressão; preto indica nenhuma alteração. A correspondência entre a intensidade da cor relativa e a proporção de 2log de regulação para mais ou para menos é indicada pela barra no canto superior direito.

Figura 12 – (CONTINUAÇÃO) *Heat-maps* mostrando agrupamento hierárquico supervisionado dos genes diferencialmente expressos¹ por células MCF-7 expostas por 24 h a diferentes amostras. A) 2810 genes regulados pelas amostras quando comparados à média dos três controles químicos; B) 3618 genes regulados pelas amostras quando comparados ao PBS; C) 912 genes regulados pelo controle químico (média de 3 microarranjos) quando comparados ao PBS; Vias ou processos biológicos para os quais os genes super- (n=579) ou subexpressos (n=333) são mais representativos, de acordo com o indicado pela análise com a ferramenta MetaCore



FONTE: Elaborada pelo autor;

¹ Mais que 2 vezes regulados para mais ou para menos;

Ctrl_Quim: Controle químico; PBS: tampão fosfato-salino; IPAc: Isolado Proteico de *Amburana cearensis* (50 e 100 µg/mL); IPGm: Isolado Proteico de *Glycine max* (50 e 100 µg/mL); IPPv: Isolado Proteico de *Phaseolus vulgaris* (50 µg/mL); PHA-E: Eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (50 µg/mL); IPCe: Isolado Proteico de *Canavalia ensiformis* (50 µg/mL); Con_A: Concanavalina A (50 µg/mL); IPRc: Isolado Proteico de *Ricinus communis* (50 µg/mL); FPRc: Fração Proteica de *Ricinus communis* (50 µg/mL);

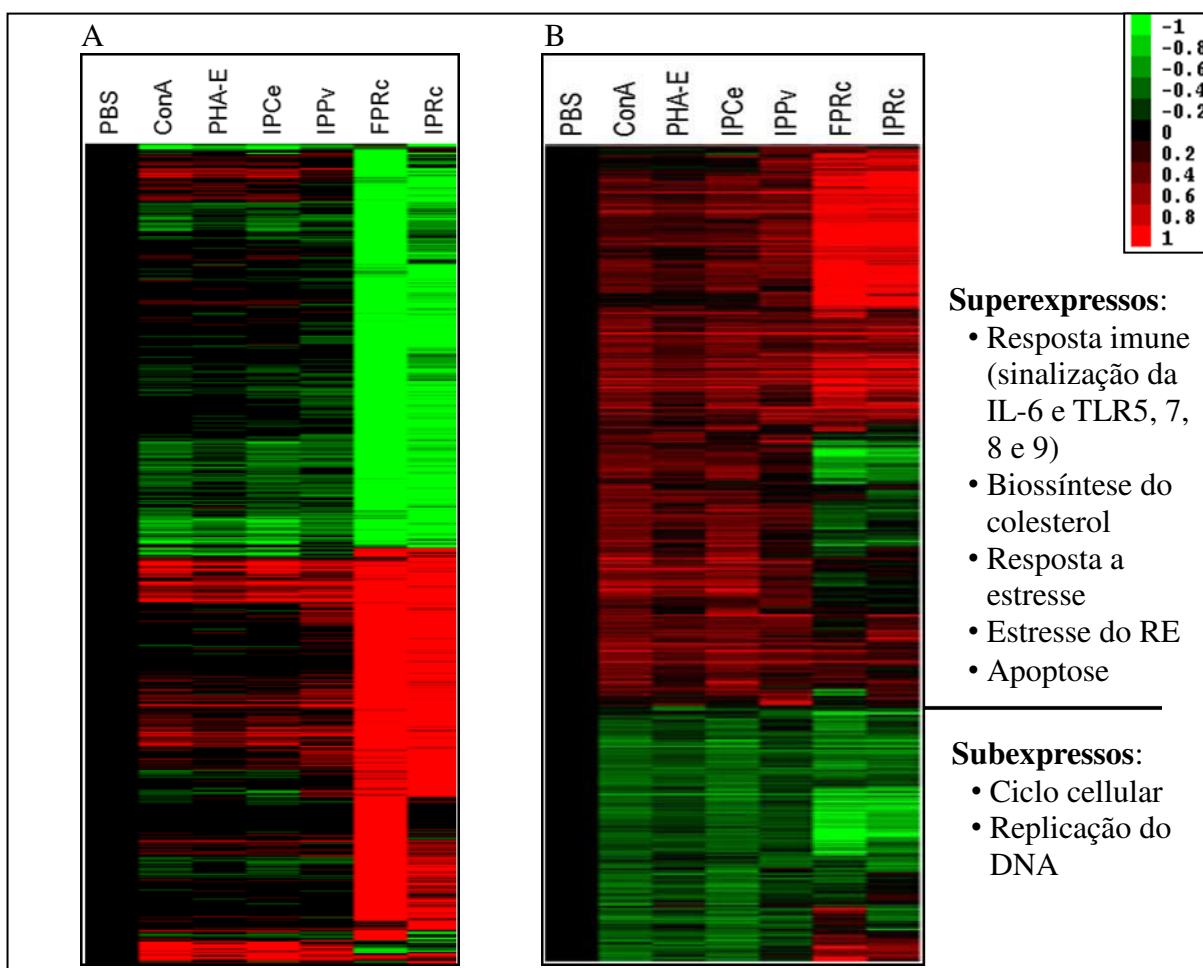
Verde indica sub- e vermelho superexpressão; preto indica nenhuma alteração. A correspondência entre a intensidade da cor relativa e a proporção de 2log de regulação para mais ou para menos é indicada pela barra no canto superior direito.

Uma possível explicação para o inesperado efeito do controle químico sobre a membrana celular seria a presença de sal residual da preparação de Ctrl_Quim, apesar de ter sido submetido à diálise. Segundo Logisz e Hovis (2005), alterações na concentração de NaCl provocaram variação nas quantidades de fosfatidilglicerol e fosfatidilcolina em membranas artificiais *in vitro*. É possível que as condições em que ocorreu a diálise no preparo do controle químico e dos isolados proteicos não tenham sido suficientes para eliminar todo o sal presente em EP. A utilização de membrana de diálise de poro maior (25-30 kDa) ou até mesmo a substituição da diálise por outro método como o de membranas filtrantes, poderia eliminar este problema e poderia eliminar a necessidade até da precipitação isoelétrica. Caso esta alteração seja implementada, o extrato bruto seria filtrado através de uma membrana de poro até 30 kDa, eliminando os sais e moléculas menores (ALIBHAI *et al.*, 2006).

Aparentemente, quanto maior o percentual de controle químico nas amostras, mais seus perfis de expressão gênica se parecem com o perfil de Ctrl_Quim. Para utilização nos ensaios *in vivo*, as amostras haviam sido preparadas em concentração 7x maior que a desejada, conforme explicado no tópico 3.4.4. Como as concentrações das soluções iniciais eram muito diferentes, as soluções finais continham diferentes quantidades relativas de controle químico entre si. Assim, o percentual de controle químico nas amostras foi 0% para PHA-E e ConA; 4% para IPRc_50; 21% para FPRc_50; 24% para IPPv_50; 25% para IPCe_50; 40% para IPAc_50; 50% para IPGm_50; 80% para IPAc_100 e 100% para IPGm_100. Uma vez observada a participação do Ctrl_Quim nas alterações observadas, foi decidido que as amostras que continham mais do que 25% de controle químico não seriam levadas adiante nas análises. Devido a esta decisão, o isolado proteico que primeiro motivou este estudo (IPAc) e o isolado proteico comercial (de soja) foram descartados do trabalho, assim como as demais amostras que nem chegaram a ser hibridizadas.

A partir deste ponto a atenção foi voltada para as amostras IPPv, IPCe, PHA-E, ConA, IPRc e FPRc, todas na dose de 50 µg/mL. Como pode ser visto na Figura 12B, os perfis de expressão gênica de ConA, PHA-E, IPCe e, um pouco menos, de IPPv (50 µg/mL) foram bastante semelhantes entre si. Esta semelhança fica ainda evidenciada quando o agrupamento hierárquico é realizado seletivamente para estas seis amostras, em comparação com PBS. A Figura 13A mostra o *heat map* resultante deste agrupamento, que incluiu os 3259 genes que foram diferencialmente expressos (> 2,0) por pelo menos um dos seis tratamentos em relação ao PBS. Ao restringir a análise apenas para os genes diferencialmente expressos (> 1,62) por pelo menos uma das amostras IPPv, IPCe, PHA-E e ConA (50 µg/mL), comparadas com PBS, foram observados 647 genes que foram agrupados, gerando o *heat*

Figura 13 – *Heat-maps* mostrando agrupamento hierárquico dos genes diferencialmente expressos por células MCF-7 expostas por 24 h às amostras contendo < 25% de controle químico. A) 3259 genes diferencialmente expressos ($> 2,0$) por pelo menos um dos tratamentos ConA, PHA-E, IPCe e IPPv quando comparados ao PBS (1650 super- e 1609 subexpressos); B) 647 genes diferencialmente expressos ($> 1,62$) por pelo menos um dos tratamentos ConA, PHA-E, IPCe e IPPv quando comparados ao PBS (443 super- e 204 subexpressos); C) 604 genes diferencialmente expressos ($> 2,0$) por pelo menos um dos tratamentos FPRc e IPRc quando comparados ao PBS (405 super- e 199 subexpressos) Vias ou processos biológicos para os quais os genes super- ou subexpressos são mais representativos, de acordo com o indicado pela análise com a ferramenta MetaCore, são mostrados em B e C (CONTINUA)

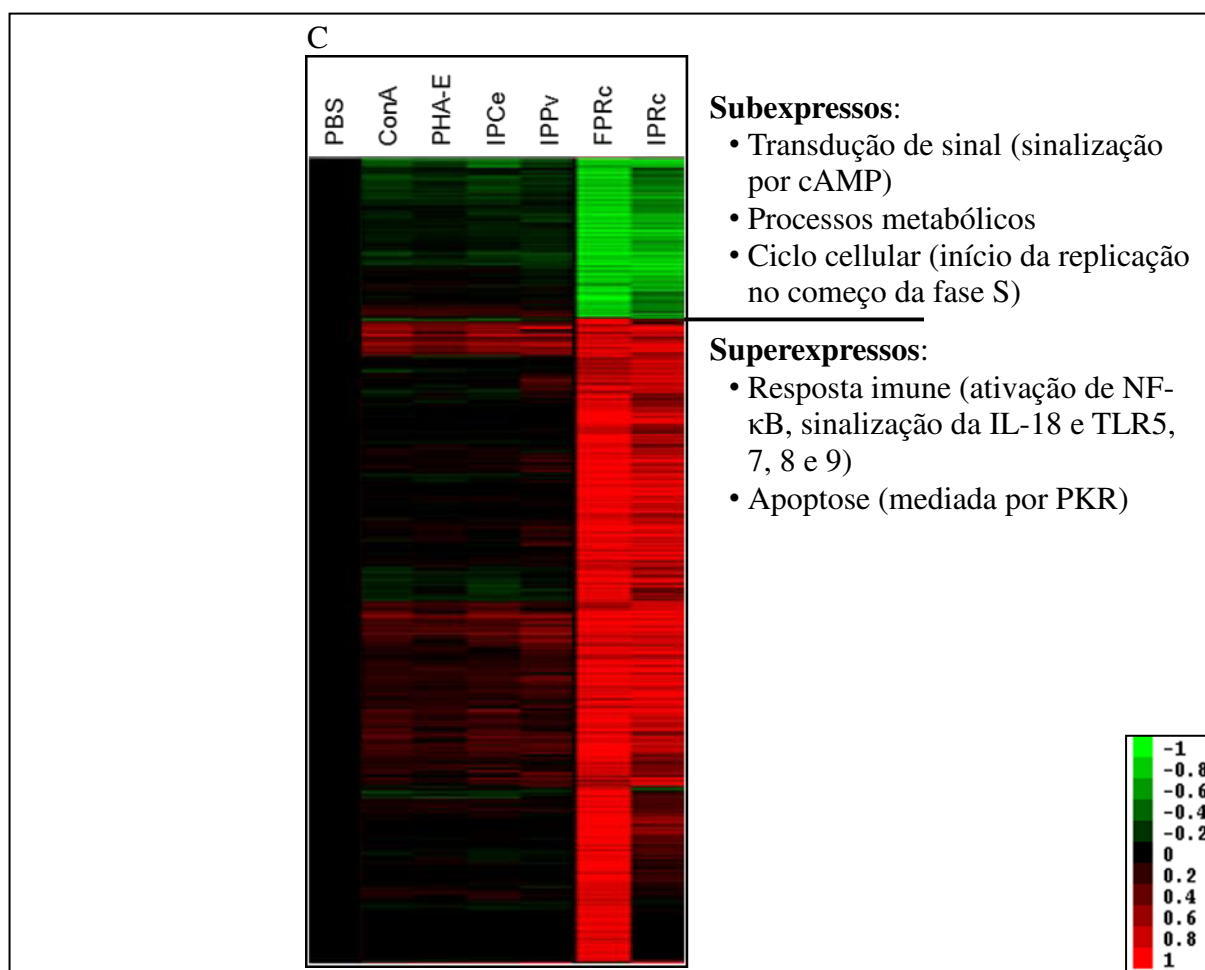


FONTE: Elaborada pelo autor;

PBS: tampão fosfato-salino; Con_A: Concanavalina A; PHA-E: Eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris*; IPCe: Isolado Proteico de *Canavalia ensiformis*; IPPv: Isolado Proteico de *Phaseolus vulgaris*; FPRc: Fração Proteica de *Ricinus communis*; IPRc: Isolado Proteico de *Ricinus communis*; Todas as amostras estavam na concentração de 50 µg/mL;

Verde indica sub- e vermelho superexpressão; preto indica nenhuma alteração. A correspondência entre a intensidade da cor relativa e a proporção de 2log de regulação para mais ou para menos é indicada pela barra no canto superior direito.

Figure 13 – (CONTINUAÇÃO) *Heat-maps* mostrando agrupamento hierárquico dos genes diferencialmente expressos por células MCF-7 expostas por 24 h às amostras contendo < 25% de controle químico. A) 3259 genes diferencialmente expressos (> 2,0) por pelo menos um dos tratamentos ConA, PHA-E, IPCe e IPPv quando comparados ao PBS (1650 super- e 1609 subexpressos); B) 647 genes diferencialmente expressos (> 1,62) por pelo menos um dos tratamentos ConA, PHA-E, IPCe e IPPv quando comparados ao PBS (443 super- e 204 subexpressos); C) 604 genes diferencialmente expressos (> 2,0) por pelo menos um dos tratamentos FPRc e IPRc quando comparados ao PBS (405 super- e 199 subexpressos) Vias ou processos biológicos para os quais os genes super- ou subexpressos são mais representativos, de acordo com o indicado pela análise com a ferramenta MetaCore, são mostrados em B e C



FONTE: Elaborada pelo autor;

PBS: tampão fosfato-salino; Con_A: Concanavalina A; PHA-E: Eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris*; IPCe: Isolado Proteico de *Canavalia ensiformis*; IPPv: Isolado Proteico de *Phaseolus vulgaris*; FPRc: Fração Proteica de *Ricinus communis*; IPRc: Isolado Proteico de *Ricinus communis*; Todas as amostras estavam na concentração de 50 μ g/mL;

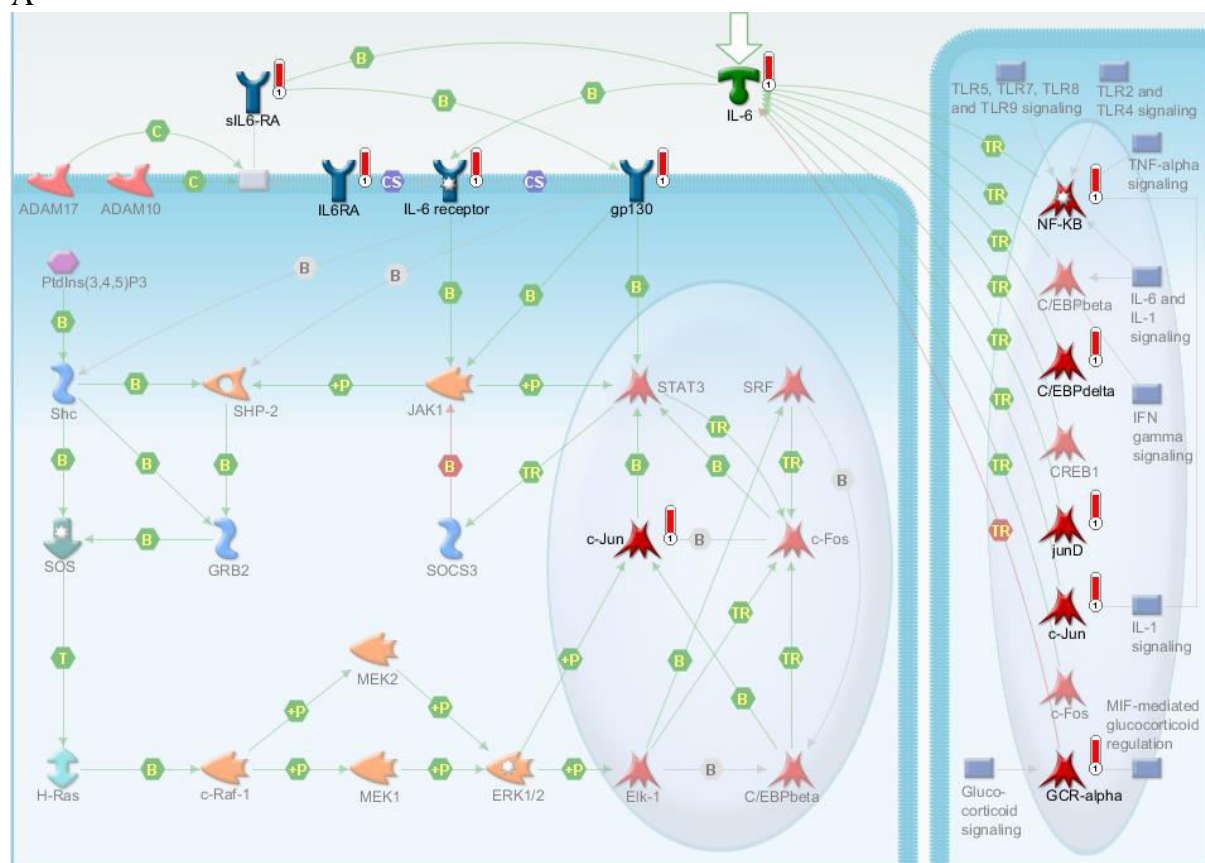
Verde indica sub- e vermelho superexpressão; preto indica nenhuma alteração. A correspondência entre a intensidade da cor relativa e a proporção de 2log de regulação para mais ou para menos é indicada pela barra no canto superior direito.

map mostrado na Figura 13B. Através da análise de vias e processos biológicos mais representativos com o MetaCore, é possível observar que as lectinas de *P. vulgaris* e *C. ensiformis* provocam grande estresse celular, pois os principais genes que tiveram sua expressão aumentada têm relação com resposta pós-estresse, como a produção de interleucina 6 (IL-6) e seu receptor (Figura 14A). Este resultado está de acordo com o que ocorreu para células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) expostas a PHA e ConA, que aumentaram a produção de IL-6 atingindo valor máximo após 24 h, decaindo linearmente até quase normalizar seus níveis após 96 h. A superexpressão (e consequentemente maior produção) de IL-6, um potente indutor de resposta inflamatória, certamente se relaciona com a expressão aumentada de genes envolvidos com a resposta a estresse e estresse do retículo endoplasmático (HIROOKA; MITSUMA; NOGIMORI, 1992). Outra resposta celular ao estresse é o aumento da produção de colesterol o que também ocorreu após exposição das células a PHA e ConA (Figura 14B). Vários genes envolvidos na biossíntese de colesterol têm sua expressão aumentada, incluindo o gene codificante da enzima limitante de velocidade 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase 1 (HMGCS1). Mandimika e colaboradores (2007) mostraram que o glicoalcaloide alfa-chaconina da batata também induz a via de biossíntese do colesterol. Os autores relacionam esse aumento com o conhecido efeito das chaconinas de romper a membrana celular. Se o mesmo for aplicável aqui, esse pode ser parte do efeito tóxico dessas lectinas *in vivo*. Entre os genes regulados para baixo estavam presentes alguns que codificam para proteínas envolvidas no ciclo celular, como os da replicação do DNA.

Como já mencionado anteriormente, a exposição de células MCF-7 às amostras derivadas de *Ricinus communis* (contendo ricina) resultou em alterações profundas na expressão gênica. Para avaliar apenas os genes que foram afetados por estas amostras (IPRc e FPRc), foi realizado o agrupamento dos 604 genes que foram diferencialmente regulados mais que duas vezes para mais ou para menos (Figura 13C). Em seguida a análise das vias e processos biológicos revelou que diversos processos foram afetados. Entre os processos regulados para cima estão as respostas imunes mediadas por NF- κ B (sinalização de NF- κ B/IL-18) e apoptose induzida por estresse (Figura 15A). Assim como foi observado para Ctrl_Quim, os processos alterados por IPRc e FPRc acontecem em resposta a estresse celular e levam à apoptose induzida por PKR (GIL; ALCAMÍ; ESTEBAN, 1999). Por outro lado, os genes envolvidos com a sinalização Adenosina Monofosfato cíclico (cAMP) (Figura 15B) e com o ciclo celular (Figura 15C) foram regulados para baixo, apontando para a interrupção da atividade celular, o que pode indicar um estágio mais avançado do processo de morte da célula.

FIGURA 14 – Efeitos na expressão diferencial de genes após exposição por 24 h de células MCF-7 às amostras de ConA, PHA-E, IPCe e IPPv. Vias e processos envolvidos na sinalização da IL-6 e na biossíntese de colesterol. (A) via de sinalização da IL-6; (B) biossíntese de colesterol (CONTINUA)

A



FONTE: MetaCore™;

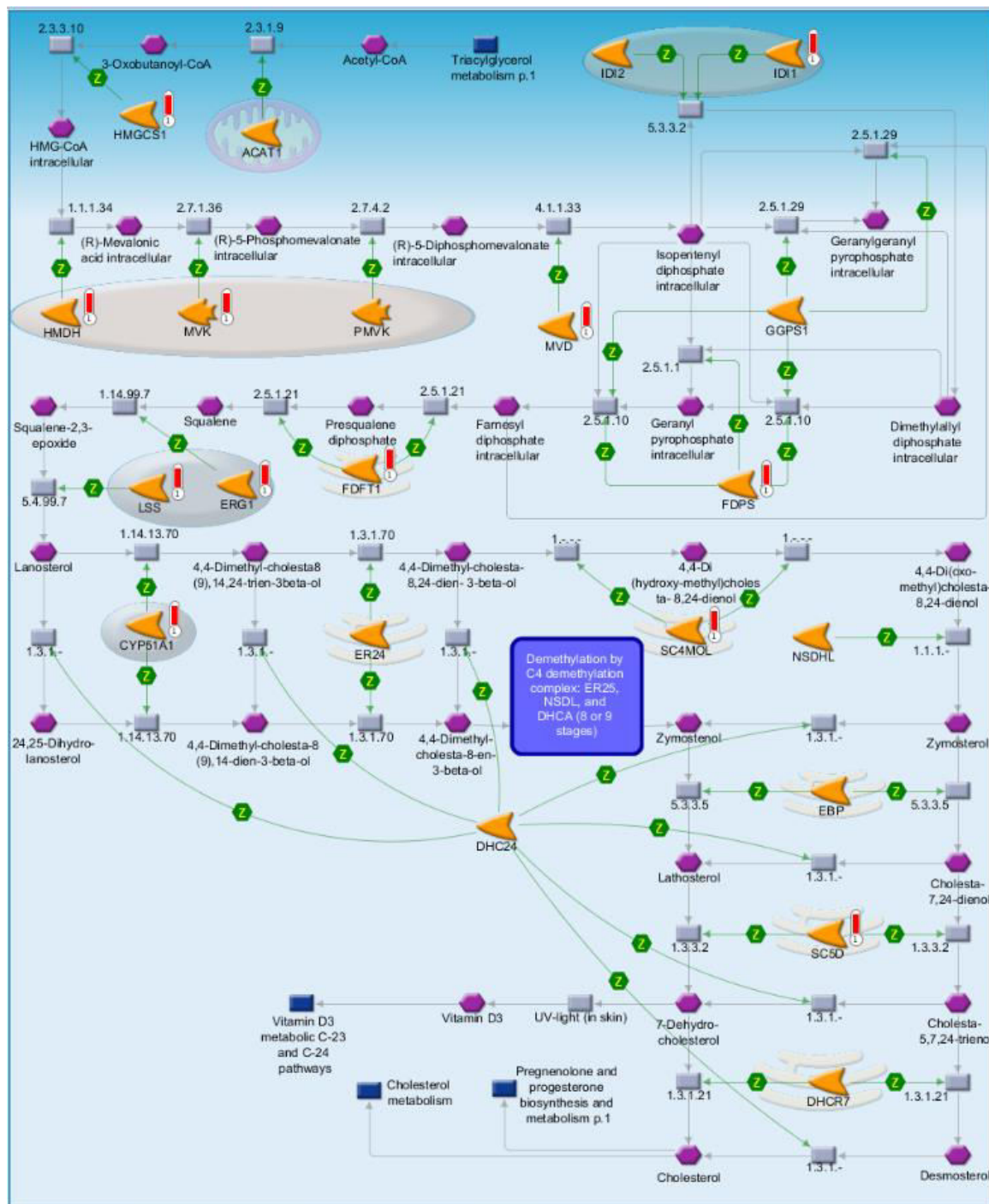
Con A: Concanavalina A; PHA-E: Eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris*; IPCe: Isolado Proteico de *Canavalia ensiformis*; IPPv: Isolado Proteico de *Phaseolus vulgaris*;

As pequenas barras verticais vermelhas e azuis indicam genes que tiveram seus níveis de expressão significativamente alterados para mais e para menos, respectivamente;

Legendas da figura podem ser encontradas no Anexo 1.

FIGURA 14 – (CONTINUAÇÃO) Efeitos na expressão diferencial de genes após exposição por 24 h de células MCF-7 às amostras de ConA, PHA-E, IPCe e IPPv. Vias e processos envolvidos na sinalização da IL-6 e na biossíntese de colesterol. (A) via de sinalização da IL-6; (B) biossíntese de colesterol

B



FONTE: MetaCore™;

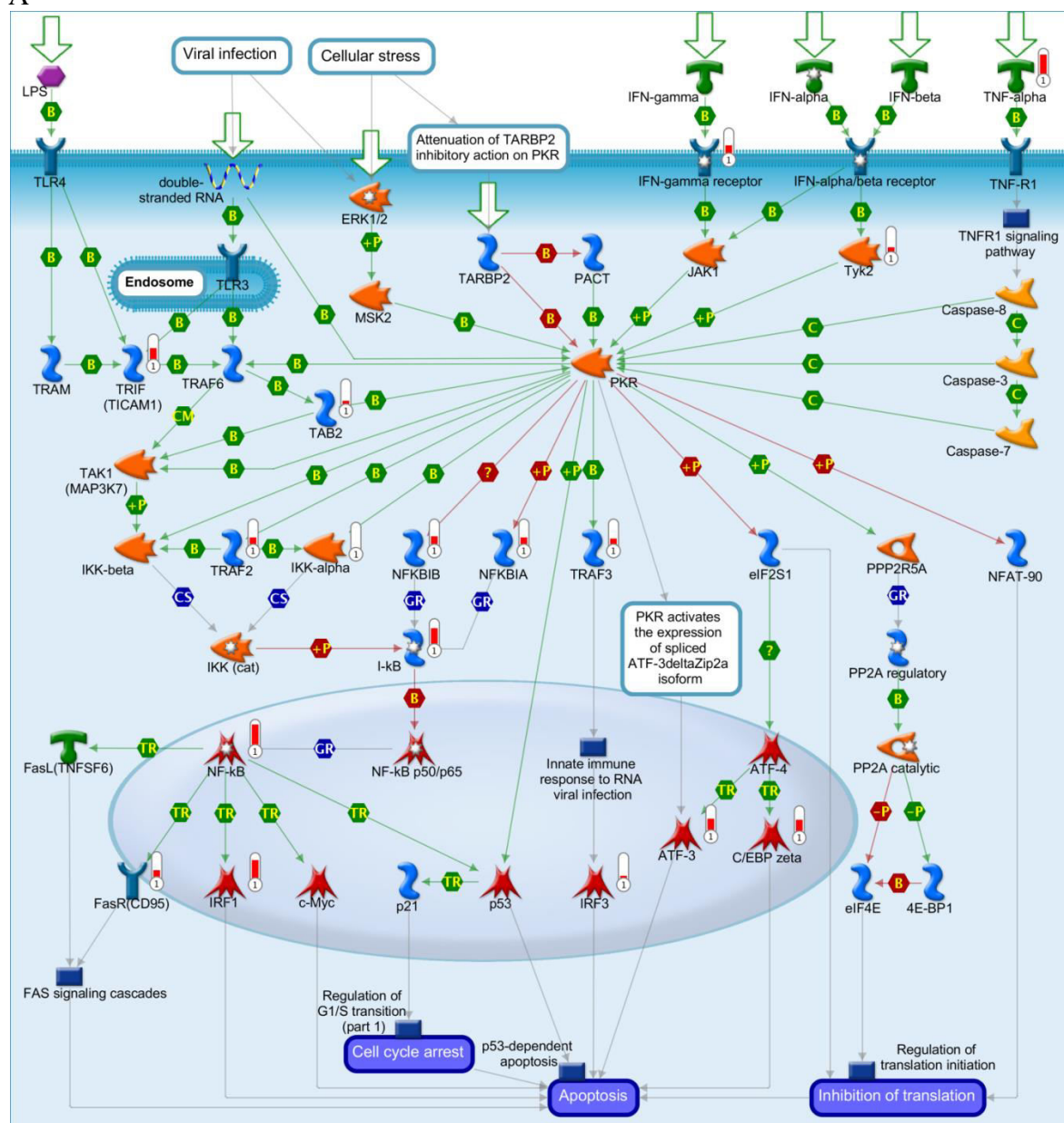
Con A: Concanavalina A; PHA-E: Eritroaglutina de *Phaseolus vulgaris*; IPCe: Isolado Proteico de *Canavalia ensiformis*; IPPv: Isolado Proteico de *Phaseolus vulgaris*;

As pequenas barras verticais vermelhas e azuis indicam genes que tiveram seus níveis de expressão significativamente alterados para mais e para menos, respectivamente;

Legendas da figura podem ser encontradas no Anexo 1.

FIGURA 15 – Efeitos na expressão diferencial de genes após exposição por 24 h de células MCF-7 às amostras de FPRc e IPRc. De acordo com os resultados fornecidos pela ferramenta MetaCore para análise de vias e processos biológicos, FPRc e IPRc promovem o aumento da expressão de genes envolvidos na apoptose induzida por estresse (A) enquanto causam menor expressão de genes associados com a sinalização do cAMP (B) e com o ciclo celular (C) (CONTINUA)

A



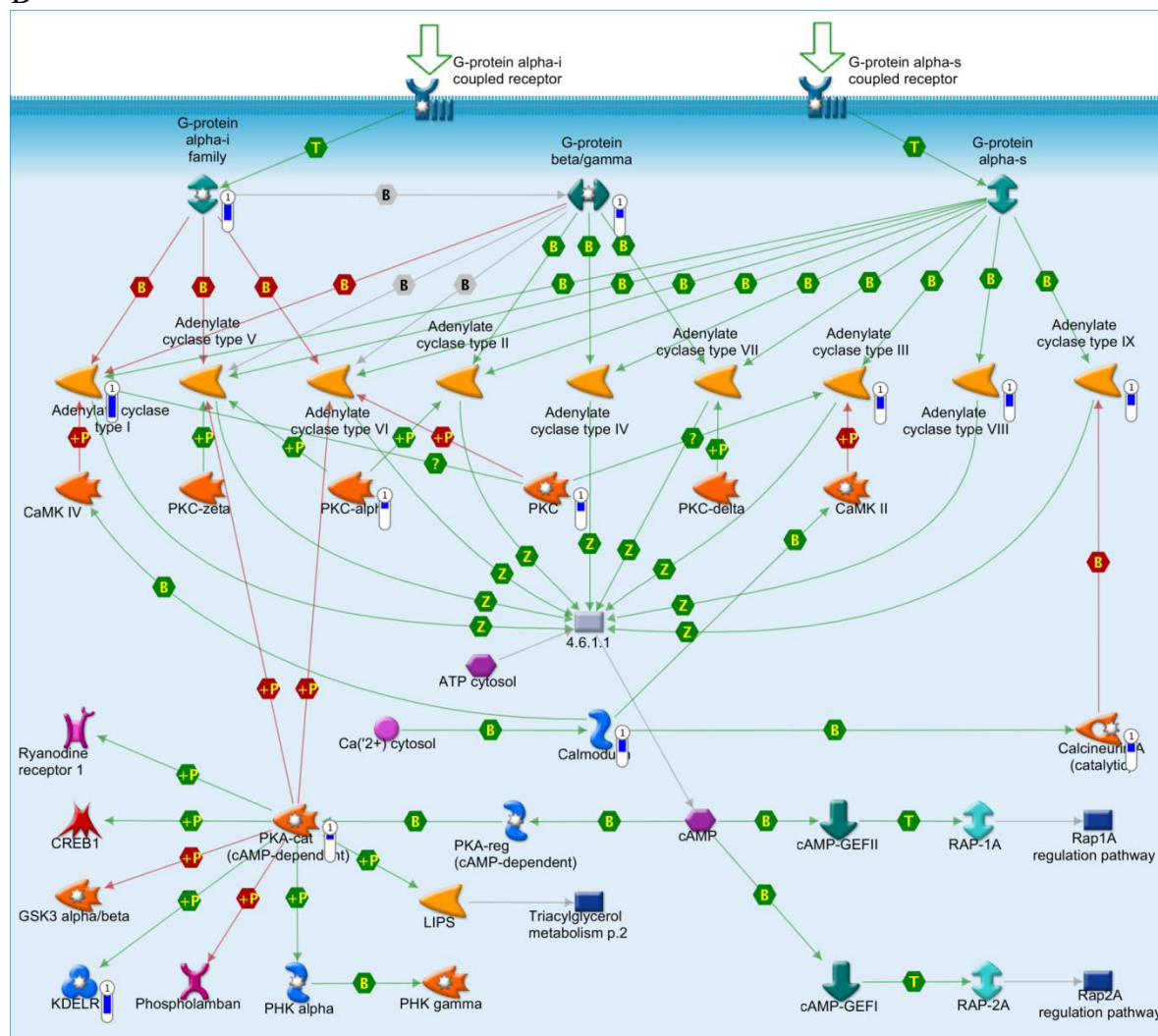
FONTE: MetaCore™;

As pequenas barras verticais vermelhas e azuis indicam genes que tiveram seus níveis de expressão significativamente alterados para mais e para menos, respectivamente;

Legendas da figura podem ser encontradas no Anexo 1.

FIGURA 15 – (CONTINUAÇÃO) Efeitos na expressão diferencial de genes após exposição por 24 h de células MCF-7 às amostras de FPRc e IPRc. De acordo com os resultados fornecidos pela ferramenta MetaCore para análise de vias e processos biológicos, FPRc e IPRc promovem o aumento da expressão de genes envolvidos na apoptose induzida por estresse (A) enquanto causam menor expressão de genes associados com a sinalização do cAMP (B) e com o ciclo celular (C) (CONTINUA)

B



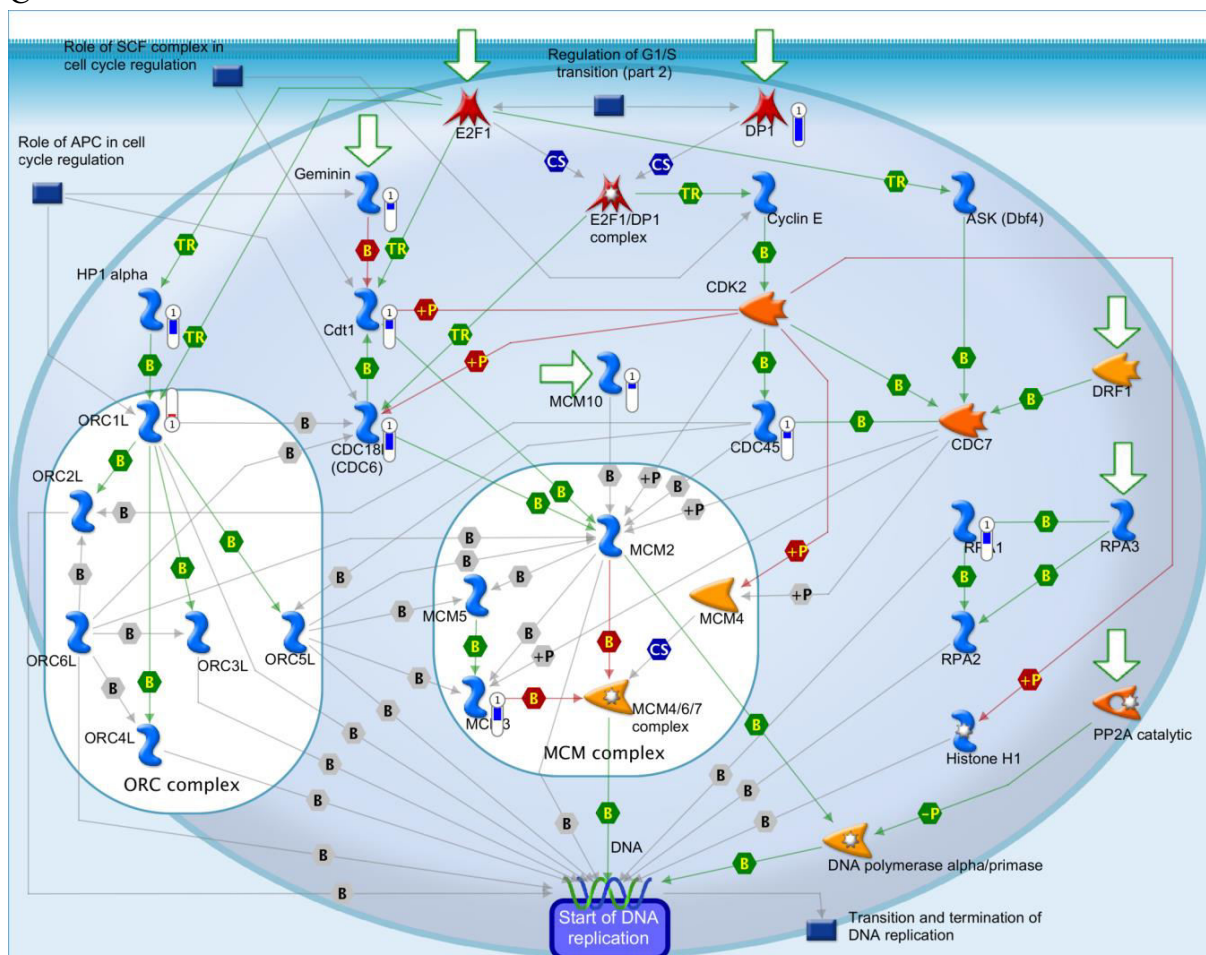
FONTE: MetaCore™;

As pequenas barras verticais vermelhas e azuis indicam genes que tiveram seus níveis de expressão significativamente alterados para mais e para menos, respectivamente;

Legendas da figura podem ser encontradas no Anexo 1.

FIGURA 15 – (CONTINUAÇÃO) Efeitos na expressão diferencial de genes após exposição por 24 h de células MCF-7 às amostras de FPRc e IPRc. De acordo com os resultados fornecidos pela ferramenta MetaCore para análise de vias e processos biológicos, FPRc e IPRc promovem o aumento da expressão de genes envolvidos na apoptose induzida por estresse (A) enquanto causam menor expressão de genes associados com a sinalização do cAMP (B) e com o ciclo celular (C)

C



FONTE: MetaCore™;

As pequenas barras verticais vermelhas e azuis indicam genes que tiveram seus níveis de expressão significativamente alterados para mais e para menos, respectivamente;
 Legendas da figura podem ser encontradas no Anexo 1.

3.5.6 Análises do Mapa Conectivo

O perfil de expressão de uma linhagem celular após a exposição a um composto qualquer é chamado de assinatura de expressão, que é característico deste composto. Para prever possíveis efeitos específicos (sobretudo efeitos tóxicos) que as amostras ConA, PHA-E, IPPv, IPCe, FPRc e IPRc teriam exercido sobre as células MCF-7, as assinaturas de expressão geradas foram comparadas àquelas provocadas por drogas e compostos químicos já bem caracterizados utilizando o algoritmo de pesquisa da base de dados Mapa Conectivo (Connectivity Map). Para isto, os genes que foram diferencialmente mais ou menos expressos por células MCF-7, após exposição por 24 h às amostras, foram carregados nesta base de dados resultando em escores de conectividade. Para cada amostra testada, foram selecionadas as dez drogas que exibiram os maiores escores, o que pode ser visto na Tabela 5, onde também é mostrado em que posição cada droga se encontra em relação às outras amostras. Um total de 22 drogas mostrou algum grau de correlação com alguma das amostras, mas apenas a droga anti-histamínica terfenadina esteve presente entre as dez mais correlacionadas (Top-10) para todas as amostras analisadas, com especial destaque para IPPv, IPCe e PHA-E (posição 2, 3 e 4, respectivamente). Esta droga, além de seus efeitos anti-histamínicos, quando em altas concentrações pode também bloquear os canais de potássio hERG. A prenilamina (bloqueador de canal de cálcio, vasodilatador) apareceu entre as top-10 de 5 amostras (ela está na posição 1 para PHA-E, 2 para ConA, 4 para IPCe, mas 16 para FPRc, já fora do top-10). Também merecem destaque a droga antipsicótica tioridazina e a droga anti-histamínica astemizol que apresentaram alta correlação positiva com ConA (posição 1 e 3, respectivamente), PHA-E (posição 2 e 3, respectivamente) e IPCe (posição 2 e 1, respectivamente). Esta última droga é conhecida por seus efeitos colaterais potencialmente letais (bloqueio dos canais de potássio hERG, resultando em arritmias). De modo geral, ConA, PHA-E e IPCe mostraram grande proximidade, considerando as drogas com que apresentam alta correlação positiva. Além das já citadas acima, destacam-se também o vasodilatador suloctidil, o corticosteroide mometasona (induz a produção de proteínas inibidoras da fosfolipase A2) e os anti-helmínticos pirvinium e niclosamida. A ConA parece ser o principal componente tóxico de *Canavalia ensiformis*, dada a coincidência das drogas com que mais se assemelham. A mesma relação não pôde ser estabelecida para PHA-E e *Phaseolus vulgaris*, o que sugere que esta lectina não é a única causadora de toxicidade nas sementes dessa espécie. Na verdade a semelhança de IPPv com IPRc e FPRc, inclusive compartilhando dois bloqueadores de síntese proteica (anisomicina e licorina) levanta a suspeita de que PHA-E pode seja a molécula mais tóxica de *Phaseolus vulgaris*.

IPRc e FPRc mostraram ter efeitos bem semelhantes, compartilhando 7 drogas do top-10. Destas, 6 têm ação inibitória da síntese proteica: anisomicina, emetina, cefalina, licorina, puromicina e cicloheximidina. Interessantemente, IPPv mostrou maior conexão com as amostras derivadas de *Ricinus communis* do que com PHA-E ou com as amostras derivadas de *Canavalia ensiformis*. Isto pode ser confirmado quando consideramos a lista das 10 drogas mais correlacionadas com uma destas três amostras e observamos quantas delas estão no top-25 das outras duas.

3.6 CONCLUSÃO

A avaliação das proteínas de *Amburana cearensis* foi muito prejudicada pela baixa solubilidade da amostra, provavelmente provocada pelo método de secagem que sofreu (liofilização). Além disso, outro problema referente à obtenção dos isolados é que possivelmente tenha restado sal nas amostras devido a uma diálise insuficiente. Isto reforça o fato de que o método de obtenção deve ser melhorado para que a o isolado em questão possa vir a ser adequadamente analisado posteriormente.

A lectina ConA parece ser o principal componente tóxico de *Canavalia ensiformis*. No entanto, a PHA-E pode não ser a molécula de mais tóxica presente em *Phaseolus vulgaris*.

A ação bloqueadora da síntese proteica de proteínas de *Ricinus cummunis* foi ratificada neste estudo, no entanto não se pode garantir que todos os efeitos observados são atribuídos apenas à ricina, pois não foram realizadas análises com a molécula purificada.

Tabela 5 - Dados do Mapa Conectivo obtido a partir das assinaturas de expressão das lectinas ConA e PHA-E, das preparações proteicas IPCe, IPPv, IPRc e FPRc em células MCF-7

Drogas com maiores escores de conectividade (Top-10)		Posição relativa às outras amostras				
Con A		PHA-E	IPCe	IPPv	FPRc	IPRc
1	Tioridazina	2	2	8	25	27
2	Prenilamina	1	4	6	16	9
3	Astemizol	3	1	11	19	11
4	Niclosamida	5	8	12	126	41
5	Mometasona	9	6	13	10	34
6	Pirvinium	10	9	7	36	24
7	Trifluoperazina	8	11	45	61	63
8	Suloctidil	7	7	3	14	16
9	Terfenadina	4	3	2	7	10
10	Protriptilina	31	10	121	215	170
Nº de casos no Top -25		9	10	8	6	5
Probabilidade hipergeométrica		7E-16	8E-19	2E-13	5E-09	4E-07
PHA-E		Con A	IPCe	IPPv	FPRc	IPRc
1	Prenilamina	2	4	6	16	9
2	Tioridazina	1	2	8	25	27
3	Astemizol	3	1	11	19	11
4	Terfenadina	9	3	2	7	10
5	Niclosamida	4	8	12	126	41
6	Withaferin A	14	21	20	60	97
7	Suloctidil	8	7	3	14	16
8	Trifluoperazina	7	11	45	61	63
9	Mometasona	5	6	13	10	34
10	Pirvinium	6	9	7	36	24
Nº de casos no Top -25		10	10	9	6	5
Probabilidade hipergeométrica		8E-19	8E-19	7E-16	5E-09	4E-07
IPCe		Con A	PHA-E	IPPv	FPRc	IPRc
1	Astemizol	3	3	11	19	11
2	Tioridazina	1	2	8	25	27
3	Terfenadina	9	4	2	7	10
4	Prenilamina	2	1	6	16	9
5	Mefloquina	15	15	5	18	7
6	Mometasona	5	9	13	10	34
7	Suloctidil	8	7	3	14	16
8	Niclosamida	4	5	12	126	41
9	Pirvinium	6	10	7	36	24
10	Protriptilina	10	31	121	215	170
Nº de casos no Top -25		10	9	9	7	6
Probabilidade hipergeométrica		8E-19	8E-19	7E-16	4E-11	5E-09

IPV		Con A	PHA-E	IPCe	FPRc	IPRc
1	Anisomicina	71	83	40	2	3
2	Terfenadina	9	4	3	7	10
3	Suloctidil	8	7	7	14	16
4	Licorina	190	142	114	6	6
5	Mefloquina	15	15	5	18	7
6	Prenilamina	2	1	4	16	9
7	Pirvinium	6	10	9	36	24
8	Tioridazina	1	2	2	25	27
9	Azaciclonol	69	39	51	15	8
10	Gossipol	84	11	48	88	74
Nº de casos no Top -25		6	6	6	8	8
Probabilidade hipergeométrica		5E-09	5E-09	4E-11	2E-13	2E-13
FPRc		Con A	PHA-E	IPCe	IPV	IPRc
1	Cefalina	252	131	218	25	2
2	Anisomicina	71	83	40	1	3
3	Emetina	204	153	160	29	1
4	Fenoxibenzamina	62	82	42	56	22
5	Puomicina	51	62	47	39	5
6	Licorina	190	142	114	4	6
7	Terfenadina	9	4	3	2	10
8	Celastrol	61	50	54	41	19
9	Cicloheximida	232	270	234	21	4
10	Mometasona	5	9	6	13	34
Nº de casos no Top -25		2	2	2	6	9
Probabilidade hipergeométrica		0,01	0,01	0,01	5E-09	7E-16
IPRc		Con A	PHA-E	IPCe	IPV	FPRc
1	Emetina	204	153	160	29	3
2	Cefalina	252	131	218	25	1
3	Anisomicina	71	83	40	1	2
4	Cicloheximida	232	270	234	21	9
5	Puomicina	51	62	47	39	5
6	Licorina	190	142	114	4	6
7	Mefloquina	15	15	5	5	18
8	Azaciclonol	69	39	51	9	15
9	Prenilamina	2	1	4	6	16
10	Terfenadina	9	4	3	2	7
Nº de casos no Top -25		3	3	3	8	10
Probabilidade hipergeométrica		7E-04	7E-04	7E-04	2E-13	8E-19

FONTE: Elaborada pelo autor;

Números em negrito indicam que a classificação da droga está entre as 25 de maior escore;

ConA: Concanavalina A; PHA-E: Eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris*; IPCe: Isolado Proteico de *Canavalia ensiformis*; IPV: Isolado Proteico de *Phaseolus vulgaris*; FPRc: Fração Proteica de *Ricinus communis*; IPRc: Isolado Proteico de *Ricinus communis*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolado proteico de cumaru produzido neste trabalho merece receber a atenção de estudos futuros, pois, mesmo se tratando de protótipo, se mostrou muito promissor quanto às suas propriedades funcionais de interesse para a indústria alimentícia, tendo algumas vezes desempenho superior a um isolado proteico de soja já disponível comercialmente. A avaliação da segurança (de alimentos) das proteínas de *Amburana cearensis* foi profundamente prejudicada pela baixa solubilidade da amostra, provavelmente provocada pelo método de obtenção. As etapas mais que podem ter influenciado mais negativamente neste sentido foram (i) a precipitação isoelétrica, por favorecer a formação de agregados proteicos e (ii) a secagem por liofilização, que tem a perda da solubilidade de proteínas uma de suas mais conhecidas desvantagens. A análise transcriptômica também parece ter sido prejudicada pela presença de sal residual nas amostras. Para dar sequência ao estudo das proteínas de cumaru, serão realizadas algumas modificações no protocolo de obtenção de IPAc, visando solucionar os problemas enfrentados neste trabalho. Entre as mudanças que podem ser implementadas, estão (i) a redução da concentração salina da solução extratora; (ii) alterações na proporção e tempo de extração; (iii) a utilização de membranas filtrantes em substituição da precipitação isoelétrica e da diálise, ou a realização de diálise em membranas com poro entre 25 e 30 kDa; (iv) a substituição da liofilização pelo *spray dry* como método de secagem. Após a aplicação de todas estas modificações, todos os testes devem ser repetidos, uma vez que a diferentes métodos de obtenção leva a produtos diferentes.

Este trabalho vem reforçar a necessidade de conservação e do uso racional de ambientes naturais subprotegidos como a Caatinga, visto que uma espécie nunca antes pensada como alimento humano mostrou tamanho potencial nutricional e tecnológico para futuro uso industrial. A proteção desses ambientes e o fomento de pesquisas futuras poderão mostrar várias riquezas ainda ocultas da Caatinga.

REFERÊNCIAS

- ADEBIYI, A. P.; ALUKO, R. E. Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. **Food Chemistry**, v. 128, p. 902–908, 2011.
- ADEBOWALE, Y. A. A study of the control variables during the preparation of protein isolate from mucuna bean (*Mucuna pruriens*). **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 7, n. 9, p. 3223-3238, 2008.
- ADEBOWALE, Y. A.; ADEYEMI, I. A.; OSHODI, A. A.; NIRANJAN K. Isolation, fractionation and characterisation of proteins from Mucuna bean. **Food Chemistry**, v. 104, p. 287-299, 2007.
- AIKING, H. Future protein supply. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 112-120, 2011.
- AKAERUE, B. I.; ONWUKA, G.I. Evaluation of the yeild, protein content and functional properties of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] Protein isolates as affected by processing. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 9, n. 8, p. 728-735, 2010.
- ALIBHAI, Z.; MONDOR, M.; MORESOLI, C.; IPPERSIEL, D.; LAMARCHE, F. Production of soy protein concentrates/isolates: traditional and membrane technologies. **Desalination**, v. 191, p. 351–358, 2006.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; GUIMARÃES, A. G.; SIQUEIRA, J. S.; SANTOS, M. R. V.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. *Amburana cearensis* – uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, v. 6, n. 11, 2010.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Legumes as a source of natural antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 10, p. 865-878, 2008.
- AMZA, T.; AMADOU, I.; ZHU, K.; ZHOU, H. Effect of extraction and isolation on physicochemical and functional properties of an underutilized seed protein: Gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*). **Food Research International**, v. 44, p. 2843-2850, 2011.
- ANDRADE, S. R. M. **Biossegurança de alimentos transgênicos**. Documentos / Embrapa Cerrados. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. 22 p.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16th ed. Gaitheersburgh, 1997.
- APO - ASIAN PRODUCTIVITY ORGANIZATION. **Processing and Utilization of Legumes**. Report of the APO Seminar on Processing and Utilization of Legumes. Japan, 9-14 Oct. 2000.
- ARIAS, A. R. L.; FREIRE, M. M. Contribuição das ômicas na saúde humana: avanços e desafios. **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 4, p. 717-732, 2008.
- ASGAR, M. A.; FAZILAH, A.; HUDA, N.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Nonmeat Protein Alternatives as Meat Extenders and Meat Analogs. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 513-529, 2010.

AYDEMIR, L. Y.; YEMENICIOĞLU, A. Are Protein-bound Phenolic Antioxidants in Pulses Unseen Part of Iceberg? **Plant Biochemistry & Physiology**, v. 1, n. 4, 2013.

AYDEMIR, L. Y.; YEMENICIOĞLU, A. Potential of Turkish Kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 686-694, 2013.

BADGER, T. M.; RONIS, M. J. J.; SIMMEN, R. C. M.; SIMMEN, F. A. Soy protein isolate and protection against cancer. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 146S-149S, 2005.

BAETHGEN, W. E.; ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 20, n. 9-10, p. 961-969, 1989

BÄHR, M.; FECHNER, A.; KRÄMER, J.; KIEHNTOPF, M.; JAHREIS, G. Lupin protein positively affects plasma LDL cholesterol and LDL:HDL cholesterol ratio in hypercholesterolemic adults after four weeks of supplementation: a randomized, controlled crossover study. **Nutrition Journal**, v. 12, v. 107, 2013.

BANDYOPADHYAY, K.; GHOSH, S. Preparation and characterization of papain-modified sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6854-6857, 2002.

BINNECK, E. As ômicas- Integrando a bioinformação. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 32, 2004. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/omicas_32.pdf>. Acesso em 02 de fevereiro de 2014.

BISWAS, A.; DHAR, P.; GHOSH, S. Antihyperlipidemic Effect of Sesame (*Sesamum indicum* L.) Protein Isolate in Rats Fed a Normal and High Cholesterol Diet. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, 2010.

BJORGUM, C. P. Experimentos com Amburana. **Blog Sabor Saudade**. 2009. Disponível em <<http://saborsaudade.blogspot.com.br/2009/06/experimentos-com-amburana.html>>. Acesso em 05 abr. 2014.

BOLSTAD, B. M.; IRIZARRY, R. A.; ASTRAND, M.; SPEED, T. P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. **Bioinformatics**, v. 19, p. 185-193, 2003.

BORCHERS, A.; TEUBER, S. S.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Food Safety. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 39, p. 95-141, 2010.

BORÉM, A.; SANTOS, F. R. Biossegurança de OGMs. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. (Ed. Tec.) **Savanas**. Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Embrapa Cerrados. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 812-833, 2008. 1198 p.

BOYE, J.; ZARE, F.; PLETCH, A. Pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 414-431, Mar. 2010.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente - MMA. **A Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB**. Cópia do Decreto Legislativo no. 2, de 5 de junho de 1992. Brasília, 2000.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Mapa de Biomas e de Vegetação**. 21 de maio de 2004.
<www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm> Acesso em 03 de março de 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Resolução RDC n. 268, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o "REGULAMENTO TÉCNICO PARA PRODUTOS PROTÉICOS DE ORIGEM VEGETAL". Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes**. Brasília/DF: ANVISA, Fevereiro de 2013, 41 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente - MMA. **Secretaria de Biodiversidade e Florestas**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 07 de fevereiro de 2014.

CALDAS, C. **Blog Science Blogs**. 2012. Disponível em <<http://scienceblogs.com.br/podeimburana/oblog/>>. Acesso em 05 abr. 2014.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R., BEZERRA, A. M. E.; LEAL, L. K. A. M.; VIANA, G. S. B. **Uso de plantas jovens de *Amburana cearensis* A. C. Smith: alternativa para preservação e exploração econômica da espécie**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. SMITH). **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 662-666, 2010.

CARRERA, C. S.; REYNOSO, C. M.; FUNES, G. J.; MARTÍNEZ, M. J.; DARDANELLI, J.; RESNIK, S. L. Amino acid composition of soybean seeds as affected by climatic variables. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 12, p. 1579-1587, 2011.

CARVALHO, A. V.; GARCÍA, N. H. P.; FARFÁN, J. A.; WADA, J. K. A. Caracterização de concentrado e isolado proteico extraído de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 1, p. 01-08, 2009.

CARVALHO, A. F. U.; FARIAS, D. F.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; SOUSA, N. M.; CAVALHEIRO, M. G.; FERNANDES, G. S.; BRASIL, I. C. F.; MAIA, A. A. B.; SOUSA, D. O. B., VASCONCELOS, I. M.; GOUVEIA, S. T.; MACHADO, O. L. T. Preliminary assessment of the nutritional composition of underexploited wild legumes

from semi-arid Caatinga and moist forest environments of northeastern Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 487-493, 2011.

CARVALHO, A. F. U.; SOUSA, N. M.; FARIAS, D. F.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; SILVA, R. M. P.; VIANA, M. P.; GOUVEIA, S. T.; SAMPAIO, S. S.; SOUSA, M. B.; LIMA, G. P. G.; MORAIS, S. M.; BARROS, C. C.; FREIRE FILHO, F. R. Nutritional ranking of 30 Brazilian genotypes of cowpeas including determination of antioxidant capacity and vitamins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, p. 81-88, 2012.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Perda e Conservação dos Recursos Genéticos Vegetais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009.

CBD. CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. <<http://www.cbd.int>> Acesso em 20 de abril de 2014.

CHASSY, B. M. Can –omics inform a food safety assessment? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. S62–S70, 2010.

CHEL-GUERRERO, L.; PEÑA REZ-FLORES, V.; BETANCUR-ANCONA, D.; DAÃ VILA-ORTIZ, G. Functional Properties of Flours and Protein Isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 584-591, 2002.

CHENG, J.; ZHOU, S.; WU, D.; CHEN, J.; LIU, D.; YE, X. Bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) kernel: A new protein source. **Food Chemistry**, v. 112, p. 469–473, 2009.

COELHO, A.I.M.; CAMPOS, M.T.F.S.; LOPES, M.L.M.; NOVAES, J.F. Dia mundial da alimentação: duas décadas no combate aos problemas alimentares. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 401-418, 2005.

CRUZ, M. P.; PERONI, N.; ALBUQUERQUE, U. P. Knowledge, use and management of native wild edible plants from a seasonal dry forest (NE, Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, n. 79, 2013.

DADANNAGARI, S.; MITTA, R.; CHIDRAWAR, V. R.; RAO, V. U. M. A review of toxicogenomics: an insight into new era of toxicology. **International Journal of Inventions in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 668-678, 2014.

DAI, M.; WANG, P.; BOYD, A. D.; KOSTOV, G.; ATHEY, B.; JONES, E. G.; BUNNEY, W. E.; MYERS, R. M.; SPEED, T. P.; AKIL, H.; WATSON, S. J.; MENG, F. Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 20, p. e175, 2005.

DAVIES, H. A role for “omics” technologies in food safety assessment. **Food Control**, v. 21, p. 1601-1610, 2010.

DAY, L. Proteins from land plants e potential resources for human nutrition and food security. **Trends in Food Science & Technology**, v. 32, p. 25-42, 2013.

DE GRAAF, L. A. Denaturation of proteins from a non-food perspective. **Journal of Biotechnology**, v. 79, p. 299–306, 2000.

DENG, Q.; WANG, L.; WEI, F.; XIE, B.; HUANG, F.; HUANG, W.; SHI, J.; HUANG, Q.; TIAN, B.; XUE, E. Functional properties of protein isolates, globulin and albumin extracted from *Ginkgo biloba* seeds. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1458-1465, 2011.

DESHPANDE, S. S. Food legumes in human nutrition: A personal perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 4, p. 333-363, 1992.

DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M. Preparation and antinutritional characteristics of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 34, p. 185-196, 1984.

DINI, C.; GARCÍA, M. A.; VIÑA, S. Z. Non-traditional flours: frontiers between ancestral heritage and innovation. **Food & Function**, v. 3, p. 606-620, 2012.

DREDGE, M. **Craft Beer World: A guide to over 350 of the finest beers known to man.** Dog 'n' Bone, 2013, 192 p.

DU, S.-K.; JIANG, H.; YU, X.; JANE, J. L. Physicochemical and functional properties of whole legume flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 308-313, 2014.

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

DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, v. 53, p. 31-45, 1997.

EISEN, M. B.; SPELLMAN, P. T.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 14863-14868, 1998.

EKINS, S.; BUGRIM, A.; BROVOLD, L.; KIRILLOV, E.; NIKOLSKY, Y.; RAKHMATULIN, E.; SOROKINA, S.; RYABOV, A.; SEREBRYISKAYA, T.; MELNIKOV, A.; METZ, J.; NIKOLSKAYA, T. Algorithms for network analysis in systems-ADME/Tox using the MetaCore and MetaDrug platforms. **Xenobiotica**, v. 36, n. 10-11, p. 877-901, 2006.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430-441, 2008.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Statistical Yearbook.** World Food and Agriculture. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013.

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

FARIAS, D. F. **Proteínas de sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith:** valor nutricional e bioatividade contra patógenos e vetores de doenças. 2009. 186 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FARIAS, D. F. **Biossegurança alimentar de proteínas Cry: dos métodos clássicos à era ômica**. 2013. 242 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

FCN. FEDERAL COMMISSION FOR NUTRITION. **Proteins in Human Nutrition**. Zurich: Expert report of the FCN, Federal Office for Public Health, 2011.

FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; MACARULLA, M. T.; DEL BARRIO, A. S.; MARTÍNEZJ. A. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 51, p. 331-342, 1997.

FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P. Food protein functionality: A comprehensive approach. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1853-1864, 2011.

FRIEDMAN, M. Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 6-29, 1996.

FROTA, K. M. G.; MENDONÇA, S.; SALDIVA, P. H. N.; CRUZ, R. J.; ARÊAS, J. A. G. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, 2008.

GARBA, U.; KAUR, S. Protein Isolates: Production, Functional Properties and Application. **International Journal of Current Research and Review**, v. 06, n. 03, p. 35-45, 2014.

GEBRELIBANOS, M.; TESFAYE, D.; RAGHAVENDRA, Y.; SINTAYEYU, B. Nutritional and health implications of legumes. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 4, p. 1269-1279, 2013.

GERMAIN, J. C.; AGUILERA, J. M. Multi-scale properties of protein-stabilized foams. **Food structure**, v. 1, n. 1, p. 55-70, 2014.

GIL, J.; ALCAMÍ, J.; ESTEBAN, M. Induction of Apoptosis by Double-Stranded-RNA-Dependent Protein Kinase (PKR) Involves the α Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 and NF- κ B. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 7, p. 4653-4663, 1999.

GIULIETTI, A. M.; BOCAGE NETA A. L.; CASTRO, A. A. J. F.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; VIRGÍNIO, J. F.; QUEIROZ, L. P.; FIGUEIREDO, M. A.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V.; HARLEY, R. M. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. (Org.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, 2003, 382 p.

GOLD, K.; MCBURNEY, R. P. H. Conservation of plant diversity for sustainable diets. In: **Sustainable diets and biodiversity**. Directions and solutions for policy, research and action. Proceedings of the International Scientific Symposium Biodiversity and Sustainable Diets United Against Hunger, Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012.

GONZÁLEZ-PÉREZ, S.; ARELLANO, J. B. Vegetable Protein Isolates. *In*: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Ed.). **Handbook of hydrocolloids**. Oxford: Woodhead Publishing Limited e CRC Press, 2009, p. 383-419.

GUIMARÃES, L. M.; MUCHAGATA, R. C. C.; FRAGOSO, R. R.; QUEZADO, M.; VASCONCELOS, I.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Avaliação de biossegurança alimentar das toxinas Cry11a12 e Cry8Ha1 em mamíferos. *In*: **Workshop Interação Molecular Planta-Pragas**, 2., 2007, Brasília, DF, p. 71-74. II Workshop Interação Molecular Planta-Praga. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos, 229, 2007.

HALDER, T. Toxicogenomics - Applications and Future Perspectives. **International Journal of Human Genetics**, v. 13, n. 1, p. 41-46, 2013.

HAYES, K. R.; BRADFIELD, C. A. Advances in Toxicogenomics. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, n. 3, 2005.

HE, X. H.; LIU, H. Z.; LIU, L.; ZHAO, G. L.; WANG, Q.; CHEN, Q. L. Effects of high pressure on the physicochemical and functional properties of peanut protein isolates. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 123-129, 2014.

HENN, R. L.; NETTO, F. M. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3009-3015, 1998.

HIROOKA, Y.; MITSUMA, T.; NOGIMORI, T.; ISHIZUKIS, Y. Effect of hydrocortisone on interleukin-6 production in human, peripheral blood mononuclear cells. **Mediators of Inflammation**, v. 1, p. 9-13, 1992.

HORAX, R.; HETTIARACHCHY, N. S.; CHEN, P.; JALALUDDIN, M. Preparation and Characterization of Protein Isolate from Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Journal of Food Science**, v. 69, n. 2, 2004.

HORAX, R.; HETTIARACHCHY, N.; KANNAN, A.; CHEN, P. Protein extraction optimisation, characterisation, and functionalities of protein isolate from bitter melon (*Momordica charantia*) seed. **Food Chemistry**, v. 124, p. 545-550, 2011.

IPGRI. International Plant Genetic Resources Institute. **Neglected and Underutilized Plant Species: Strategic Action Plan of the International Plant Genetic Resources Institute**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2002.

KAIN, R. J.; CHEN, Z.; SONDA, T. S.; ABU-KPAWOH, J. C. Study on the effect of control variables on the extraction of peanut protein isolates from peanut meal (*Arachis hypogea* L.). **American Journal of Food Technology**, v. 4, n. 1, p. 47-55, 2009.

KAUR, M.; SINGH, N. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. **Food Chemistry**, v. 102, p. 366-374, 2007.

KHOURY, C. K.; BJORKMAN, A. D.; DEMPEWOLF, H.; RAMIREZ-VILLEGAS, J.; GUARINO, L.; JARVIS, A.; RIESEBERG, L. H.; STRUIK, P. C. Increasing homogeneity in global food supplies and the implications for food security. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 111, n. 11, 2014.

- KINSELLA, J. E.; MELACHOURIS, N. Functional properties of proteins in foods: A survey. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 7:3, 219-280, 1976.
- KUMAR, A.; VENKATESU, P. Does the stability of proteins in ionic liquids obey the Hofmeister series? **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 244-253, 2014.
- KUNZ, W.; HENLE, J.; NINHAM, B.W. 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, p. 19-37, 2004.
- L'HOCINE, L.; BOYE, J. I.; ARCAND, Y. Composition and Functional Properties of Soy Protein Isolates Prepared Using Alternative Defatting and Extraction Procedures. **Journal of Food Science**, v. 71, p. C137-C145, 2006.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 689-695, 1970.
- LAJOLO, F. M.; TIRAPGUI, J. Proteínas e aminoácidos. In: DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. (Ed.). **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998.
- LAM, R. S. H.; NICKERSON, M. T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. **Food Chemistry**, v. 141, p. 975-984, 2013.
- LAMB, J. *et al.* The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease. **Science**, v. 313, p. 1929-1935, 2006.
- LAMB, J. The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 54-60, 2007.
- LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Ecologia e conservação da caatinga: uma introdução ao desafio. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: Editora universitária da UFPE, 2003.
- LEITE, E. J. State-of-knowledge on *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) A.C. Smith (Leguminosae-Papilionoideae) for genetic conservation in Brazil. **Journal for Nature Conservation**, v. 13, p. 49-65, 2005.
- LI, W.; SHU, C.; YAN, S.; SHEN, Q. Characteristics of sixteen mung bean cultivars and their protein isolates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1205-1211, 2010.
- LIANG, H. N.; TANG, C. H. pH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 309-319, 2013.
- LIN, K.; KOOLS, H.; GROOT, P. J.; GAVAI, A. K.; BASNET, R. K.; CHENG, F.; WU, J.; WANG, X.; LOMMEN, A.; HOOIVELD, G. J. E. K.; BONNEMA, G.; VISSER, R. G. F.; MULLER M. R.; LEUNISSEN, J. A. M. MADMAX - Management and analysis database for multiple -omics experiments. **Journal of Integrative Bioinformatics**, v. 8, n.2, 160, 2011.

LINDEBOOM, N.; WANASUNDARA, P. K. J. P. D. Interference of phenolic compounds in *Brassica napus*, *Brassica rapa* and *Sinapis alba* seed extracts with the Lowry protein assay. **Food Chemistry**, v. 104, p. 30-38, 2007.

LIU, C.; WANG, X.; MA, H.; ZHANG, Z.; GAO, W.; XIAO, L. Functional properties of protein isolates from soybeans stored under various conditions. **Food Chemistry**, v. 111, p. 29-37, 2008.

LOGISZ, C. C.; HOVIS, J. S. Effect of salt concentration on membrane lysis pressure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1717, 104-108, 2005.

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

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z Editora, 2004.

MANDIMIKA, T.; BAYKUS, H.; POORTMAN, J.; GARZA, C.; KUIPER, H.; PEIJNENBURG, A. Induction of the cholesterol biosynthesis pathway in differentiated Caco-2 cells by the potato glycoalkaloid α -chaconine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1918-1927, 2007.

MARTÍNEZ, K. D. *et al.* Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2149-2157, 2009.

MEDEIROS, J. L. **Caracterização bioquímica e funcional de isolados proteicos e genótipos de excelência de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MENDONÇA, S.; SALDIVA, P. H.; CRUZ, R. J.; ARÊAS, J. A. G. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. **Food Chemistry**, v. 116, p. 738-742, 2009.

MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; GIONGO, V.; PÉREZ-MARIN, A. M. Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga Biome. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3 (suppl.), p. 643-653, 2012.

MORALES-DE LEÓN, J. C.; VÁZQUEZ-MATA, N.; TORRES, N.; GIL-ZENTENO, L.; BRESSANI, R. Preparation and characterization of protein isolate from fresh and hardened beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, 2007.

MORR, C. V. Current Status of Soy Protein Functionality in Food Systems. Papers from the symposium on Functionality of Oilseed and Legume Protein presented at the 78th AOCS annual meeting held in New Orleans, LA, May 17-21, 1987. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, n. 5, 1990.

MOURE, A.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Functionality of oilseed protein products: A review. **Food Research International**, v. 39, p. 945-963, 2006.

MUGENDI, J. B. W.; NJAGI, E. N. M.; KURIA, E. N.; MWASARU, M. A.; MUREITHI, J. G.; APOSTOLIDES, Z. Nutritional quality and physicochemical properties of Mucuna bean (*Mucuna pruriens* L.) protein isolates. **International Food Research Journal**, v. 17, p. 357-366, 2010.

MUNE, M. A. M.; MINKA, S. R.; MBOME, I. L.; ETOA, F. X. Nutritional Potential of Bambara Bean Protein Concentrate. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 10, n. 2, p. 112-119, 2011.

NARSIMHAN, G. Foam formation and stabilization. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 1, p. 759-763, 1996.

NASCIMENTO, V. T.; MOURA, N. P.; VASCONCELOS, M. A. S.; MACIEL, M. I. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Chemical characterization of native wild plants of dry seasonal forests of the semi-arid region of northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2112-2119, 2011.

NASCIMENTO, V. T.; LUCENA, R. F. P.; MACIEL, M. I. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Knowledge and Use of Wild Food Plants in Areas of Dry Seasonal Forests in Brazil. **Ecology of Food and Nutrition**, v. 52, n. 4, 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Committee on Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology. **Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology and Risk Assessment**. Report in Brief. The National Academies Press: Washington, D.C., USA, 2007a.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Committee on Toxicity Testing And Assessment of Environmental Agents. **Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy**. Report in Brief. The National Academies Press: Washington, D.C., USA, 2007b.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Principles of Biochemistry**. 4^a ed. Nova York: Worth Publishers, 2004.

NETHERLANDS TOXICOGENOMICS CENTRE. Disponível em <http://www.toxicogenomics.nl/Research/The_Applied_Systems_Toxicology_Approach>. Acesso em 03 abr. 2014.

NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J. Lentil tannin-globulin and in vitro hydrolysis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n. 3, p. 346-349, 1998.

NITZKE, J. A.; PENNA, N. G.; OLIVERAS, L. Y.; MARTINELLI, S.; FRITZ, A.; DAUDT, C. E.; NOLL, I. B. Segurança alimentar: rompendo barreiras. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 3., 2010, Florianópolis. **Anais...**. Campinas: Ital, 2010. p. 2 - 9. Disponível em: <http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/2010/artigos_bjb_v70ne/02_bjft_v13ne_13e0115.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2014.

NORTH, M.; VULPE, C. D. Functional Toxicogenomics: Mechanism-Centered Toxicology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 4796-4813, 2010.

NUWAYSIR, E. F.; BITTNER, M.; TRENT, J.; BARRETT, J. C.; AFSHARI, C. A. Microarrays and Toxicology: The Advent of Toxicogenomics. **Molecular Carcinogenesis**, v. 24, p. 153-159, 1999.

PAPALAMPROU, E. M.; DOXASTAKIS, G. I.; BILIADERIS, C. G.; KIOSSEOGLOU, V. Influence of preparation methods on physicochemical and gelation properties of chickpea protein isolates. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 337– 343, 2009.

PAREYN, F. G. C.; MARQUES, M. W. C. F.; CRUZ FILHO, J. L. V.; GALLINDO, F. A. T.; BARROS, H. G. L. **Guia de boas práticas de extrativismo sustentável da imburana-de-cheiro**. Recife: Associação Plantas do Nordeste - APNE, 2012, 20p.

PASTOR-CAVADA, E.; JUAN, R.; PASTOR, J. E.; ALAIZ, M.; VIOQUE, M. Protein isolates from two Mediterranean legumes: *Lathyrus clymenum* and *Lathyrus annuus*. Chemical composition, functional properties and protein characterization. **Food Chemistry**, v. 122, p. 533-538, 2010.

PELEGRINE, D. H. G.; GASPARETTO, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, p. 77-80, 2005.

PENNA, P. M. M.; AQUINO, C. F.; CASTANHEIRA, D. D.; BRANDI, I. V.; CANGUSSU, A. S. R.; MACEDO SOBRINHO, E.; SARI, R. S.; DA SILVA, M. P.; MIGUEL, Â. S. M. Biossegurança: uma revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p. 555-565, jul./set., 2010.

PHILLIPS, R. D.; MCWATTERS, K. H.; CHINNAN, M. S.; HUNG, Y. C.; BEUCHAT, L. R.; SEFA-DEDEH, S.; SAKYI-DAWSON, E.; NGODDY, P.; NNANYELUGO, D.; ENWERE, J.; KOMEY, N. S.; LIU, K.; MENSA-WILMOT, Y.; NNANNA, I. A.; OKEKE, C.; PRINYAWIWATKUL, W.; SAALIA, F. K. Utilization of Cowpeas for Human Food. **Field Crops Research**, v. 82, p. 193-213, 2003.

PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Introduction to food proteins *In*: _____ (Ed.) **Handbook of food proteins**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 222. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2011.

PORRAS-SAAVEDRA, J.; GUEMEZ-VERA, N.; MONTAÑEZ-SOTO, J. L.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, M. C.; YAÑEZ-FERNÁNDEZ, J. Comparative study of functional properties of protein isolates obtained from three *Lupinus* species. **Advances in Bioresearch**, v. 4, n. 4, p. 106-116, 2013.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. *In* LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: Editora universitária da UFPE, 2003.

PROSKY, L.; ASP, N. -G.; SCHWEIZER, T. F.; DEVRIES, J. W.; FURDA, I. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory study. **Journal of AOAC International**. v. 71. p. 1017-1023. 1988.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

QUEIROZ, L. P.; LAVIN, M. Coursetia (Leguminosae) from Eastern Brazil: Nuclear Ribosomal and Chloroplast DNA Sequence Analysis Reveal the Monophyly of Three Caatinga-Inhabiting Species. **Systematic Botany**, v.36, n. 1, p. 69-79, 2011.

RABETAFIKA, H. N.; REMOORTEL, V. V.; DANTHINE, S.; PAQUOT, M.; BLECKER, C. Flaxseed proteins: food uses and health benefits. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 221-228, 2011.

RAGAB, D. M.; BABIKER, E. E.; EL TINAY, A. H. Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. **Food Chemistry**, v. 84, p. 207-212, 2004.

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 Chemistry**, v. 87, p. 491-499, 2004.

RIVERSIDE. Disponível em < <http://www.riversidegardencentre.co.uk/bbq/alexander-rose-roble-garden-furniture-companion-set.html>>. Acesso em 05 abr. 2014.

RUI, X.; BOYE, J. I.; RIBEREAU, S.; SIMPSON, B. K.; PRASHER, S. O. Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties. **Food Research International**, v. 44, p. 2497-2504, 2011.

SAMANTA, T. D.; LASKAR, S. Functional properties of *Erythrina variegata* Linn. seed protein isolate. **Journal of Applied Chemical Research**, v. 15, p. 19-28, 2010.

SAMPAIO, E. V. S. B. Características e Potencialidades. In GARIGLIO, M. A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; CESTARO, L. A.; KAGEYAMA, P. Y., (Org.). **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010, 368p.

SANTOS, J. C.; LEAL, I. R.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; FERNANDES, G. W.; TABARELLI, M. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**, v. 4, n. 3, p. 276-286, 2011.

SANTOS, J. P.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Richness and distribution of useful woody plants in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 72, n. 5, p. 652-663, 2008.

SCARAFONI, A.; MAGNI, C.; DURANTI, M. Molecular nutraceuticals as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 454-463, 2007.

SCHILTER, B.; HOLZHKSER, D.; CAVIN, C.; HUGGETT, A. C. An integrated *in vivo* and *in vitro* strategy to improve food safety evaluation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 327-332, 1996.

SHAN, Y.; MA, M.; HUANG, X.; GUO, Y.; JIN, G.; JIN, Y. Simple pH Treatment as an Effective Tool to Improve the Functional Properties of Ovomucin. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, 2012.

SHARMA, S.; GOYAL, R.; BARWAL, S. Domestic processing effects on physicochemical, nutritional and anti-nutritional attributes in soybean (*Glycine max* L. Merill). **International Food Research Journal**, v. 20, n. 6, p. 3203-3209, 2013.

SHENG, L.; LESHCHYNS'KA, I.; SYTNYK, V. Cell adhesion and intracellular calcium signaling in neurons. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, n. 94, 2013.

SIMON, G. A. **Food Security**: Definition, Four dimensions, History. Basic readings as an introduction to Food Security for students from the IPAD Master, SupAgro, Montpellier attending a joint training programme in Rome from 19th to 24th March 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/fileadmin/templates/ERP/uni/F4D.pdf>>. Acesso em 09 de agosto de 2014.

SINGH, P.; KUMAR, R.; SABAPATHY, S. N.; BAWA, A. S. Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, p. 14-28, 2008.

SINGH, G. D.; WANI, A. A.; KAUR, D.; SOGI, D. S. Characterisation and functional properties of proteins of some Indian chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 778-786, 2008.

SINGH, R. S. G.; OGUNSINA, B.S.; RADHA, C. Protein extractability from defatted *Moringa oleifera* Lam. seeds flour. **Ife Journal of Science**, v. 13, n. 1, 2011.

SINGHAL, P.; KAUSHIK, G.; MATHUR, P. Antidiabetic Potential of Commonly Consumed Legumes: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 655-672, 2014.

SIRTORI, C. R.; GALLI, C.; ANDERSON, J. W.; ARNOLDI, A. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. **Atherosclerosis**, v. 203, p. 8-17, 2009.

SOUZA, P. P.; RESENDE, A. M. M.; AUGUSTI, D. V.; BADOTTI, F.; GOMES, F. C. O.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, R. Artificially-aged cachaça samples characterised by direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 143, p. 77-81, 2014.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1190-1206, 1958.

SUBAGIO, A.; MORITA, N. Effects of protein isolate from hyacinth beans (*Lablab purpureus* (L.) Sweet) seeds on cake characteristics. **Food Science and Technology Research**, v. 14, n. 1, p. 12-17, 2008.

SZALONTAI, B.; NAGY, G.; KRUMOVA, S.; FODOR, E.; PÁLI, T.; TANEVA, S. G.; GARAB, G.; PETERS, J.; DÉR, A. Hofmeister ions control protein dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 4564-4572, 2013.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: Editora universitária da UFPE, 2003.

TAN, E. S.; NGOH, Y. Y.; GAN, C. Y. A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimization. **Food Chemistry**, v. 152, p. 447-455, 2014.

TANG, J.; XIE, J.; SHAO, N.; YAN, Y. The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two in vitro selection methods. **Electrophoresis**, v. 27, p. 1303-1311, 2006.

THARANATHAN, R.N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes - a boon to human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, p. 507-518, 2003.

TIBOLA, C. S.; SANTI, A. Segurança alimentar x segurança de alimentos. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 17, n. 106, p. 39-40, 2008. Disponível em: <http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&id=878>. Acesso em 09 de março de 2014.

TONG, W.; FANG, H.; MENDRICK, D. Toxicogenomics and Cell-Based Assays for Toxicology. **Interdisciplinary Bio Central**, v. 1, n. 10, p. 1-6, 2009.

TOTOSAUS, A.; MONTEJANO, J. G.; SALAZAR, J. A.; GUERRERO, I. A review of physical and chemical protein-gel induction. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 589-601, 2002.

TUNUPA. Disponível em <<http://tunupa.com.br/produto/ground>>. Acesso em 05 abr. 2014.

VAN DER SPIEGEL, M.; NOORDAM, M. Y.; VAN DER FELS-KLERX, H. J. Safety of Novel Protein Sources (Insects, Microalgae, Seaweed, Duckweed, and Rapeseed) and Legislative Aspects for Their Application in Food and Feed Production. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.12, p. 662-678, 2013.

VASCONCELOS, I. M.; MAIA, F. M. M.; FARIAS, D. F.; CAMPELLO, C. C.; CARVALHO, A. F. U.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Protein fractions, amino acid composition and antinutritional constituents of high-yielding cowpea cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 54-60, 2010.

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and Functional Properties of Rice Bran Protein Isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 411-416, 1999.

WAY BEER. Disponível em <<http://www.waybeer.com.br/cerveja/amburana-lager/>>. Acesso em 05 abr. 2014.

WEBER, W. W. Toxicogenomics: History and Current Applications. **ASM News**, v. 70, n. 8, 2004.

WU, W.; SUN, R. Toxicological studies on plant proteins: a review. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 6, p. 377-386, 2012.

WUA, H.; WANG, Q.; MAA, T.; REN, J. Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. **Food Research International**, v. 42, p. 343-348, 2009.

YASUMATSU, K.; SAWADA, K.; MORITAKA, S.; MISAKI, M.; TODA, J.; WADA, T.; ISHII, K. Whipping and Emulsifying Properties of Soybean Products. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, p. 719-727, 1972.

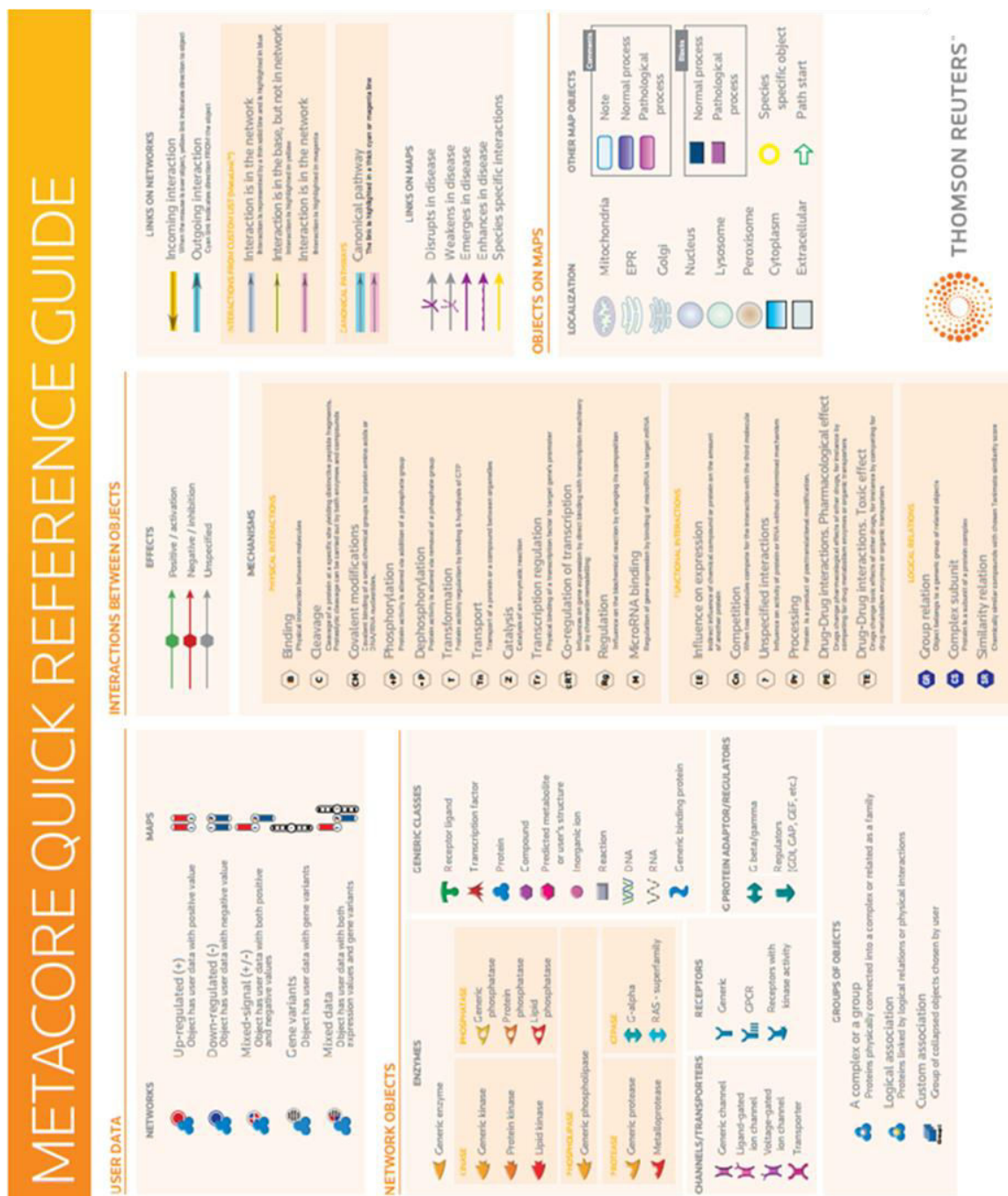
YIN, S.-W.; CHEN, J.-C.; SUN, S.-D.; TANG, C.-H.; YANG, X.-Q.; WEN, Q.-B.; QI, J.-R. Physicochemical and structural characterisation of protein isolate, globulin and albumin from soapnut seeds (*Sapindus mukorossi* Gaertn.). **Food Chemistry**, v. 128, p. 420-426, 2011.

YOSHIE-STARK, Y.; WADA, Y.; WÄSCHE, A. Chemical composition, functional properties, and bioactivities of rapeseed protein isolates. **Food Chemistry**, v. 107, p. 32-39, 2008.

YULIANA, M.; TRUONG, C. T.; HUYNH, L. H.; HO, Q. P.; JU, Y. H.. Isolation and characterization of protein isolated from defatted cashew nut shell: Influence of pH and NaCl on solubility and functional properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 621e626, 2014.

ZHANG, T.; JIANG, B.; MU, W.; WANG, Z. Emulsifying properties of chickpea protein isolates: Influence of pH and NaCl. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 146-152, 2009.

ANEXO A – LEGENDAS PARA AS FIGURAS 3.8 E 3.9. DISPONÍVEL EM <<https://portal.genego.com/legends/MetaCoreQuickReferenceGuide.pdf>>



FONTE: Thomson Reuters.