



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

**GABRIELLE DE PAULA FREIRE**

**ISOLADO PROTEICO DE SEMENTES DE CUMARU [*Amburana cearensis*  
(ALLEMAO) A. C. SMITH] UMA FONTE ALTERNATIVA DE PROTEÍNAS  
VEGETAIS NA ALIMENTAÇÃO**

**FORTALEZA**

**2016**

**GABRIELLE DE PAULA FREIRE**

**ISOLADO PROTEICO DE SEMENTES DE CUMARU [*Amburana cearensis*  
(ALLEMAO) A. C. SMITH]: UMA FONTE ALTERNATIVA DE PROTEÍNAS  
VEGETAIS NA ALIMENTAÇÃO**

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

Área de concentração: Bioquímica.

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

**FORTALEZA**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- F933i Freire, Gabrielle de Paula.  
Isolado proteico de sementes de cumaru [*Amburana cearensis* (Allemao) A. C. Smith] : uma fonte alternativa de proteínas vegetais na alimentação / Gabrielle de Paula Freire. – 2016.  
131 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Profª. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho .
1. Alimento novo. 2. Valor nutricional. 3. Leguminosas. 4. Propriedades funcionais. 5. Conservação da biodiversidade. I. Título.

CDD 572

---

**GABRIELLE DE PAULA FREIRE**

**ISOLADO PROTEICO DE SEMENTES DE CUMARU [*Amburana cearensis*  
(ALLEMAO) A. C. SMITH]: UMA FONTE ALTERNATIVA DE PROTEÍNAS  
VEGETAIS NA ALIMENTAÇÃO**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.  
Área de concentração: Bioquímica.

Aprovada em 06/09/2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Edy Sousa de Brito  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por me dar forças para seguir em frente, e aos meus amigos, pois sem eles eu não teria conseguido dar continuidade a este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, pela disponibilização de todos os recursos e infraestrutura necessários para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho, obrigada pela compreensão, paciência e pelo voto de confiança. A senhora é um grande exemplo e tenho orgulho de ter sido sua orientanda por todos esses anos. MUITÍSSIMO obrigada!

À Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa, obrigada por aceitar participar da minha banca. Sempre a tive como exemplo de pesquisadora de sucesso e agradeço pela oportunidade de ter meu trabalho avaliado por alguém que sempre admirei.

Ao Dr. Edy Sousa de Brito, por aceitar participar da minha banca e por suas contribuições para o trabalho.

À Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas e ao Dr. Renato de Azevedo Moreira, agradeço por terem aceitado o convite para serem suplentes na avaliação deste trabalho.

À Dra. Flávia Almeida Santos, agradeço pela compreensão neste conturbado momento que foi o final de minha dissertação. Obrigada por todo o apoio para que eu finalizasse minhas obrigações com a pós- graduação em bioquímica.

Ao Davi Felipe Farias por todos os momentos de ensinamentos. Você é um exemplo de cientista. Parabéns pelo grande profissional que é.

À Nathanna Mateus de Sousa, obrigada por todos os momentos de trabalho, ensinamentos, puxões de orelha, conversas e risadas. Aprendi muitas coisas com você, tanto no meio acadêmico, como no meio profissional e no pessoal.

A todos os professores que ministraram disciplinas para o curso de Bioquímica, pelos conhecimentos transmitidos, especialmente à Profa. Ilka Maria Vasconcelose ao Prof. José Tadeu Abreu de Oliveira, aos quais tenho como grandes professores e profissionais.

À Coordenação do curso de Bioquímica e, em particular, aos secretários Vanda Eunice L. Moreira e Pedro Henrique Pereira de Alencar, que sempre se mostraram disponíveis e atenciosos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec), Luiz Carlos Almeida, Pedro Matheus Sousa, Lady Clarissa Brito, Jackeline Medeiros, Thiago Almeida, Emanuel Francelino e Leonardo Vieira pela amizade, companheirismo e pelos maravilhosos “momentos de bancada” e diversão na copa do Bioprospec.

Ao Joaquim Lopes, obrigado por sempre me ajudar durante os experimentos. Pela paciência para as perguntas bobas e por sempre mostrar-se disponível.

À Thaís Borges, não preciso nem comentar muita coisa, a “melhor IC” que na verdade se tornou uma grande amiga. Este trabalho não poderia ter sido realizado sem a sua ajuda. Agradeço imensamente por todos os momentos de trabalho e de diversão. MUITÍSSIMO obrigada, amiga, esta dissertação também é sua.

Aos colegas do novo laboratório (LPN), Ana Luiza, Tuelly Bandeira, Ana Flávia, Rose Anny, Karina Moura, Milena Braga, Iury Nunes, Ana Patrícia, Wesley Alves, Amanda Braga, Mirela Magalhães e Agueina Rocha, por terem me recebido tão bem neste novo ambiente de trabalho, pelas comilanças e pela amizade.

À Francisca Berenice e José Valdenor, obrigada pela ajuda e por estarem sempre disponíveis.

Aos meus colegas e amigos do curso de Bioquímica, Hugo Leite, Thaís Andrade e Fernanda Rodrigues, por terem tornado as aulas de início do mestrado bem mais agradáveis.

À Raquel Ribeiro, Camila França, Diego Holanda, em especial a Nayane Galdino, Anne Marques e Larissa Rodrigues, muito obrigada por todos os momentos e pela grande amizade. Apesar de estarmos longe neste último período, tenho certeza que a melhor comemoração será com vocês.

As Á-gatas, Diogo Fontenele, Lucas Falcão e Lucas Galeno, obrigada por tornarem os finais de semana mais alegres. Sem a ajuda de vocês não sei se teria “sanidade” para continuar escrevendo. Vocês tiveram papel fundamental na realização deste trabalho pois a amizade de vocês me fez mais forte na hora de escrever.

As Sammyas, alguns meus amigos há mais de dez anos: Ednaldo Gonzaga, Juliana Viveiros, Raquel Ribeiro; outros agregados ao grupo: Jefferson Alves, Allan Hatts, Juliana Rabelo (gatinha), Victor Azevedo e Gabriel Araújo. Obrigada por estarem sempre presentes e alegrando meus finais de semana e feriados. As melhores viagens sempre são com vocês.

Às minhas amigas da época do ensino médio, Mariana Dias, Laís Lima, Maxiane Freitas e Mônica Damasceno. Apesar da distância e de sempre adiarmos os encontros, sempre que dá certo é maravilhoso meninas.

À Rafaelle de Paula, apesar das brigas no final a gente sempre acaba se entendendo. Obrigada pelas conversas e por sempre estar por perto.

À Cristal Melissa, obrigada por sempre estar disposta a me ajudar, principalmente na hora de arrumar o quarto e comprar/ fazer “gordices”, apesar de puxar sua orelha algumas vezes, mas é porque me importo muito com você. Tem que estudar sim.

Aos meus pais, Gilvan Freire e Solange de Paula, obrigada pelo apoio e por entender que eu preciso de silêncio para estudar/ escrever. Sei que estes últimos meses não foram fáceis para nenhum de nós.

Ao namorado, Thiago Barroso, obrigada por sempre estar ao meu lado, se mostrar disponível e por até “passar meus resultados para o computador”, me ajudando na hora de escrever. Apesar de termos pouco tempo de convivência, sempre me pego pensando em nosso relacionamento e me sentindo imensamente feliz por ter encontrado alguém como você. #vocefazfeliz.

Por último, mas primeiramente importante, agradeço a Deus e a Nossa Senhora, pela força nos momentos difíceis e pela fé de que as coisas iriam melhorar.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições e unidades:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Instituto Nacional do Semiárido (INSA) por financiar o projeto intitulado “Valorização de espécies vegetais de áreas semiáridas susceptíveis à desertificação no estado do Ceará: desenvolvimento de bioprodutos alimentícios e inseticidas/repelentes com elevado valor socioambiental agregado”;

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela bolsa de estudos;

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

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



“Se é fácil desconfie, se é difícil concretize”

(Max Roberto)

## RESUMO

A necessidade de minimizar os riscos relacionados ao consumo de alimentos de origem animal, o crescente aumento populacional e o número de indivíduos que passam fome no mundo, chamam atenção para a necessidade da busca de novas fontes de nutrientes, em especial de proteínas vegetais. *Amburana cearensis* é uma espécie subutilizada de leguminosa da Caatinga, com sementes ricas em proteínas e alto potencial de aproveitamento nutricional, que nos instigou à busca de sua utilização na forma de isolados proteicos, os quais são cada vez mais comuns na indústria de alimentos. Este trabalho visou a produção de um isolado proteico obtido a partir destas sementes (PIAc), a caracterização bioquímica e funcional deste isolado e a avaliação de sua segurança de uso, comparando-o com um isolado proteico de soja já comercializado. Foram conduzidas análises para a determinação das condições ideais de extração proteica, composição proximal, composição de aminoácidos, escore químico dos aminoácidos, digestibilidade *in vitro*, detecção de fatores tóxicos e/ou antinutricionais de natureza proteica, atividade antioxidante, propriedades funcionais e avaliação de toxicidade. As condições determinadas ideais foram: extração com água, pH 9,0; proporção 1:20 (m/v) durante 20 min e precipitação proteica em pH 5,5. Com relação à caracterização bioquímica do isolado, a composição proximal de PIAc foi de  $97,86 \pm 0,96\%$  de proteínas,  $0,38 \pm 0,03\%$  de lipídios,  $2,2 \pm 0,07\%$  de cinzas e  $3,51 \pm 0,27\%$  de carboidratos. O rendimento bruto e líquido de proteínas foi de 17,85% e 53,96%, respectivamente. A composição de aminoácidos mostrou que além de possuir grande quantidade de proteínas, PIAc também apresenta boa composição aminoacídica. A digestibilidade ( $58,26 \pm 0,02\%$ ) e o escore químico de aminoácidos (0,296) do isolado desenvolvido se mostraram similares àqueles do isolado de soja comercial utilizado para comparação. Não foi detectada a presença de lectinas ou atividade antioxidante em PIAc, nas concentrações testadas. O isolado apresentou inibidores de tripsina e quimotripsina, com  $17,28 \pm 0,07$  e  $11,7 \pm 0,56$  UI/ mg de proteína, respectivamente. Com relação às propriedades funcionais, os resultados observados foram: solubilidade de  $86,4 \pm 4,7\%$ ; capacidade de absorção de água  $3,08 \pm 0,11$  g água/g amostra; capacidade de absorção de óleo  $2,98 \pm 0,08$  g óleo/g amostra; atividade emulsificante / estabilidade da emulsão  $53,79 \pm 1,31 / 52,38 \pm 0,0\%$ ; atividade espumante e estabilidade da espuma  $139,4 \pm 11,06$  e  $64,86 \pm 2,56\%$  (T0 e 120 min.); menor concentração geleificante (MCG) de 10%, superando o isolado de soja comercializado em todas as propriedades, com exceção da capacidade de absorção de água. Em relação à avaliação de toxicidade, não foi detectada a presença de atividade hemolítica ou toxicidade aguda em PIAc. No experimento

de toxicidade de doses repetidas, não foram detectadas alterações no ganho de peso, consumo de alimento, parâmetros hematológicos ou análise histopatológica dos órgãos, pequenas alterações foram encontradas nos parâmetros bioquímicos do isolado produzido e do isolado de soja comercial. Podemos concluir, portanto, que o isolado proteico de *A. cearensis* produzido possui grande potencial nutricional e funcional para ser introduzido na indústria alimentícia, não apresentando indícios de toxicidade. Trata-se de um bioproduto muito promissor, que requer mais estudos, porém chama atenção para as grandes riquezas subexploradas do bioma Caatinga.

**Palavras-chave:** Alimento novo. Valor nutricional. Leguminosas. Propriedades funcionais. Conservação da biodiversidade.

## ABSTRACT

The need to minimize health problems related to consumption of animal food and the significance of providing evidence for the richness of Caatinga biodiversity called attention to the search for new sources of plant protein in wild plants. *Amburana cearensis* is an underutilized species of legume from Caatinga, with seeds rich in protein and high nutritional potential that prompted us to investigate their use as protein isolates, increasingly common in the food industry. Thus the aim of the present work was to obtain a protein isolate from these seeds (PIAc), to perform a biochemical and functional characterization as well as to assess the safety of use, comparing it with an already marketed protein isolate. Analyses were conducted to elucidate the optimal conditions for protein extraction, proximal and amino acid composition, amino acids chemical score, *in vitro* protein digestibility, detection of toxic and/or antinutritional factors of protein nature, antioxidant activity, functional properties and assessing toxicity. The optimal extraction conditions were with water, pH 9.0; 1:20 (w / v) for 20 min, followed by protein precipitation at pH 5.5. The PIAc showed  $97.86 \pm 0.96\%$  protein,  $0.38\% \pm 0.03$ ,  $2.2 \pm 0.07\%$  ash and  $3, 51 \pm 0.27\%$  carbohydrates. The gross and net yield of protein was 17.85 and 53.96%, respectively. The digestibility ( $58.26 \pm 0.02\%$ ) and the chemical amino acid score (0.296) was similar to those of commercial soybean protein isolate. No lectins or antioxidant activity was detected in PIAc however the isolate showed trypsin ( $17.28 \pm 0.07$ ) and chymotrypsin inhibitors ( $11.7 \pm 0.56$  IU / mg protein). As to the functional properties, its solubility was  $86.4 \pm 4.7\%$ ; water absorption capacity,  $3.08 \pm 0.11$  g water/g sample; oil absorption capacity,  $2.98 \pm 0.08$  g oil/g sample; emulsifying activity/emulsion stability  $53.79 \pm 1.31$  /  $52.38 \pm 0.0\%$ ; foaming activity/stability,  $139.4 \pm 11.06$ /  $64.86 \pm 2.56\%$  (T0 and 120 min.) and gelling lower concentration (MCG), 10%. All these properties, except that of absorbing water were superior to those of the soybean protein isolate. Regarding the toxicity, no hemolytic activity or acute toxicity was detected in PIAc. In the repeated dose toxicity assay, no changes were observed in weight gain, food intake, hematological parameters or in histopathology of organs. Apparently irrelevant changes were found in some biochemical parameters in PIAc as well as in the commercial soybean protein isolate. Thus, we conclude that PIAc has a high nutritional and functional potential to be introduced in the food industry, showing no significant signs of toxicity. This is a very promising bioproduct, which requires further study, but draws attention to the great underexploited richness of Caatinga.

**Keyword:** Novel foods. Nutritional value. Legume seeds. Functional properties.  
biodiversity conservation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Semiárido nordestino. Detalhe mostra a localização no mapa do Brasil.....	28
Figura 2-	Planta adulta, folhas, flores e sementes de <i>Amburana cearensis</i> (Allemao) A. C. Smith. A) Planta adulta com a folhagem B) Folhas C) Flores D) Sementes aladas (secas) E) Detalhe das sementes.....	32
Figura 3-	Usos populares de <i>Amburana cearensis</i> (Allemao) A. C. Smith. A) Xarope de cumaru (fitoterápico) B) Lambedor de cumaru com alho (fitoterápico) C) Óleo essencial de cumaru para aromoterapia D) Móveis feitos com madeira de cumaru E) Tonel de madeira fabricado com madeira de cumaru.....	33
Figura 4-	Precipitação isoeletrica das proteínas presentes no extrato bruto da farinha desengordurada de <i>Amburana cearensis</i> .....	52
Figura 5-	Secagem por atomização (spray drying) do isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> produzido. Velocidade de 0,5 L por hora, fluxo de ar 4, temperatura de entrada de 160 °C e temperatura de saída de 100 °C.....	53
Figura 6-	Perfil eletroforético das proteínas do extrato bruto das sementes de <i>Amburana cearensis</i> produzido em pH 7; 8; 8,5; 9; 9,5 e 10.....	69

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Efeito da variação de pH sobre a extração proteica da farinha desengordurada de <i>Amburana cearensis</i> - FDAc (extração em água destilada ajustada para diferentes pH, extração por 1 h, proporção 1:50 m/v, temperatura ambiente).....	68
Gráfico 2-	Efeito da adição de diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) sobre a quantidade de proteínas solúveis extraídas da farinha desengordurada de <i>Amburana cearensis</i> - FDAc (extração em pH 9,0; por 1 h, proporção 1:50 m/v, temperatura ambiente).....	71
Gráfico 3-	Efeito da proporção farinha/solução extratora e da reextração sobre a quantidade de proteínas extraídas a partir da farinha desengordurada de <i>Amburana cearensis</i> - FDAc (extração em água destilada ajustada para pH 9,0; por 1 h, temperatura ambiente).....	72
Gráfico 4-	Efeito do tempo sobre a quantidade de proteínas extraídas da farinha desengordurada de <i>Amburana cearensis</i> - FDAc (extração em diferentes intervalos de tempo com água destilada ajustada para pH 9,0; proporção 1:50 m/v, temperatura ambiente).....	74
Gráfico 5-	Efeito da variação de pH sobre a extração proteica da farinha desengordurada de <i>Amburana cearensis</i> - FDAc (extração em água destilada ajustada para diferentes pH, extração por 1 h, proporção 1:50 m/v, temperatura ambiente).....	76
Gráfico 6-	Digestibilidade proteica in vitro (%). PIAC: Isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> e PIS: Isolado proteico de soja.....	85
Gráfico 7-	Perfil de solubilidade do nitrogênio. PIAC: Isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> e PIS: Isolado proteico de soja.....	95
Gráfico 8-	Capacidade de absorção de água (CAA). PIAC: Isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> e PIS: Isolado proteico de soja.....	98
Gráfico 9-	Capacidade de absorção de óleo (CAO). PIAC: Isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> e PIS: Isolado proteico de soja.....	100
Gráfico 10-	Atividade emulsificante (AEm) e estabilidade da emulsão (EEm) após 30 minutos a 80°C. PIAC: Isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> e PIS: Isolado proteico de soja.....	102

Gráfico 11-	Atividade espumante (AEs) e estabilidade da espuma (EEs) em T0 e após 30, 60, 90 e 120 minutos. PIAC: Isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> e PIS: Isolado proteico de soja.....	103
Gráfico 12-	Comparação do ganho de peso de camundongos fêmeas que receberam em dose única via oral PIAC, PIS ou solução salina, todas na concentração de 2.000 mg/ kg de peso do animal.....	109
Gráfico 13-	Comparação do ganho de peso de ratos machos que receberam dose repetida via oral de PIAC, PIS ou solução salina, todas na concentração de 1.000 mg/ kg/ por dia.....	111
Gráfico 14-	Comparação do ganho de peso de ratos fêmeas que receberam dose repetida via oral de PIAC, PIS ou solução salina, todas na concentração de 1.000 mg/ kg/ por dia.....	112



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Teor de umidade e composição proximal da farinha integral de <i>Amburana cearensis</i> (FIAC), isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> (PIAc) e isolado proteico de soja (PIS). Umidade, proteínas totais e teor de lipídios da farinha desengordurada de <i>Amburana cearensis</i> (FDAC). Comparação com valores mínimo e máximo encontrados em estudo realizado com 14 espécies subutilizadas de leguminosas da Caatinga.....	78
Tabela 2-	Composição aminoacídica (g/100 g P) da farinha desengordurada de <i>Amburana cearensis</i> (FDAC) e do seu isolado proteico (PIAc) comparadas a um isolado proteico de soja (PIS) e às necessidades nutricionais de crianças de 2 a 5 e de 6 a 12 anos.....	82
Tabela 3-	Escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS) - PIAc: Isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> . PIS: Isolado proteico de soja.....	87
Tabela 4-	Análise da presença de lectinas em PIAc (Isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> ) e PIS (Isolado proteico de soja) em diferentes concentrações (8 a 1.000 µg/mL).....	89
Tabela 5-	Inibidores de tripsina e quimotripsina presentes no extrato bruto dos isolados PIAc (Isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> ) e PIS (Isolado proteico de soja).....	91
Tabela 6-	Atividade antioxidante (DPPH) presente na vitamina C, PIAc (Isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> ) e PIS (Isolado proteico de soja). Ensaio realizado em diferentes concentrações (8 a 1.000 µg/mL).....	93
Tabela 7-	Determinação da menor concentração geleificante (MCG) de PIAc (Isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> ) e PIS (Isolado proteico de soja).....	106
Tabela 8-	Atividade hemolítica em hemácias do homem, rato e coelho frente à exposição aos isolados PIAc (Isolado proteico de <i>Amburana cearensis</i> ) e PIS (Isolado proteico de soja) em diferentes concentrações (8 a 2.000 µg/mL).....	108

Tabela 9-	Parâmetros hematológicos de ratos machos submetidos a dose oral repetida de PIAC, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/ kg/ por dia, durante 28 dias.....	114
Tabela 10-	Parâmetros hematológicos de ratos fêmeas submetidos a dose oral repetida de PIAC, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/ kg/ por dia, durante 28 dias.....	115
Tabela 11-	Parâmetros bioquímicos séricos de ratos machos submetidos a dose oral repetida de PIAC, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/ kg/ por dia, durante 28 dias.....	116
Tabela 12-	Parâmetros bioquímicos séricos de ratos fêmeas submetidos a dose oral repetida de PIAC, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/ kg/ por dia, durante 28 dias.....	117
Tabela 13-	Peso úmido relativo (%) de órgãos de ratos machos submetidos a dose oral repetida de PIAC, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/ kg/ por dia, durante 28 dias.....	120
Tabela 14-	Peso úmido relativo (%) de órgãos de ratos fêmeas submetidos a dose oral repetida de PIAC, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/ kg/ por dia, durante 28 dias.....	121

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácido
Abs	Absorbância
AEm	AtividadeEmulsificante
AEs	Atividade Espumante
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	“Association of Official Analytical Chemistry” (Associação de Química Analítica Oficial)
Bioprospec	Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais
BSA	“Bovin Serum Albumin” (Albumina Sérica Bovina)
CAA	Capacidade de Absorção de Água
CAO	Capacidade de Absorção de Óleo
CLA	Capacidade de Ligação a Água
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLO	Capacidade de Ligação a Óleo
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazila
EB	Extrato Bruto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEm	Estabilidade da Emulsão
EES	Estabilidade da Espuma
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDAC	Farinha Desengordurada de <i>Amburana cearensis</i>
FIAc	Farinha Integral de <i>Amburana cearensis</i>
IC <sub>50</sub>	Concentração necessária para inibir 50% dos radicais livres
LOSAN	Lei Orgânica de Segurança Alimentar e Nutricional
MCG	Menor Concentração Geleificante
OECD	“Organization of Economic Cooperation and Development” (Organização de Cooperação e Desenvolvimento Economico)
PAGE	“Polyacrylamide Gel Electrophoresis” (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)
PDCAAS	“Protein Digestibility Corrected Amino Score” (Escore Químico de Aminoácidos Corrigido pela Digestibilidade Proteica)

PI	Ponto Isoelétrico
PIAc	“Protein isolate of <i>Amburana cearensis</i> ” (Isolado Proteico de <i>Amburana cearensis</i> )
PIS	“Protein isolate of soybean” (Isolado Proteico de Soja)
SDS	“Sodium Dodecil Sulfate” (Dodecil Sulfato de Sódio)
UH	Unidade Hemolítica
UI	Unidades de Inibição

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>25</b>
<b>1.1</b>	<b>O problema da alimentação mundial</b>	<b>25</b>
<b>1.2</b>	<b>Semiárido nordestino – O bioma caatinga</b>	<b>27</b>
<i>1.2.1</i>	<i>Valorização da biodiversidade e potencial regional</i>	<i>29</i>
<i>1.2.2</i>	<i>Cumaru [(<u>Amburana cearensis</u> (Allemao) A. C. Smith)]</i>	<i>31</i>
<b>1.3</b>	<b>Proteínas vegetais</b>	<b>34</b>
<i>1.3.1</i>	<i>Isolados proteicos de origem vegetal</i>	<i>35</i>
<i>1.3.2</i>	<i>Ingredientes funcionais</i>	<i>36</i>
<i>1.3.2.1</i>	<i>Solubilidade</i>	<i>36</i>
<i>1.3.2.2</i>	<i>Capacidade de absorção de água</i>	<i>37</i>
<i>1.3.2.3</i>	<i>Capacidade de absorção de óleo</i>	<i>38</i>
<i>1.3.2.4</i>	<i>Propriedades emulsificantes</i>	<i>38</i>
<i>1.3.2.5</i>	<i>Atividade espumante</i>	<i>39</i>
<i>1.3.2.6</i>	<i>Geleificação</i>	<i>39</i>
<b>1.4</b>	<b>Segurança de uso de proteínas vegetais</b>	<b>40</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos gerais</b>	<b>43</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenção e processamento das sementes de <i>A. cearensis</i></b>	<b>44</b>
<b>3.2</b>	<b>Isolado proteico de soja</b>	<b>44</b>
<b>3.3</b>	<b>Reagentes químicos e outros materiais</b>	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b>Materiais biológicos</b>	<b>45</b>
<i>3.4.1</i>	<i>Suspensão de eritrócitos</i>	<i>45</i>
<i>3.4.2</i>	<i>Animais de laboratório</i>	<i>45</i>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Obtenção dos isolados proteicos</b>	<b>47</b>
<i>4.1.1</i>	<i>pH de extração proteica</i>	<i>47</i>
<i>4.1.2</i>	<i>Degradação de proteínas em virtude do pH</i>	<i>47</i>
<i>4.1.3</i>	<i>Presença e concentração de sal durante a extração</i>	<i>48</i>
<i>4.1.4</i>	<i>Proporção FDAc/Solvente</i>	<i>49</i>

<b>4.1.5</b>	<b><i>Reextração da amostra</i></b>	49
<b>4.1.6</b>	<b><i>Tempo de extração</i></b>	49
<b>4.1.7</b>	<b><i>pH de precipitação de proteínas</i></b>	50
<b>4.1.8</b>	<b><i>Produção do isolado proteico</i></b>	50
<b>4.1.9</b>	<b><i>Determinação do rendimento bruto e rendimento líquido de proteínas</i></b>	51
<b>4.2</b>	<b>Caracterização bioquímica e nutricional</b>	51
<b>4.2.1</b>	<b><i>Teor de umidade</i></b>	51
<b>4.2.2</b>	<b><i>Composição proximal</i></b>	54
<b>4.2.2.1</b>	<b><i>Proteínas totais</i></b>	54
<b>4.2.2.2</b>	<b><i>Lipídios totais</i></b>	54
<b>4.2.2.3</b>	<b><i>Matéria mineral</i></b>	54
<b>4.2.2.4</b>	<b><i>Carboidratos totais e carboidratos digeríveis</i></b>	55
<b>4.2.2.5</b>	<b><i>Fibra alimentar total</i></b>	55
<b>4.2.3</b>	<b><i>Quantificação de proteínas solúveis</i></b>	56
<b>4.2.4</b>	<b><i>Determinação da composição de aminoácidos</i></b>	56
<b>4.2.5</b>	<b><i>Digestibilidade <u>in vitro</u></i></b>	57
<b>4.2.6</b>	<b><i>PDCAAS (score de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica)</i></b>	58
<b>4.2.8</b>	<b><i>Fatores tóxicos e/ou antinutricionais</i></b>	58
<b>4.2.8.1</b>	<b><i>Lectinas</i></b>	58
<b>4.2.8.2</b>	<b><i>Inibidores de tripsina</i></b>	59
<b>4.2.8.3</b>	<b><i>Inibidores de quimotripsina</i></b>	59
<b>4.2.9</b>	<b><i>Atividade antioxidante</i></b>	60
<b>4.2.9.1</b>	<b><i>Sequestro do Radical DPPH (difenil-picril-hidrazil)</i></b>	60
<b>4.3</b>	<b>Perfil de solubilidade e propriedades funcionais</b>	60
<b>4.3.1</b>	<b><i>Perfil de solubilidade do nitrôgenio</i></b>	60
<b>4.3.2</b>	<b><i>Capacidade de absorção de água (CAA)</i></b>	61
<b>4.3.3</b>	<b><i>Capacidade de absorção de óleo (CAO)</i></b>	61
<b>4.3.4</b>	<b><i>Atividade emulsificante (AEm) e estabilidade da emulsão (EEm)</i></b>	62
<b>4.3.5</b>	<b><i>Atividade espumante (AEs) e estabilidade da espuma (EEs)</i></b>	62
<b>4.3.6</b>	<b><i>Menor concentração geleificante (MCG)</i></b>	63
<b>4.4</b>	<b>Avaliação toxicológica</b>	63
<b>4.4.1</b>	<b><i>Atividade hemolítica</i></b>	63
<b>4.4.2</b>	<b><i>Toxicidade oral aguda</i></b>	64
<b>4.4.3</b>	<b><i>Toxicidade oral de doses repetidas</i></b>	64

4.4.3.1	<i>Determinação de parâmetros hematológicos</i>	65
4.4.3.2	<i>Determinação de parâmetros bioquímicos</i>	65
4.4.3.3	<i>Determinação do peso úmido relativo dos órgãos</i>	66
4.4.3.4	<i>Análises histopatológicas</i>	66
<b>4.5</b>	<b>Análise estatística</b>	66
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	67
<b>5.1</b>	<b>Obtenção dos isolados proteicos</b>	67
5.1.1	<i>pH de extração proteica</i>	67
5.1.2	<i>Degradação de proteínas em virtude do pH</i>	67
5.1.3	<i>Presença e concentração de sal durante a extração</i>	70
5.1.4	<i>Proporção FDAc/Solvente e necessidade de reextração da amostra</i>	70
5.1.5	<i>Tempo de extração</i>	73
5.1.6	<i>pH de precipitação de proteínas</i>	75
5.1.7	<i>Produção do isolado proteico</i>	75
5.1.8	<i>Determinação do rendimento bruto e rendimento líquido de proteínas</i>	77
<b>5.2</b>	<b>Caracterização bioquímica e nutricional</b>	77
5.2.1	<i>Teor de umidade e composição proximal</i>	77
5.2.2	<i>Determinação da composição de aminoácidos</i>	81
5.2.3	<i>Digestibilidade <u>in vitro</u></i>	84
5.2.4	<b>PDCAAS</b>	86
5.2.5	<i>Fatores tóxicos e/ou antinutricionais</i>	88
5.2.5.1	<i>Lectinas</i>	88
5.2.5.2	<i>Inibidores de tripsina</i>	90
5.2.5.3	<i>Inibidores de quimotripsina</i>	90
5.2.6	<i>Atividade antioxidante</i>	92
5.2.6.1	<i>Sequestro do Radical DPPH (difenil-picril-hidrazil)</i>	92
<b>5.3</b>	<b>Perfil de solubilidade e propriedades funcionais</b>	94
5.3.1	<i>Perfil de solubilidade do nitrogênio</i>	94
5.3.2	<i>Capacidade de absorção de água (CAA)</i>	96
5.3.3	<i>Capacidade de absorção de óleo (CAO)</i>	96
5.3.4	<i>Atividade emulsificante (AEm) e estabilidade da emulsão (EEm)</i>	101
5.3.5	<i>Atividade espumante (AEs) e estabilidade da espuma (EEs)</i>	101
5.3.6	<i>Menor concentração geleificante (MCG)</i>	105

<b>5.4</b>	<b>Avaliação toxicológica</b>	107
<b>5.4.1</b>	<i>Atividade hemolítica</i>	107
<b>5.4.2</b>	<i>Toxicidade oral aguda</i>	107
<b>5.4.3</b>	<i>Toxicidade oral de doses repetidas</i>	110
<b>5.4.3.1</b>	<i>Determinação de parâmetros hematológicos</i>	113
<b>5.4.3.2</b>	<i>Determinação de parâmetros bioquímicos</i>	113
<b>5.4.3.3</b>	<i>Determinação do peso úmido relativo dos órgãos</i>	119
<b>5.4.3.4</b>	<i>Análises histopatológicas</i>	119
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	122
	<b>REFERÊNCIAS</b>	123



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O problema da alimentação mundial

Não há comida suficiente no mundo para alimentar todos. A produção de alimentos está subindo de forma constante e proporcionalmente superior ao crescimento populacional, mesmo assim, cerca de 925 milhões de pessoas passam fome no mundo. No centro do problema estão a pobreza e a falta de poder, que impedem o acesso a alimentos nutritivos. Esta situação é agravada pela degradação constante dos solos, da água doce, dos oceanos e da biodiversidade (NAÇÕES UNIDAS, 2012).

De acordo com as últimas estimativas da FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), foram feitos avanços importantes para a erradicação da fome. Os países em desenvolvimento, que representam a grande maioria da subalimentação mundial, são parte deste progresso. Apesar deste progresso geral no conjunto de países em desenvolvimento, muito mais ainda pode ser feito para reduzir a subalimentação e melhorar a segurança alimentar da população (FAO, 2014).

Os países em desenvolvimento, como o Brasil, são particularmente vulneráveis aos impactos negativos das mudanças climáticas, tais como “estresse” hídrico ou a seca, que comprometem seriamente a segurança alimentar e os esforços para erradicar a pobreza (NAÇÕES UNIDAS, 2012). Segundo a Lei Orgânica de Segurança Alimentar e Nutricional (LOSAN), segurança alimentar e nutricional é:

A realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras da saúde que respeitem a diversidade cultural e que sejam ambiental, cultural, econômica e socialmente sustentáveis (LOSAN, art. 3º).

Um compromisso político constante ao mais alto nível, que considere a segurança alimentar e nutricional como prioridade principal, é um pré-requisito para a erradicação da fome no mundo (FAO, 2014).

As proteínas são consideradas o macronutriente mais importante para os seres humanos, sendo a desnutrição proteico-energética o maior problema nutricional mundial, especialmente nos países em desenvolvimento (HAN *et al.*, 2015). A prevalência de proteína animal na dieta ocidental tem se tornado bastante inconveniente desde que a sua produção é menos eficiente, mais cara e consome muito mais água do que a produção de proteína vegetal em mesma quantidade. Não somente por esses fatores, segundo a FAO (2014), de todas as

atividades humanas, a pecuária também é a maior responsável por erosão de solos, desmatamento e contaminação de mananciais aquíferos. A pecuária utiliza 30% das terras produtivas do planeta, sendo que outros 33% são destinados à produção de grãos utilizados para alimentar esses animais. Dietas baseadas em proteína animal são um problema insustentável a longo prazo (SLYWITCH, 2012).

Os países ricos possuem uma ingestão calórica insustentável e desproporcionalmente alta, baseando-se, principalmente, em proteínas de origem animal (NAÇÕES UNIDAS, 2012). O interesse no potencial de utilização de proteínas a partir de fontes de vegetais e de biomassa subutilizadas tem aumentado nos últimos anos (HAN *et al.*, 2015). A mudança nos hábitos alimentares direcionada para uma dieta com maior participação de alimentos de origem vegetal parece ser indiscutível, entretanto as carnes, especialmente a bovina, são alimentos muito valorizados pela sociedade ocidental (TAKEUTI; OLIVEIRA, 2013). Melhores hábitos alimentares devem ser estimulados para contornar problemas relacionados à produção de proteínas de origem animal. A ingestão de outras fontes proteicas é uma alternativa de grande importância para solucionar o problema da alimentação mundial.

Não somente do ponto de vista de produção, a introdução de proteínas de origem vegetal na alimentação traz diversos benefícios em relação às proteínas de origem animal. A relação entre nutrição e saúde tornou-se um tema de grande relevância nas últimas décadas (DERNADIM *et al.* 2015). Muitos alimentos de origem vegetal possuem propriedades biológicas que os fazem ser considerados como potencialmente funcionais e promotores da saúde (GARCIA *et al.*, 2013). As dietas vegetarianas trazem resultados benéficos na prevenção e no tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas. Diversos estudos associam efeitos positivos à saúde com a maior utilização de produtos de origem vegetal e a restrição de produtos oriundos do reino animal. Populações que consomem proteínas de origem vegetal com alta frequência têm risco reduzido de cardiopatias, câncer, diabetes, obesidade, doenças da vesícula biliar e hipertensão (SLYWITCH, 2012).

Atualmente, a soja, que pertence à família Fabaceae, é o produto de origem vegetal mais consumido como fonte de proteínas tanto na alimentação humana como na animal (RODRIGUES *et al.*, 2012). Dietas ricas em proteína de soja diminuem os níveis de colesterol total, reduzem as concentrações de LDL e aumentam os níveis de HDL, podendo ter efeitos sobre resistência insulínica, aterosclerose e alterações vasculares. Não é novidade que a inclusão da proteína de soja nos hábitos alimentares da população brasileira é uma alternativa para a promoção, manutenção, recuperação da saúde e prevenção de doenças de indivíduos ou grupos populacionais (PEREIRA, 2013).

A necessidade de minimizar os riscos relacionados ao consumo de alimentos de origem animal, o crescente aumento populacional e o número de indivíduos que passam fome no mundo (cerca de um bilhão de pessoas) chamam atenção para a necessidade da busca de novas fontes de nutrientes, em especial de proteínas (FERNANDES, 2011). Incentivos à biotecnologia e esta busca por novas fontes alimentares são metas para os países em desenvolvimento. O Paquistão, por exemplo, desenvolveu um produto inovador que está ajudando a proteger os jovens da desnutrição. *Wawa Mum*, feita a partir de grão de bico cultivado localmente, mostra que o fornecimento de conhecimento técnico pode ser a chave para encontrar soluções locais para a desnutrição (NAÇÕES UNIDAS, 2012). Nesse âmbito, o Brasil possui uma grande diversidade biológica que pode ser explorada tanto com a finalidade nutricional quanto com a terapêutica (DERNADIM *et al.* 2015). Estudos relacionados à qualidade de proteínas como novas fontes alternativas de nutrientes são de grande importância para nossa realidade (FERNANDES, 2011).

## **1.2 Semiárido nordestino – O bioma caatinga**

O nordeste abrange 18,27% do território brasileiro, possuindo uma área de 1.561.177,8 km<sup>2</sup>; destes 841.260,9 km fazem parte do semiárido nordestino (Figura 1) (ARAÚJO, 2011). Essa região, que compreende 11% do território nacional, é caracterizada pelas elevadas médias anuais de temperatura (27 °C) e evaporação (2.000 mm), com precipitações pluviométricas de até 800 mm ao ano, concentradas em três a cinco meses e irregularmente distribuídas. Na região semiárida nordestina vivem aproximadamente 25 milhões de brasileiros (LIMA *et al.* 2011).

A Caatinga é uma palavra de origem tupi: caa (mata) + tinga (branca) = mata branca (DRUMOND *et al.*, 2012). A caatinga representa o único bioma que se situa totalmente dentro dos limites territoriais brasileiros e apresenta uma grande riqueza em biodiversidade. O bioma se estende pela totalidade do estado do Ceará (100%) e mais de metade da Bahia (54%), da Paraíba (92%), de Pernambuco (83%), do Piauí (63%) e do Rio Grande do Norte (95%), quase metade de Alagoas (48%) e Sergipe (49%), além de pequenas porções de Minas Gerais (2%) e do Maranhão (1%) (PIMENTEL *et al.*, 2010).

Figura 1: Semiárido nordestino. Detalhe mostra a localização no mapa do Brasil



Fonte: Ministério da integração (MI)

Dentre os biomas brasileiros a Caatinga é, provavelmente, o mais desvalorizado. Apesar de sua riqueza, esta região é a menos conhecida do Brasil (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2015). A Caatinga também é o bioma mais frágil que temos. A ciência, identificando sua fauna e flora, nos mostra que não existe uma Caatinga só, mas muitas formas criadas pela interação de seus seres vivos com o conjunto edafoclimático do local. Existem doze tipos de vegetações na Caatinga, que vão das mais abertas, como as caatingas arbustivas e arbustivo-arbóreas, até as mais florestais, como as florestas estacionais. A Caatinga ocupa 11% do território nacional e merece, sem dúvida, um enfoque apropriado e políticas públicas feitas exclusivamente para a área que ocupa. A devastação e o desaparecimento da Caatinga podem ser considerados como um dos impactos ambientais mais relevantes do semiárido brasileiro (MAGALHÃES *et al.*, 2012).

### ***1.2.1 Valorização da biodiversidade e potencial regional***

O bioma Caatinga abriga mais de 1.900 espécies vegetais, 510 espécies de aves, 240 espécies de peixes de água doce, 143 espécies de mamíferos, 47 espécies de lagartos, 52 de serpentes, 10 de anfisbenídeos e 48 anfíbios, sem contar grupos de invertebrados (PIMENTEL *et al.*, 2010). A maior parte do seu patrimônio biológico não pode ser encontrado em nenhum outro lugar do planeta (DRUMOND *et al.*, 2012).

As florestas do semiárido sempre foram consideradas, pela falta de conhecimento, pouco diversas, de pouca utilidade e, em alguns casos, um empecilho ao desenvolvimento da região (GARIGLIO *et al.*, 2010). A Caatinga é o bioma semiárido mais biodiverso do mundo, sendo extremamente distinto em espécies animais, vegetais, em paisagens e sob o ponto de vista genético (DRUMOND *et al.*, 2012). Importante para a manutenção da economia do Nordeste, essas florestas são utilizadas tanto na geração de energia para indústrias e domicílios, quanto para a obtenção de produtos florestais não madeireiros, a exemplo do mel, frutos, fibras e outros que se tornam alternativa de geração de renda para muitas famílias (GARIGLIO *et al.*, 2010).

O bioma Caatinga também é muito rico em conhecimento tradicional associado a esta biodiversidade, este conhecimento pode ser explorado para seu uso sustentável e para o desenvolvimento do país (DRUMOND *et al.*, 2012). Apesar de sua tamanha importância, as florestas do bioma vêm sendo exploradas de forma não sustentável e isso acaba acelerando seu processo de degradação (GARIGLIO *et al.*, 2010). Muitas plantas são usadas para diversas

finalidades de forma indiscriminada, reduzindo consideravelmente a diversidade e o número de espécies antes mesmo do conhecimento de suas potencialidades (FERNANDES, 2011).

Um estudo mais completo poderia revelar o potencial de utilização de muitas espécies. Grande parte da população que habita a Caatinga é carente e já faz uso destes recursos naturais para a sua sobrevivência (NASCIMENTO *et al.*, 2011). Um real conhecimento da potencialidade destes recursos é uma meta a ser alcançada para o desenvolvimento do país e para a preservação do bioma do semiárido brasileiro. O manejo sustentável dos recursos florestais da Caatinga é uma possibilidade real. Os recursos existentes possuem grande potencial para serem explorados, ampliando a sua contribuição para o desenvolvimento econômico e social da região Nordeste. Pode existir uma melhoria da qualidade de vida da população, sem prejuízo para a sustentabilidade ambiental (GARIGLIO *et al.*, 2010). O Semiárido pode atingir o desenvolvimento econômico e sustentável, desde que sua exploração seja compatível com a capacidade de suporte de seus ecossistemas (ARAÚJO, 2011).

Estudos que possam agregar valor econômico e viabilizar o uso racional e a conservação da Caatinga, aliados à constante busca por novas fontes de proteínas vegetais para atender à demanda crescente da população são de extrema relevância. As sementes das espécies vegetais da Caatinga cearense apresentam um elevado potencial nutricional, como elevado teor de proteínas, bom perfil de aminoácidos essenciais e de minerais, são importantes fontes de fibras e energia, além de conterem baixos compostos tóxicos e/ou antinutricionais, com perfis comparáveis ou mesmo superiores ao de outras leguminosas selvagens, bem como ao de leguminosas mundialmente consumidas (FERNANDES, 2011).

Muitos produtos atualmente disponíveis estão sendo estudados com o objetivo de determinar seu valor nutritivo, visando sua futura utilização na alimentação de seres humanos. 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 e minerais), mas apesar disso são negligenciadas para este fim (CARVALHO *et al.*, 2011). A produção de alimentos de alta proteína a partir de fontes sub-exploradas é uma resposta importante ao problema da fome no mundo. Várias fontes de novas proteínas alimentares já foram identificadas e muitas mais ainda estão esperando ser descobertas (YULIANA *et al.*, 2014).

### 1.2.3 Cumaru [*Amburana cearensis* (Allemao) A. C. Smith]

A espécie vegetal *Amburana cearensis* (Allemao) A.C. Smith, popularmente conhecida como Imburana-de-Cheiro, Amburana ou Cumaru, é uma leguminosa da subfamília Papilionoideae de ocorrência frequente em áreas semiáridas do Brasil, especialmente na região do domínio Caatinga (FARIAS, 2009). A árvore possui caule reto e chega a atingir 10 a 12 metros de altura e até 20 metros na zona da mata (Figura 2A). Possui folhas compostas (Figura 2B) e flores branco-amareladas, pequenas e muito aromáticas (Figura 2C). Os frutos são vagens achatadas de cor vermelho escuro, geralmente com apenas uma pequena semente alada em seu interior (Figura 2D). As sementes (Figura 2E) medem de 1-2 cm, são rugosas, de cor escura e exalam um odor forte e agradável, típico da cumarina. No Nordeste, o período de floração ocorre no início da estação seca, entre maio e julho, e a frutificação se dá de agosto a outubro (LÚCIO *et al.*, 2010).

*A. cearensis* é uma planta de múltiplas utilidades (Figura 3); sua madeira, de excelente qualidade, fácil de ser trabalhada e com aroma agradável, é vendida no comércio com o nome de cerejeira (CANUTO *et al.*, 2008). Seu potencial como árvore lenhosa é apreciado em várias regiões do semiárido nordestino (ALMEIDA *et al.*, 2010). Um uso não muito tradicional, mas que vem ganhando importância nos últimos anos é a fabricação de tonéis com a madeira de cumaru para a maturação de cachaças (SOUZA *et al.*, 2014) e de cervejas (DREDGE, 2013).

Suas raízes, entrecasca e sementes têm extenso uso na medicina popular, principalmente, no tratamento de doenças como reumatismo e afecções respiratórias (ALMEIDA *et al.*, 2010). *A. cearensis* é uma espécie que já possui uma grande importância econômica no nordeste do Brasil (ARARUNA *et al.*, 2013). Na medicina caseira, em várias regiões do país, o cumaru é utilizado na forma de lambedor ou chá, no tratamento de resfriados, bronquites, gripes e asma. A casca do caule é empregada contra dores reumáticas, enquanto as sementes são utilizadas contra espasmos musculares (ALMEIDA *et al.*, 2010).

Segundo levantamento bibliográfico realizado por Almeida *et al.* (2010), *A. cearensis* é rica em compostos como cumarinas, flavonoides e glicosídeos fenólicos, os quais dão suporte ao uso popular como broncodilatador, analgésico, anti-inflamatório e antirreumático. Apesar de muitos metabólitos secundários já terem sido descritos, a cumarina é o melhor caracterizado (SOUZA, 2014). A cumarina é o princípio ativo da leguminosa utilizado na indústria alimentícia, de cigarro, de perfume e de medicamentos (CANUTO *et al.*, 2008).

Figura 2: Planta adulta, folhas, flores e sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith. A) Planta adulta com a folhagem B) Folhas C) Flores D) Sementes aladas (secas) E) Detalhe das sementes



FONTE: A) <http://belezadacaatinga.blogspot.com.br> B) [www.cnip.org.br](http://www.cnip.org.br) C) <http://ibflorestas.org.br> D) e E) <http://viveravidaeomeioambiente.blogspot.com.br>



Figura 3: Usos populares de *Amburana cearensis* (Allemao) A. C. Smith. A) Xarope de cumaru (fitoterápico) B) Lambedor de cumaru com alho (fitoterápico) C) Óleo essencial de cumaru para aromoterapia D) Móveis feitos com madeira de cumaru E) Tonel de madeira fabricado com madeira de cumaru



FONTE: A) [www.infoteca.cnptia.embrapa.br](http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br) B) <http://aroeiracosmetica.com.br/>;

C) <http://www.healingbrasil.com.br/>; D) <http://vivavida.com.br/>; E) <http://produto.mercadolivre.com.br>

Apesar dos inúmeros usos etnobotânicos e das demais utilidades desta espécie, ainda poucos trabalhos científicos relatam atividades biológicas de interesse médico e/ou agroindustrial ou mesmo a utilização como fonte de alimentos para humanos e/ou animais, visto que é uma espécie endêmica de uma área com graves problemas sócio-econômicos. Farias (2009) já estudou o potencial nutricional das sementes de *A. cearensis* e de suas proteínas isoladas. O autor concluiu que se trata de uma espécie com alta potencialidade para inclusão na dieta humana e animal e que, portanto, merece ser estudada com mais profundidade.

### 1.3 Proteínas vegetais

As proteínas são moléculas importantes para os organismos animais, devendo, portanto, estar presentes na alimentação em quantidades adequadas. Além do aspecto quantitativo deve-se levar em conta o aspecto qualitativo, isto é, seu valor nutricional, que dependerá de sua composição, digestibilidade, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, ausência de toxicidade e de fatores antinutricionais, dentre outros. As proteínas vegetais, quando comparadas as de origem animal, são deficientes em aminoácidos sulfurados como metionina, cisteína e, em menor escala, em triptofano (FERNANDES, 2011). O consumo de mais de uma fonte proteica de origem vegetal é importante para contornar esta deficiência e proporcionar todos os aminoácidos essenciais ao bom funcionamento do organismo.

Proteínas vegetais são interessantes para a pesquisa neste momento, uma vez que são uma alternativa abundante às fontes de proteína de origem animal. As proteínas vegetais são uma matéria prima renovável, biodegradável e com diversas propriedades funcionais e físico-químicas interessantes (NESTERENKO *et al.*, 2013).

As leguminosas e os cereais, principais fontes de proteínas vegetais, são considerados a base da dieta de toda uma sociedade, apresentando aminoácidos essenciais complementares que os tornam alimentos de boa qualidade e capazes de fornecer proteínas funcionais (BOYE *et al.*, 2010). As sementes de leguminosas, por possuírem elevado teor proteico, são amplamente utilizadas na alimentação humana e animal (CARVALHO *et al.*, 2012). Feijões, ervilhas, favas, lentilhas, grão de bico e soja são exemplos de importantes leguminosas amplamente utilizadas na alimentação humanae, entre as 20 espécies mais utilizadas, os feijões (*Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*) e as ervilhas (*Pisum sativum* L) são os mais amplamente cultivados e consumidos em todo o mundo (FERNANDES, 2011).

### ***1.3.1 Isolados proteicos de origem vegetal***

As misturas proteicas de origem vegetal têm se tornado uma alternativa econômica, social e ecologicamente viável para a indústria de alimentos. Essas misturas têm o intuito de complementar dietas deficientes e agregar maior valor nutricional às fontes alimentícias (SANTOS *et al.*, 2012). É cada vez mais comum o uso apenas da porção proteica das sementes em formulações alimentares industriais, geralmente na forma de concentrados ou isolados proteicos (FOEGEDING; DAVIS, 2011). Tentativas têm sido feitas para utilização de diversas preparações de sementes como ingredientes na indústria de alimentos. Entretanto, a soja tem sido o principal material usado para a produção industrial de concentrados e isolados de proteínas, devido, principalmente, ao seu alto teor de proteínas e ao bom desempenho tecnológico de seus derivados (CARVALHO *et al.*, 2009).

O processo de isolamento proteico por precipitação isoelétrica consiste na solubilização das proteínas em solução aquosa alcalina, separando-se o material insolúvel durante uma primeira centrifugação. O sobrenadante sofre um ajuste de pH com soluções ácidas, até um pH próximo ao ponto isoelétrico da maioria das proteínas. Neste ponto isoelétrico, a solubilidade das proteínas é mínima uma vez que as interações do tipo dipolo-dipolo e eletrostática entre moléculas de proteínas vizinhas aumentam, fazendo com que as moléculas se atraiam e precipitem na solução (DAMADORAN *et al.*, 2010). O material resultante da precipitação é desidratado por métodos como liofilização e “spray-drying”. O produto resultante, após a secagem, é chamado de isolado proteico.

Carvalho *et al.* (2009) chamaram a atenção para a diferença entre isolados e concentrados proteicos. Concentrado proteico é definido como aquele produto preparado a partir da farinha desengordurada, obtida de grãos de alta qualidade, através de um processo de obtenção que se baseia na insolubilização da maioria das proteínas, com a exclusão parcial dos carboidratos, sais minerais e outros componentes solúveis típicos da farinha, resultando em um produto com elevado teor proteico. No caso da soja, o teor mínimo de proteína para o concentrado proteico deve ser de 70%. O isolado proteico de grãos é definido como o produto contendo quase a totalidade da fração proteica, sendo removida a maior parte dos componentes não proteicos. No caso de isolado proteico de soja, o produto deve conter no mínimo 90% de proteína, em base seca.

Alimentos preparados a partir de novas fontes de proteínas, como concentrados e isolados proteicos, necessitam ser mais estudados para que seja possível entendermos melhor seu comportamento e aproveitar melhor suas características (SOUSA, 2014). Algumas

sementes, com alto teor de proteínas, têm sido alvo de diversas pesquisas, por exemplo: Aydemir; Yemenicioglu (2013) estudaram isolados de grão de bico e lentilha; Tan *et al.* (2014) estudaram um isolado de *P. vulgaris*; Yuliana *et al.* (2014) estudaram um isolado proteico produzido a partir da casca da castanha de caju; Bucko *et al.* (2015) estudaram um isolado produzido a partir de *Cucurbita pepo*, sementes de abóbora; Evangelista *et al.* (2014) estudaram um isolado proteico produzido a partir de sementes de *Thlaspi arvense*, erva daninha; Ruiz *et al.* (2016) estudaram um isolado proteico de *Chenopodium quinoa*.

### 1.3.2 Ingredientes funcionais

Propriedade funcional pode ser definida como qualquer propriedade de um alimento ou componente de um alimento, excetuando-se as nutricionais, que influenciam a sua aceitação e utilização pela indústria (MEDEIROS, 2013). De um modo geral, as propriedades funcionais das proteínas referem-se a qualquer propriedade química, físico-química ou física, que afete o processamento ou determine as funções do produto final (FILHO; VASCONCELOS, 2011). São as características que a proteína hidratada propicia, ou com a qual contribui, em um produto alimentício, destacando-se: solubilidade, capacidade de absorção de água e de óleo, capacidade emulsificante, formação de gel e formação de espuma. Os atributos sensoriais dos alimentos são, em sua grande maioria, obtidos pelas interações complexas entre vários ingredientes funcionais (DAMODARAM *et al.*, 2010). A funcionalidade ou valor funcional é definido como o somatório de todas as propriedades funcionais de um alimento ou ingredientes alimentícios (MEDEIROS, 2013).

Farinhas de proteína (< 65% de proteínas), concentrados proteicos (> 65% de proteína) e isolados proteicos (> 90% de proteínas) podem ser adicionados aos alimentos para aumentar o seu valor nutritivo e fornecer desejados atributos funcionais específicos (BOYE *et al.*, 2010).

#### 1.3.2.1 Solubilidade

A solubilidade de uma proteína é definida como a porcentagem de proteína que se mantém em solução ou dispersão coloidal sob condições específicas e que não sedimenta com forças centrifugas moderadas. As interações que mais influenciam as características de solubilidade das proteínas são as hidrofóbicas e iônicas. As interações hidrofóbicas promovem a associação proteína-proteína e diminuem a solubilidade, entretanto, as

interações iônicas promovem as interações proteína-água e aumentam a solubilidade (FILHO; VASCONCELOS, 2011). A composição de aminoácidos das proteínas está entre os fatores que mais afetam a sua solubilidade. Porém, as características de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade de superfície da proteína são os fatores mais importantes, pois é a superfície da proteína que entra em contato com a água que está ao seu redor (DAMODARAM *et al.*, 2010).

As propriedades funcionais das proteínas são frequentemente afetadas pela solubilidade proteica. Geralmente as proteínas requerem alta solubilidade para promover emulsão, espuma e geleificação (FILHO; VASCONCELOS, 2011). Mudanças particularmente na diminuição da solubilidade das proteínas afetam de maneira desfavorável as suas características funcionais (SILVA, 2013).

#### *1.3.2.2 Capacidade de absorção de água*

A água é um constituinte essencial dos alimentos. As propriedades texturais destes dependem da interação da água com suas macromoléculas (proteínas e polissacarídeos). Muitas propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, dispersabilidade, viscosidade, capacidade de retenção de água, formação de espuma e geleificação dependem das interações entre água e proteína (DAMODARAM *et al.*, 2010).

A capacidade de hidratação de uma proteína está relacionada, em parte, com a sua composição de aminoácidos, pois quanto maior o número de resíduos carregados, maior a capacidade de hidratação da proteína (DAMODARAM *et al.*, 2010). As proteínas exibem sua hidratação mínima em seu ponto isoelétrico, já que as interações proteína-proteína minimizam a interação com água. Tanto acima como abaixo do ponto isoelétrico as proteínas fixam mais água devido ao aumento da sua carga líquida (negativa ou positiva) e das forças repulsivas (FILHO; VASCONCELOS, 2011). A capacidade de entumescimento ou absorção de água também vai depender de fatores extrínsecos como o tipo ou composição de material proteico, tempo de contato com a água e temperatura do processamento (SANTOS, 2012).

A capacidade de ligação de água (CLA), às vezes também chamada de capacidade de absorção de água (CAA), pode ser definida como a quantidade de água que pode ser absorvida por grama de proteína.

### 1.3.2.3 Capacidade de absorção de óleo

A absorção de óleo é de grande importância em alimentos viscosos, como sopas, molhos, massas e produtos de panificação, mas também exerce importante papel na qualidade da textura de diversos alimentos, sendo bastante utilizada em produtos cárneos, como salsichas e análogos de carne. A propriedade se destaca na retenção de sabor e na palatibilidade dos alimentos (AVANZA *et al.*, 2012). A absorção de gordura varia em função da quantidade relativa de grupos hidrofóbicos expostos da proteína, provavelmente, as cadeias laterais não polares tenham estrita afinidade com as cadeias hidrofóbicas da molécula de gordura, contribuindo assim para sua absorção (FONTANARI *et al.*, 2007).

A capacidade de absorção de óleo (CAO), também conhecida como capacidade de ligação com gordura ou óleo (CLO), é calculada como a massa em gramas de óleo absorvida por grama de proteína ou farinha (BOYE *et al.*, 2010).

### 1.3.2.4 Propriedades emulsificantes

As emulsões são sistemas dispersos de dois líquidos pouco solúveis ou insolúveis entre si (FILHO; VASCONCELOS, 2011). Vários alimentos naturais e processados, como leite, manteiga, maionese, molho para salada, salsicha, linguiça e bolo são produtos do tipo emulsão, nos quais as proteínas desempenham um papel importante como agentes emulsificantes (CANO-MEDINA *et al.*, 2011). As proteínas são excelentes emulsificantes, pois possuem na mesma molécula partes hidrofóbicas e hidrofílicas. Se tratam de moléculas anfipáticas resultantes da mistura de resíduos de aminoácidos polares e não-polares (DAMODARAM *et al.*, 2010).

As moléculas de proteínas formam uma película ao redor das gotículas de óleo dispersas em meio aquoso e, desse modo, atuam impedindo mudanças estruturais, como a coalescência, cremosidade, floculação ou sedimentação. Propriedades emulsificantes de proteínas são afetadas pela sua proporção de hidrofobicidade/hidrofilicidade e limitações estruturais que determinam a facilidade com que ela pode se desdobrar para formar o filme em torno das gotículas de óleo dispersas (BOYE *et al.*, 2010). A eficiência das proteínas em formar emulsões também pode ser influenciada pela temperatura, pelo pH e pela presença de sais (LIANG; TANG, 2013).

A atividade emulsificante (AEm) e a estabilidade da emulsão (EEm) são dois índices frequentemente utilizados para avaliar as propriedades emulsionantes de uma proteína. A

AEm mede a quantidade de óleo que pode ser emulsificada por unidade de proteína, enquanto EEm mede a capacidade da emulsão de resistir a alterações na sua estrutura ao longo de um período definido de tempo (BOYE *et al.*, 2010).

#### 1.3.2.5 Atividade espumante

Espumas são sistemas onde os gases estão dispersos numa fase líquida, formando bolhas de ar. A capacidade de formar e estabilizar espumas não é a mesma para todas as proteínas (FILHO; VASCONCELOS, 2011). As propriedades espumantes das proteínas dependem de vários fatores, tais como a concentração e a solubilidade proteica, a presença de lipídios e o grau de desnaturação proteica. Além disso, algumas propriedades moleculares interferem com a habilidade das proteínas formarem espumas estáveis, entre elas a flexibilidade molecular, a hidrofobicidade, a densidade e a distribuição de carga (DAMODARAN *et al.*, 2010).

Os índices mais utilizados para medir a propriedade espumante são a atividade espumante (AEs) e a estabilidade da espuma (EEs). Diferentes protocolos são relatados na literatura para medir as propriedades de formação de espuma das proteínas. Em geral, as dispersões proteicas em concentrações específicas são homogeneizadas a alta velocidade para induzir a formação de espuma. A AEs é expressa como o volume (%) aumentado devido à formação de espuma e a estabilidade da espuma é medida como a mudança no volume de espuma ao longo de um determinado período de tempo (BOYE *et al.*, 2010).

Um importante fator que influencia na formação e na estabilidade da espuma é a concentração de proteína. Quanto maior a concentração proteica, mais firme será a espuma. A estabilidade é aumentada por grandes concentrações proteicas, uma vez que isto aumenta a viscosidade e facilita a formação de uma película proteica coesiva na interface. Muitos alimentos processados são do tipo espuma: cremes batidos, pães e suflês são apenas alguns exemplos. As propriedades texturais próprias desses alimentos ocorrem em função das minúsculas bolhas de ar dispersas, características da formação de espuma (DAMODARAN *et al.*, 2010).

#### 1.3.2.6 Geleificação

Um gel é uma fase intermediária entre um sólido e um líquido (FILHO; VASCONCELOS, 2011). Os géis proteicos são sistemas altamente hidratados que contêm até

98% de água, em alguns casos. O mecanismo pelo qual a água líquida pode ser mantida em um estado semi-sólido em géis não é bem compreendido (DAMODARAN *et al.*, 2010). O requisito básico para a funcionalidade de geleificação em um determinado alimento é a formação de uma rede sob as restrições de composição e fabricação do determinado alimento (FOEGEDING; DAVIS, 2011). As ligações envolvidas na formação da rede são, basicamente, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações eletrostáticas. A maioria dos géis proteicos alimentares são preparados aquecendo-se uma solução de proteína (FILHO; VASCONCELOS, 2011).

A estabilidade da estrutura do gel, contra forças térmicas e mecânicas, depende do número e dos tipos de ligações cruzadas formadas pelas cadeias de monômeros. Vários fatores ambientais, como pH e presença de sais, afetam a capacidade de geleificação das proteínas. O pH ótimo para a formação de gel é de aproximadamente 7 - 8, para a maioria das proteínas (DAMODARAN *et al.*, 2010).

A geleificação das proteínas é muito importante na preparação de vários alimentos, como por exemplo pudins, gelatinas, sobremesas, tofu e carnes. Um importante índice da capacidade de geleificação é a Menor Concentração Geleificante (MCG), que pode ser definida como a concentração mínima de proteína ou amostra necessária para formar um gel autossustentado. As proteínas com menores MCG têm uma melhor capacidade de geleificação (BOYE *et al.*, 2010).

#### **1.4 Segurança de uso de proteínas vegetais**

As plantas têm sido a base da medicina tradicional em todo o mundo por milhares de anos e continuam provendo novos remédios à humanidade (PESSOA, 2015). O uso de plantas com o objetivo de cura de enfermidades ou amenização de seus sintomas é prática comum e que não acompanha orientação médica. Sendo, muitas vezes, utilizadas de forma indiscriminada, tendo como argumento de que o “natural” não faz mal, não é tóxico. Entretanto, muitos componentes com atividades medicinais extraídos de plantas já demonstraram ação citotóxica, genotóxica e/ou mutagênica (SILVA *et al.*, 2015). Considerável número de plantas utilizadas na medicina popular pode causar algum efeito tóxico aos seres humanos. Entretanto, boa parte dessas nunca foi testada no que se refere à toxicidade, conseqüentemente, não há um retorno à população não científica da segurança de uso de todas essas plantas (TARIQ *et al.*, 2015).



A toxicologia de alimentos constitui uma subárea da toxicologia que possui enorme relevância para a saúde humana, tendo como objetivo analisar e definir quais alimentos tem ou não potencial de apresentar toxicidade nas condições normais de consumo. A toxicidade de um alimento ocorre devido à presença de um ou mais compostos presentes no mesmo, que podem causar danos à saúde dos seres vivos, estando diretamente relacionada com diversas condições, tais como: exposição da substância, sua natureza, concentração no alimento, frequência de ingestão, tempo com que o alimento vem sendo ingerido, via de introdução no organismo e susceptibilidade individual (MOURA *et al.*, 2012).

A investigação de leguminosas selvagens economicamente viáveis como uma alternativa de alimento amplia as fontes de proteínas para nutrição humana. Porém, não basta apenas disponibilizar e listar benefícios dessas fontes proteicas sem antes realizar os estudos de toxicidade (FERNANDES, 2011). Na introdução de uma nova fonte alimentar devemos levar em consideração o mesmo princípio que durante a introdução de um novo medicamento, devemos ter o máximo de precaução e estudar efeitos a curto e longo prazo. Os ensaios toxicológicos são realizados para determinar os níveis de ingestão das substâncias que não causem dano ao ser humano (MOURA *et al.*, 2012).

Após a liberação dos primeiros alimentos derivados das tecnologias do DNA recombinante (AGM), a preocupação com a biossegurança dos alimentos tomou proporções enormes no mundo todo. No entanto, os AGMs não são as únicas fontes de riscos potenciais aos consumidores (SOUZA, 2014). No Brasil, o órgão que regulamenta novos alimentos a serem introduzidos no mercado é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). A agência define novos alimentos como:

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 (ANVISA, 2013, p.3).

A comprovação pré-mercado da segurança de uso de determinados alimentos e ingredientes é uma exigência legal, estabelecida pela ANVISA, com o objetivo de proteger a saúde da população e reduzir os riscos associados ao consumo desses produtos, em resposta às constantes inovações tecnológicas e ao aumento do comércio internacional (ANVISA, 2013). O grande desafio decorrente da perspectiva ampliada de saúde e da necessidade de atendimento às demandas sociais para a construção de novas políticas de segurança, como as formas de lidar com a diversidade de novos produtos sujeitos à vigilância sanitária e com os novos alimentos classificados como funcionais, transgênicos ou derivados de organismos

geneticamente modificados (OGMs), vem impulsionando a criação de cada vez mais novos regulamentos (MARINS *et al.*, 2014).

As leguminosas são conhecidas por conterem compostos que prejudicam a utilização de seus nutrientes, especialmente de suas proteínas quando incorporados nas dietas, causando efeitos deletérios agudos ou crônicos. Esses compostos são tidos como antinutricionais e são originados tanto do metabolismo primário quanto do metabolismo secundário das plantas (FERNANDES, 2011). Um vez que esses componentes sejam indentificados, uma alternativa para aumentar a qualidade nutricional dessas fontes proteicas inclui a remoção desses fatores ou a sua inativação, por exemplo, através do cozimento dos grãos, como ocorre com os feijões, dentre outros alimentos.

*A. cearensis* não possui histórico de consumo alimentar no Brasil, portanto qualquer iniciativa no sentido de incluir suas sementes ou seus derivados, como é o caso de seu isolado proteico, na alimentação da população, deverá seguir a legislação determinada pela ANVISA. Este trabalho, no entanto, trata de uma avaliação preliminar do isolado proteico das sementes de *A. cearensis*, mostrando suas características nutricionais e seu potencial funcional. As análises toxicológicas realizadas visam apenas avaliar preliminarmente se há indícios de toxicidade que possam descartar seu uso na alimentação. Um estudo preliminar também pode guiar o melhoramento deste protótipo até o desenvolvimento de um produto final, removendo fatores interferentes ou inativando-os.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Produzir um isolado proteico obtido a partir de sementes de *Amburana cearensis*, caracterizar bioquímica e funcionalmente este isolado e avaliar sua segurança de uso, comparando-o com um isolado proteico de soja já comercializado.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar as melhores condições de extração da farinha das sementes de *A. cearensis* (pH de extração e precipitação, presença e concentração de sal durante a extração, proporção farinha/ solvente, tempo de extração) e estabelecer um protocolo viável que maximize o rendimento do produto com o menor desperdício de tempo;
- Realizar a caracterização bioquímica dos isolados proteicos através da determinação do rendimento bruto e líquido de proteínas, da composição proximal (proteínas totais, lipídios totais, carboidratos totais e cinzas), do perfil de aminoácidos das proteínas, do escore químico dos aminoácidos, da avaliação da digestibilidade *in vitro* dos isolados, da detecção de fatores tóxicos e/ou antinutricionais de natureza proteica (lectinas, inibidores de tripsina e de quimotripsina) e de sua atividade biológica (atividade antioxidante);
- Investigar as propriedades funcionais (solubilidade do nitrogênio, capacidade de absorção de água e de óleo, capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão, capacidade de geleificação e estabilidade do gel, capacidade espumante e estabilidade da espuma) dos isolados proteicos para avaliar seu potencial de utilização em aplicações e fabricação de alimentos;
- Avaliar a toxicidade dos isolados proteicos em ensaio de toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas e atividade hemolítica.

### 3 MATERIAIS

#### 3.1 Obtenção e processamento das sementes de *A. cearensis*

As sementes de *A. cearensis*, foram adquiridas comercialmente no Empório Manancial(Feira de Santana, Bahia, Brasil).As sementes tiveram sua parte alada retirada e foram trituradas em moinho elétrico para grãos de café (Cadence MDR301, Caxias do Sul, SC, Brasil). A farinha obtida foi peneirada em malha de 500  $\mu\text{m}$ , para a obtenção de um material homogêneo, e posta em estufa (Fanem, Modelo 002 CB, São Paulo, Brasil) à 45 °C por 48 horas para retirada do excesso de umidade. Parte da farinha obtida foi desengordurada a frio e em repouso, em capela de exautão, utilizando hexano na proporção 1:3 (m/v) e um total de quatro trocas de solvente, uma a cada 24 horas. Após o procedimento, a farinha ficou secando *overnight* em capela de exaustão de gases e foi novamente colocada em estufa à 45 °C por 48 horas. As farinhas obtidas, integral denominada FIAC (Farinha Integral de *A. cearensis*) e desengordurada FDAc (Farinha Desengordurada de *A. cearensis*), foram acondicionadas em recipientes plásticos hermeticamente fechados à temperatura ambiente até a realização das análises.

#### 3.2 Isolado proteico de soja

O isolado proteico de soja, marca Ceifeiro(Maracanaú, Ceará, Brasil), foi obtido comercialmente em uma loja de produtos naturais da cidade de Fortaleza (Ceará, Brasil). Este foi acondicionado em recipiente plástico hermeticamente fechado, à temperatura ambiente, até a realização das análises. O isolado foi denominado neste trabalho PIS (“Protein isolate of *Soybean*” - Isolado Proteico de Soja).

#### 3.3 Reagentes químicos e outros materiais

O óleo de soja (Liza<sup>®</sup>, Cargill, São Paulo, SP, Brasil) utilizado na determinação da capacidade de absorção de óleo e na atividade emulsificante foi adquirido em supermercado na cidade de Fortaleza (Ceará, Brasil).

Os kits Bioclin para determinação de sódio e potássio foram adquiridos da Quibasa Química Básica (Belo horizonte, Brasil).

Sulfato de amônio foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Metilenobisacrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS) e TEMED (N', N', N', N'-tetrametiletilenodiamina) foram adquiridos da AMRESCO Inc. (Ohio, EUA). Albumina sérica bovina (BSA), marcadores de massa molecular, proteases, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), acrilamida, coomassie brilliant blue R-250 e  $\beta$ - mercaptoetanol foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI EUA).

Todos os demais reagentes utilizados neste estudo foram de grau de pureza analítica e estão citados no decorrer da descrição da metodologia.

### **3.4 Materiais biológicos**

#### ***3.4.1 Suspensão de eritrócitos***

O sangue de coelho foi coletado com seringa a partir da veia marginal da orelha. O sangue de rato foi coletado via plexo-orbital, sob anestesia. O sangue humano foi obtido de doador voluntário adulto e saudável. As amostras, de 2mL cada, foram colhidas em tubos com EDTA, homogeneizadas e acondicionadas a 4 °C, até o momento do isolamento dos eritrócitos. Todos os protocolos com animais, adotados neste trabalho, foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFC.

Para o isolamento dos eritrócitos e preparo das suspensões, as amostras de sangue foram centrifugadas (Fanem, São Paulo, Brasil) a 200 x g, por 10 min, a 25 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado. Ao precipitado de eritrócitos foi adicionada solução salina (NaCl 0,9%) para substituir o volume de plasma retirado, a amostra foi homogeneizada e centrifugada novamente nas mesmas condições. Repetiu-se o processo por no mínimo cinco vezes, até obter um sobrenadante totalmente transparente. O precipitado foi denominado “papa de hemácias” e utilizado para atividade hemolítica e hemaglutinante, conforme tópicos 4.4.1 e 4.2.8.1.

#### ***3.4.2 Animais de laboratório***

O coelho da raça Califórnia foi adquirido junto ao Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFC (Fortaleza, Ceará). Este foi mantido no Biotério de Manutenção do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC com água e ração (Biobase, Bio-Tec, São Paulo, Brasil) *ad libitum*.

Os camundongos fêmeas Swiss e os ratos machos e fêmeas Wistar foram adquiridas com três semanas de idade do Biotério Central da UFC (BIOCEN-UFC). As fêmeas eram nulíparas e não prenhes. Os animais foram alojados no biotério de experimentação do Bioprospec, Departamento de Biologia da UFC, com condições controladas de temperatura ( $23,0 \pm 2,0$  °C), fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro) e umidade do ar (45-55%). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, com substrato de raspa de pinho (Biotécnicas, São Paulo, Brasil) e água e ração (Biobase, Bio-Tec, São Paulo, Brasil) *ad libitum* até o início de cada experimento.

Todos os protocolos com animais, adotados neste trabalho, foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFC, que adota os preceitos do COBEA e obedece à Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regula o uso de animais em pesquisas científicas.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção dos isolados proteicos

Para determinação das condições ideais, que iriam resultar em um maior rendimento do isolado proteico da farinha das sementes de *A. cearensis*, diversos parâmetros foram analisados separadamente. Foram padronizadas como condições iniciais: pH 9,0 (determinado logo no primeiro ensaio de extração proteica (seção 5.1.1), extração com água na proporção 1:50 por 1 hora, sem reextração. De acordo com a variável avaliada, uma por vez, essas condições foram alteradas, avaliando aquelas que poderiam aumentar a extratibilidade das proteínas de FDAc de forma mais conveniente e com menor desperdício de tempo. Todos os testes foram conduzidos sob temperatura ambiente (aproximadamente 24 °C) e sob agitação constante.

#### 4.1.1 pH de extração proteica

A determinação do pH ótimo de extração proteica de FDAc foi realizada em duplicata. Assim,  $1 \pm 0,001$  g de farinha desengordurada de *A. cearensis*(FDAc) foi dissolvido em 50 mL de água destilada (proporção 1:50 m/v) e o pH da solução foi ajustado para 7; 8; 8,5; 9; 9,5 e 10 com NaOH 1 M em pHmetro (modelo DM-20, Digimed, Campo Grande, Brasil) . As amostras permaneceram sob agitação constante em banho-maria (Dubnof, modelo 304-D, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil) sem aquecimento (temperatura ambiente, aproximadamente 24 °C), durante uma hora. Após este período, foram filtradas em tecido de trama fina e centrifugadas a  $10.000 \times g$ , 4 °C, durante 30 minutos (Zentrifugen Rotina 380R, Hettich, Tuttlingen, Alemanha). O teor de proteínas solúveis presentes no sobrenadante foi determinado de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

#### 4.1.2 Degradação de proteínas em virtude do pH

A análise da degradação das proteínas de FDAc foi realizada através de monitoramento por eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de SDS, de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). Os sobrenadantes da extração de FDAc obtidos (seção 4.1.1), nos pH 7; 8; 8,5; 9; 9,5 e 10 foram aliqüotados em tubos para microcentrífuga e precipitados com acetona mantida em temperatura abaixo de zero *overnight*. As amostras

foram centrifugadas a 10.000 x g, 25 °C, por 5 minutos e os sobrenadantes descartados. Ao precipitado, foram adicionados 100 µL de uréia/tiouréia (7M/9M) e a suspensão foi homogeneizada com cuidado, para evitar a formação de espuma. As proteínas foram quantificadas por Bradford (1976) e adicionadas ao tampão de amostra Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1% e azul de bromofenol (para a marcação da frente de corrida eletroforética, a 0,02%). A concentração final foi de 15 µg de proteína por poço da eletroforese. As corridas foram realizadas em sistema de eletroforese unidimensional (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), com géis de aplicação contendo 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 1% e géis de separação contendo 15% de poliacrilamida em uma solução tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,9 e SDS 1%. Após o término da corrida, o gel foi corado segundo a metodologia descrita por Weber e Osborn (1969) com solução de 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).

#### ***4.1.3 Presença e concentração de sal durante a extração***

A avaliação da presença e da concentração de sal na solução extratora de proteínas de FDAc foi realizada em duplicata. Testes anteriores (não publicados) realizados pelo grupo com seis diferentes soluções (fluoreto de sódio, acetato de sódio, iodeto de potássio, cloreto de sódio, cloreto de cálcio e citrato de sódio) mostraram que a melhor solução de extração de proteínas para FDAc seria cloreto de sódio (NaCl). Foram testadas, portanto, a extração somente com água destilada e com diferentes concentrações de NaCl (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 M). Assim,  $1 \pm 0,001$  g de FDAc foi dissolvido em 50 mL de solução extratora e o pH da solução foi ajustado para 9,0 com NaOH 1 M. As amostras permaneceram sob agitação constante, em banho-maria sem aquecimento (temperatura ambiente), durante uma hora, foram filtradas em tecido de trama fina e centrifugadas a 10.000 x g, 4 °C, durante 30 minutos. O teor de proteínas solúveis presentes no sobrenadante foi determinado de acordo com Bradford (1976).



#### **4.1.4 Proporção FDAc/Solvente**

A determinação da melhor proporção FDAc/solvente, foi realizada em duplicata. Foram testadas as proporções 1:10; 1:20 e 1:30 (m/v). Em 50 mL de água destilada, foram dissolvidos 1,6; 2,5 e 5 g ( $\pm 0,001$  g) de FDAc, de acordo com a proporção final esperada. O pH da solução foi ajustado para 9,0 com NaOH 1 M e as amostras permaneceram sob agitação constante em banho-maria sem aquecimento (temperatura ambiente), durante uma hora. Após este período, foram filtradas em tecido de trama fina e centrifugadas a  $10.000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , durante 30 minutos. O teor de proteínas solúveis resultantes da extração de FDAc em diferentes proporções de farinha/solvente, foi determinado de acordo com Bradford (1976).

#### **4.1.5 Reextração da amostra**

A necessidade de reextração de FDAc foi realizada na proporção 1:10, de modo a não aumentar em demasiado o volume do ensaio que seria fator limitante durante a etapa de centrifugação. O precipitado resultante da centrifugação nas proporções 1:10, 1:20 e 1:30 foi unido à farinha que teria ficado durante a etapa de filtração em tecido de trama fina. Esses foram reextraídos em água destilada na proporção 1:10 (m/v), de acordo com a massa inicial de FDAc em cada proporção do ensaio. O pH foi novamente ajustado para 9,0 e as amostras permaneceram sob agitação constante durante mais uma hora. Após este período, as amostras foram filtradas e centrifugadas da mesma maneira, como ocorreu na primeira etapa do processo. O teor de proteínas solúveis resultantes da reextração de FDAc foi determinado de acordo com Bradford (1976).

#### **4.1.6 Tempo de extração**

Para a determinação do tempo necessário para máxima extração proteica da farinha das sementes de *A. cearensis*,  $1 \pm 0,001$  g de FDAc foi suspenso em 50 mL de água destilada e o pH da solução foi ajustado para 9,0 com NaOH 1 M, em duplicata. Ensaio anteriormente realizados pelo grupo mostraram que o melhor tempo para a extração das proteínas de FDAc seria de 1 hora e que em 2 ou 3 horas, não haveria mais extração eficiente de proteínas. Os testes, portanto, visaram diminuir ainda mais este período de tempo. As amostras permaneceram sob agitação constante em banho-maria sem aquecimento (temperatura ambiente), durante 20, 40 ou 60 minutos. Os procedimentos seguintes se repetiram

semelhantes aos tópicos anteriores com filtração em tecido de trama fina, centrifugação a 10.000 x g, 4 °C, durante 30 minutos e determinação do teor de proteínas solúveis no sobrenadante (Bradford, 1976).

#### **4.1.7 pH de precipitação de proteínas**

A determinação do pH ótimo de precipitação proteica de FDAc foi realizada em duplicata. O extrato bruto obtido com o pH ótimo de extração (pH 9,0) foi filtrado em tecido de trama fina e centrifugado a 10.000 x g, 4 °C, durante 30 minutos. O sobrenadante foi fracionado em tubos Falcon de 50 mL e submetido à precipitação isoelétrica em diferentes pH (3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6 e 6,5), após ajuste com HCl 1 M. Os tubos permaneceram em repouso por 18 horas a 4 °C e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 x g, 4 °C, durante 30 minutos. O teor de proteínas solúveis presentes no sobrenadante e no extrato bruto inicial (antes de sofrer precipitação) foi determinado de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

#### **4.1.8 Produção do isolado proteico**

Para a produção do isolado proteico de *A. cearensis* (PIAc) a partir da farinha desengordurada das sementes, a extração foi realizada utilizando agitador magnético (modelo color squid, Wilmington, NC), devido ao grande volume de material. Para determinação dos melhores parâmetros para extração foram levados em consideração a capacidade de extração proteica, o tempo e a conveniência para a produção do isolado em grande quantidade.

As proteínas de FDAc foram extraídas de acordo com as condições determinadas nos tópicos anteriores e filtradas em trama de aço a 250 µm. O extrato bruto resultante (EB) foi centrifugado (Hitachi CR 21, Tóquio, Japão) a 10.000 x g, 4 °C, por 30 minutos e teve seu sobrenadante submetido à precipitação isoelétrica. Nesta precipitação, o pH do EB foi reduzido com HCL 1M para um valor que coincide com o ponto isoelétrico da maioria das proteínas presentes no extrato. A solução permaneceu em repouso por 18 horas a 4 °C para a precipitação das proteínas (Figura 4) e foi centrifugada a 10.000 x g, 4 °C, durante 30 minutos. O material precipitado com a centrifugação foi ressuspenso em água destilada e neutralizado com NaOH 1 M até pH 7,0. O material foi submetido à secagem por atomização (*spray drying* - Figura 5). Os parâmetros utilizados para secagem foram os seguintes: velocidade de 0,5 L por hora, fluxo de ar 4, temperatura de entrada de 160 °C e temperatura

de saída de 100 °C. O isolado obtido (PIAc) foi acondicionado em recipiente plástico hermeticamente fechado, a temperatura ambiente até a realização das análises.

#### ***4.1.9 Determinação do rendimento bruto e rendimento líquido de proteínas***

Para a determinação do rendimento bruto do PIAc (mg de isolado proteico/ grama de farinha desengordurada), foram realizadas extrações conforme condições determinadas na seção 4.1. A massa do isolado proteico, obtida a partir de 700 gramas de FDAc, foi utilizada no cálculo do rendimento bruto de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento bruto (\%)} = \frac{\text{PIAc (g)}}{\text{FDAc (g)}} \times 100$$

Complementarmente, para o cálculo do rendimento líquido de proteínas, foram utilizados a massa (em gramas) de proteínas contidas em 700 gramas de FDAc e no total do PIAc produzido. Assim, o rendimento líquido de proteínas foi determinado de acordo com a fórmula:

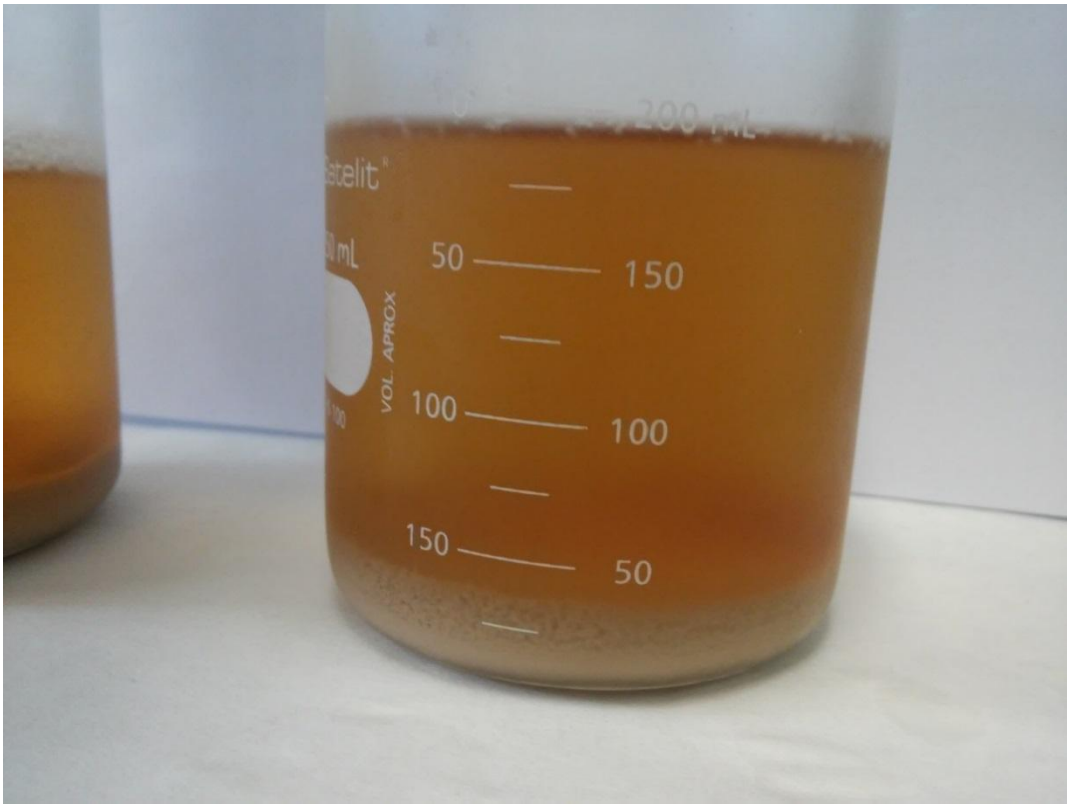
$$\text{Rendimento líquido (\%)} = \frac{\text{Proteínas de PIAc (g)}}{\text{Proteínas de FDAc}} \times 100$$

## **4.2 Caracterização bioquímica e nutricional**

### ***4.2.1 Teor de Umidade***

O teor de umidade de FIAc, FDAc, PIAc e PIS foi determinado em aparelho determinador de umidade infravermelho (Marte, ID50, São Paulo, Brasil), partindo de  $1 \pm 0,001$  g das amostras não-desidratadas.

Figura 4: Precipitação isoeletrica das proteínas presentes no extrato bruto da farinha desengordurada de *Amburana cearensis*



FONTE: Foto tirada pelo autor

Figura 5: Secagem por atomização (*spray drying*) do isolado proteico de *Amburana cearensis* produzido. Velocidade de 0,5 L por hora, fluxo de ar 4, temperatura de entrada de 160 °C e temperatura de saída de 100 °C



FONTE: Foto tirada pelo autor

## **4.2.2 Composição Proximal**

### **4.2.2.1 Proteínas totais**

O teor de proteínas totais de PIAC e PIS foi determinado segundo o método de micro Kjeldahl através da quantificação de nitrogênio total. O experimento foi realizado em triplicata e o fator de conversão de nitrogênio para proteína utilizado foi de 6,25. Tubos para digestão contendo 0,05 g de amostra homogênea, 0,5 g de catalizador (sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio metálico na proporção 100:10:1, respectivamente) e 2,5 mL de ácido sulfúrico (P.A.), foram levados para um digestor (Marconi, modelo MA 448, Piracicaba, Brasil) e a temperatura foi elevada gradativamente até que se alcançasse 400 °C. As amostras foram digeridas durante 45 minutos e, após esfriarem, foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL e diluídas com água destilada até que seu volume fosse aferido. A quantidade total de nitrogênio contida nas amostras foi determinada através de ensaio fotocolorimétrico descrito por Baethgen e Alley (1989), utilizando curva padrão obtida com concentrações crescentes de sulfato de amônio.

### **4.2.2.2 Lipídios totais**

O teor de lipídios totais de PIAC e PIS foi determinado em triplicata, seguindo a metodologia descrita pela AOAC (1997). Amostras de 5 g foram pesadas em balança analítica, embaladas em cartuchos de papel filtro e transferidas para um sistema de Soxhlet 303 mm (Quimis M250008, Diadema, Brasil). A extração de lipídios utilizou hexano como solvente na proporção 1:30 (m/v) e ocorreu durante 8 horas contínuas. Finalizado o processo, o hexano foi transferido para béqueres, devidamente secos em estufa (105°C por 24 horas) e pesados, evaporado em capela de exaustão *overnight* e em estufa de secagem 105 °C por 4 horas. Os lipídios totais foram calculados pela diferença entre a massa final e inicial dos béqueres. Os cálculos percentuais foram realizados levando em consideração a amostra inicial.

### **4.2.2.3 Matéria mineral**

A matéria mineral de PIAC e PIS foi determinada seguindo a metodologia descrita pela AOAC (1997). O ensaio foi realizado em triplicata e as amostras pesando 0,5 gramas foram

levadas em cadinhos de porcelana a um forno mufla (Quimis, modelo Q-318m24, Diadema, Brasil). Após o aparelho atingir a temperatura de 550 °C, as amostras foram calcinadas durante 4 horas, transferidas para dessecador até atingir a temperatura ambiente e novamente pesadas. O valor de matéria mineral foi determinado pela diferença entre as massas final e inicial dos cadinhos e expresso como percentual da amostra inicial.

#### 4.2.2.4 Carboidratos totais e carboidratos digeríveis

O teor de carboidratos totais de FIAc e FIS foi determinado seguindo a metodologia descrita por Dubois (1956), onde 1 mL da amostra foi adicionado a 1 mL de fenol e 5 mL de ácido sulfúrico. Os tubos permaneceram em repouso por 15 minutos em banho de gelo e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Genesys 10, modelo Spectronic Unicam, New York, EUA) à 490 nm. As leituras foram comparadas a uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de glicose. A concentração de carboidratos foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{Concentração (mgC/mL)} = \frac{\text{absorbância} \times \text{fator} \times 1/\text{diluição}}{1000}$$

O percentual de carboidratos digeríveis na FIAc foi calculado por diferença dos demais constituintes (proteínas totais, lipídios totais, matéria mineral e fibra alimentar total), de forma que a soma total fosse 100%.

#### 4.2.2.5 Fibra alimentar total

A determinação do teor de fibra alimentar total de FIAc foi realizada seguindo metodologia de Prosky *et al.* (1988). Esta metodologia é recomendada pela AOAC (1997) e utiliza uma combinação de métodos enzimáticos e gravimétricos. Foi utilizado o kit para determinação de fibra alimentar total TDF-100A (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA). As amostras secas e desengorduradas foram gelatinizadas com  $\alpha$ -amilase termoestável e digeridas enzimaticamente com protease e amiloglucosidase, removendo assim as proteínas e o amido presentes na amostra, respectivamente. Em seguida, foi adicionado etanol 95% para precipitar a fibra alimentar solúvel e as amostras permaneceram em repouso “overnight”. O resíduo foi então filtrado em cadinho de vidro com fundo poroso, com o auxílio de bomba de vácuo (Liobras, modelo IS046, São Carlos, Brasil) e lavado com etanol 78%, 95% e com

acetona. Após a secagem em estufa, os resíduos foram pesados. Metade dos resíduos de cada amostra foi analisado para proteínas totais e o restante para matéria mineral, (segundo os tópicos 4.2.2.1 e 4.2.2.3, respectivamente). Paralelamente às amostras, foi realizado um ensaio “branco”, onde nenhuma amostra estava presente. O teor de fibra alimentar total (FAT) das amostras foi calculado segundo a fórmula a seguir:

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

Onde:

R(a) = Massa do resíduo após filtração

P(a) = Massa das proteínas no resíduo

C(a) = Massa da matéria mineral (cinzas) no resíduo

B = Resíduo(branco) – Proteínas(branco) – Matéria mineral (branco)

Pi(a) = Massa inicial da amostra

#### **4.2.3 Quantificação de proteínas solúveis**

A quantificação do teor de proteínas solúveis no extrato bruto (EB) foi realizada seguindo metodologia descrita por Bradford (1976), com pequenas alterações no volume do ensaio. Uma alíquota de 50 µL do extrato bruto foi adicionada a 1,25 mL do reagente de Bradford e a mistura foi agitada em agitador do tipo vortex (modelo QL-901, Biomixer, São Paulo, Brasil) por alguns segundos. Após repouso por 10 minutos em local protegido da luz, as absorbâncias foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas solúveis na amostra foi estimada em relação a uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) diluída em NaCl 0,9%.

#### **4.2.4 Determinação da composição de aminoácidos**

A análise dos aminoácidos totais e livres de FDAc, PIAc e PIS foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de fase reversa, segundo a metodologia descrita por Hagen *et al.* (1989). Para os aminoácidos totais foi realizada a hidrólise ácida com fenol onde ocorreu a liberação dos aminoácidos individuais. Aos aminoácidos liberados nesta etapa, foi adicionado o ácido α-aminobutírico como padrão interno. Após a eliminação do ácido por evaporação a vácuo foi realizada uma reevaporação



com solução de acetato de sódio, metanol e trietilamina. Após este procedimento foi realizada a derivatização do hidrolisado com solução de metanol, água ultrapura, trietilamina e fenilisotiocianato (PITC). Os aminoácidos foram dissolvidos em diluente e introduzidos na coluna. A fase móvel consistiu nos eluentes A e B. Os eluentes com pH 6,6 continham acetato de sódio, acetonitrila, água ultrapura e EDTA dissódico. As áreas dos picos obtidas à partir da amostra desconhecida foram quantificadas em comparação com as de uma mistura padrão de aminoácidos e padrão interno a 254 nm. Para os aminoácidos livres foram realizadas as etapas de extração e desproteíntização em HCl 0,1 M e metanol 99%, respectivamente. Os processos de secagem e derivatização foram os mesmos utilizados para os aminoácidos totais.

O aminoácido triptofano foi determinado segundo a metodologia descrita por Spies (1967). As amostras sofreram hidrólise enzimática com pronase a 40 °C durante 22-24 horas, seguida de reação colorimétrica com 4-dimetilaminobenzaldeído (DAB) em ácido sulfúrico 21,1 N e leitura em espectrofotômetro a 590 nm. O teor de triptofano foi calculado a partir de uma curva padrão.

#### ***4.2.5 Digestibilidade in vitro***

O ensaio de digestibilidade sequencial *in vitro* foi realizado utilizando as enzimas pepsina e tripsina, segundo a metodologia descrita por Tang *et al.* (2009). Em duplicata, 0,5 g de PIAC e PIS foram suspensos em HCl 0,1 M (pH 1,5) (1% m/v) e incubados em banho-maria a 37 °C por 5 minutos, sob agitação constante. Em seguida, 0,005 g de pepsina (enzima:proteína = 1:100 m/m) foi adicionado, homogeneizado e a suspensão incubada a 37 °C, por duas horas sob agitação constante. A reação foi parada com a adição de NaOH 5 M até a elevação do pH para 7,0. Foi adicionado 0,005 g de tripsina (enzima:proteína = 1:100 m/m) à mistura neutralizada e esta foi novamente incubada em banho-maria sob as mesmas condições por mais duas horas.

Lentamente (com o auxílio de uma bureta), foi adicionado o mesmo volume final da suspensão de ácido tricloroacético (TCA) 10%. A suspensão foi centrifugada e o teor de nitrogênio presente no precipitado (Nt) foi determinado conforme o tópico 4.2.2.1. Para a obtenção do controle negativo (branco), 0,5 g de PIAC e PIS foram suspensos em HCl 0,1 M e precipitados com TCA, sem terem passado pela digestão enzimática. A suspensão foi centrifugada e o nitrogênio presente no precipitado foi quantificado e denominado No.

A digestibilidade proteica (%) foi definida como:

$$\% \text{ Digestibilidade} = \frac{\text{No} - \text{Nt}}{\text{Ntot}}$$

No: Nitrogênio no precipitado da amostra que não sofreu digestão enzimática (branco)

Nt: Nitrogênio no precipitado da amostra que sofreu digestão enzimática

Ntot: Nitrogênio total presente na farinha da semente ou isolado proteico

#### 4.2.6 PDCAAS

O valor da digestibilidade proteica *in vitro* foi utilizado para o cálculo do escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS, *Protein digestibility corrected aminoacid score*) como descrito por WHO, FAO e UNU (2007), de acordo com a fórmula:

$$\text{PDCAAS} = \frac{\text{AA limitante do teste (mg)}}{\text{Proteína (g)}} \times \text{Digestibilidade proteica}$$

Mesmo AA na proteína referência (mg)/ Proteína (g)

#### 4.2.8 Fatores tóxicos e/ou antinutricionais

##### 4.2.8.1 Lectinas

A presença de lectinas nos isolados proteicos PIAC e PIS foi avaliada em triplicata através de ensaios de atividade hemaglutinante, seguindo a metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977), com pequenas modificações. Os isolados, na concentração de 1 mg/mL, foram diluídos seriadamente com solução salina (NaCl 0,9%) nas proporções 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 e 1:64 e a cada diluição foi adicionado uma suspensão à 2% de eritrócitos de coelho, rato e homem na proporção 1:1 (v/v). A solução de eritrócitos a 2% foi obtida à partir da “papa de hemácias” de acordo com a seção 3.4.1, tendo seu valor corrigido pelo hematócrito sanguíneo. O ensaio foi realizado com os eritrócitos nativos e com os eritrócitos previamente tratados com tripsina. O tratamento com a protease foi realizado através da mistura da solução de proteases (1 mg/mL) com a suspensão de eritrócitos a 2%, na proporção 1:100 (v/v), por 1 h, à temperatura ambiente e homogeneizações a cada 10 minutos. Em

seguida, as proteases foram retiradas por centrifugações e lavagens com solução salina. Os tubos contendo o extrato bruto dos isolados e suas diluições foram incubados a 37 °C, durante 30 minutos, com o sangue nativo e tratado de cada espécie de animal e, depois, por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 2.000 x g, por 2 minutos, e a aglutinação foi visualizada a olho nu. Os resultados foram expressos como título de hemaglutinação, o qual foi definido como a maior diluição capaz de provocar aglutinação visível, ou como a quantidade mínima de proteína ( $\mu\text{g/mL}$ ) capaz de induzir aglutinação visível.

#### 4.2.8.2 Inibidores de tripsina

A atividade inibitória de tripsina dos isolados PIAC e PIS foi determinada em triplicata de acordo com Erlanger *et al.* (1961), com algumas modificações e utilizando azocaseína como substrato. Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de solução de tripsina bovina (0,02 mg/mL em HCl 0,0025 M) foi incubada, por 10 minutos à 37 °C, com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 e 100  $\mu\text{L}$  da amostra. A reação foi iniciada adicionando 200  $\mu\text{L}$  de azocaseína 1% também em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. Após 20 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 300  $\mu\text{L}$  de TCA (ácido tricloroacético - 20%). A mistura foi centrifugada a 10.000 x g, por 10 minutos e o sobrenadante alcalinizado com NaOH 2 M (1:2 v/v). A leitura das absorbâncias foi realizada a 440 nm e os resultados expressos em percentual de inibição (%) e unidade de inibição (UI), definida como o decréscimo em 0,01 da absorbância a 440 nm.

#### 4.2.8.3 Inibidores de quimotripsina

A atividade inibitória de quimotripsina dos isolados PIAC e PIS foi determinada em triplicata também de acordo com Erlanger *et al.* (1961). A atividade foi realizada de forma semelhante ao tópico anterior. A solução de quimotripsina (0,02 mg/mL em HCl 0,0025 M) foi incubada por 10 minutos a 37 °C, com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 e 100  $\mu\text{L}$  da amostra. A reação foi iniciada adicionando 200  $\mu\text{L}$  de azocaseína 1% também em tampão Tris. Após 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 300  $\mu\text{L}$  de TCA 20%. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g, por 10 minutos e o sobrenadante alcalinizado com NaOH 2 M (1:2 v/v). A leitura das absorbâncias foi realizada a 440 nm e os resultados

expressos em percentual de inibição (%) e unidade de inibição (UI), definida como o decréscimo em 0,01 da absorbância a 440 nm.

#### **4.2.9 Atividade antioxidante**

##### **4.2.9.1 Sequestro do Radical DPPH (difenil-picril-hidrazil)**

A atividade antioxidante dos isolados proteicos (PIAc e PIS) foi avaliada segundo o método fotolorimétrico baseado na capacidade de varredura do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila), descrito por Mensor *et al.* (2001) com adaptação para microplaca. Foi preparada uma solução de 150 µM de DPPH em etanol e foi construída uma curva padrão com concentrações decrescentes do reagente, variando de 150 a 0 µM. As amostras foram diluídas em etanol com concentrações variando de 8 a 1.000 µg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata, em microplaca, adicionando-se 22 µL das amostras em diferentes concentrações a 200 µL da solução DPPH. Como controle negativo, foi usado 22 µL de etanol misturado a 200 µL de DPPH. Para controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico (vitamina C). A reação ocorreu no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente e a absorbância foi lida a 520 nm. Com base nos resultados obtidos foi determinada a concentração capaz de inibir 50% do DPPH (CI50) em µg/mL. A atividade antioxidante foi estimada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% N = \frac{(\text{Abscontrole} - \text{Absamostra})}{\text{Abscontrole}} \times 100$$

Onde % N é o percentual de neutralização, Abscontrole é a absorbância do controle negativo (DPPH + álcool) e Absamostra é a absorbância das amostras.

#### **4.3 Perfil de solubilidade e propriedades funcionais**

##### **4.3.1 Perfil de solubilidade do nitrogênio**

O perfil de solubilidade proteica de PIAc e PIS foi determinado indiretamente, em duplicata, a partir da solubilidade do nitrogênio presente nas amostras. Em tubos plásticos previamente pesados, foram adicionados 200 mg de amostra em suspensão com 10 gramas de

água destilada e o pH da solução foi ajustado para 2, 4, 6, 8 e 10 com HCl 1 M ou NaOH 1 M. Após o ajuste, a massa final foi completada para 20 gramas acrescentando água destilada. A mistura foi agitada à temperatura ambiente (aproximadamente 24 °C) por 10 minutos em agitador do tipo vortex e centrifugada a 3.000 x g, 20 °C, durante 20 minutos. O teor de proteínas totais extraídas no sobrenadante foi determinado utilizando a metodologia de (micro) Kjeldahl para amostras líquidas (AOAC, 1997), segundo a seção 4.2.2.1. O fator de conversão de nitrogênio em proteína utilizado foi de 6,25. A solubilidade proteica, expressa em percentual, para cada pH foi determinada como:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{Nitrogênio total no sobrenadante}}{\text{Nitrogênio total da amostra}} \times 100$$

#### ***4.3.2 Capacidade de absorção de água (CAA)***

A capacidade de absorção de água de PIAC e PIS foi determinada em triplicata seguindo a metodologia descrita por Aydemir e Yemenicioğlu (2013), com alterações na proporção entre amostra utilizada e água destilada. Em tubos para microcentrífuga previamente pesados, as amostras foram misturadas a água destilada na proporção de 1:20 (m/v). As suspensões foram misturadas em agitador do tipo vortex, incubadas em banho-maria a 30 °C por 30 minutos e centrifugadas a 15.000 x g, 20 °C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e os tubos foram novamente pesados. CAA foi expressa como a quantidade de água (em gramas) retida por grama de amostra, de acordo com a diferença entre a massa final e inicial dos tubos.

#### ***4.3.3 Capacidade de absorção de óleo (CAO)***

A capacidade de absorção de óleo de PIAC e PIS também foi determinada em triplicata seguindo a metodologia descrita por Aydemir e Yemenicioğlu (2013), com alterações na proporção entre amostra e água destilada. O procedimento foi o mesmo descrito na seção 4.3.2 para capacidade de absorção de água. O óleo utilizado foi óleo de soja comum para salada (Liza<sup>®</sup>, Cargill, São Paulo, SP, Brasil). CAO foi calculada pela diferença entre a massa final e inicial dos tubos, expressa como a quantidade de óleo (em gramas) retida por grama de amostra.

#### 4.3.4 Atividade emulsificante (AEm) e estabilidade da emulsão (EEm)

A atividade emulsificante (AEm) de PIAC e PIS foi determinada em triplicata, seguindo a metodologia descrita por Yasumatsu *et al.* (1972). Em tubos plásticos graduados de 15 mL, foram adicionados 350 mg de amostra, 5 mL de água destilada e 5 mL de óleo de soja (Liza<sup>®</sup>, Cargill, São Paulo, SP, Brasil). A mistura foi homogeneizada com o auxílio de um agitador do tipo vortex durante 5 minutos. Após a formação da emulsão, os tubos foram centrifugados a 1.300 x g, 20 °C, por 5 minutos. A atividade emulsificante foi determinada levando em consideração a altura da camada emulsificada em relação à altura total da mistura no tubo, de acordo com a fórmula:

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

Para a determinação da estabilidade da emulsão (EEm) formada, as amostras foram aquecidas em banho-maria a 80 °C por 30 minutos e rapidamente resfriadas em banho de gelo durante 5 minutos. Os tubos graduados foram novamente centrifugados a 1.300 x g, 20 °C, por 5 minutos e a estabilidade da emulsão foi determinada da mesma maneira que a atividade emulsificante.

#### 4.3.5 Atividade espumante (AEs) e estabilidade da espuma (EEs)

A capacidade de formação de espuma de PIAC e PIS e a estabilidade desta espuma, foram determinadas em triplicata seguindo a metodologia descrita por Aydemir e Yemenicioğlu (2013), com alterações na proporção de amostra e água destilada utilizada. As amostras, de 2 gramas cada, foram dissolvidas em 80 mL de água destilada e o pH da mistura foi ajustado para 7,0 com HCl 1 M ou NaOH 1 M. O volume foi ajustado para 100 mL de forma a manter a concentração proteica de 2% (m/v). Utilizando um agitador mecânico (IKA T180, Staufen, Alemanha) as amostras foram homogeneizadas durante 5 minutos na velocidade 5 (de 10) do aparelho. A mistura foi imediatamente transferida para uma proveta graduada de 250 mL e a altura da faixa de espuma registrada.

A porcentagem de aumento de volume por conta da formação de espuma foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Volume} = \frac{(V_2 - V_1) \times 100}{V_1}$$

Onde:  $V_2$  é o volume após a homogeneização do material.

$V_1$  é o volume inicial da mistura, antes da homogeneização.

A estabilidade da espuma foi avaliada de acordo com a redução da altura da faixa de espuma (%) nos intervalos de tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos após a homogeneização inicial do material.

#### **4.3.6 Menor concentração geleificante (MCG)**

A capacidade de formação de gel de PIAC e PIS foi determinada seguindo a metodologia descrita por Aydemir e Yemenicioğlu (2013), com pequenas modificações. Para resultados mais facilmente comparáveis entre si o pH foi ajustado para 7,0, etapa não existente no trabalho original dos autores. Suspensões das amostras (5 mL) foram preparadas nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 1, 12, 14, 16, 18 e 20% em água destilada e foram colocadas em tubos de ensaio com 1,46 mm de diâmetro e homogeneizadas com o auxílio de agitador do tipo vortex por 2 minutos. Os tubos foram aquecidos a 80 °C durante 1 hora, rapidamente resfriados em banho de gelo por 5 minutos e mantidos a 4 °C durante um período de 4 horas. A menor concentração capaz de promover geleificação (MCG) foi aquela em que a inversão dos tubos não permitiu as amostras caírem ou deslizarem pelas paredes do tubo.

### **4.4 Avaliação toxicológica**

#### **4.4.1 Atividade hemolítica**

A atividade hemolítica dos isolados proteicos PIAC e PIS foi investigada segundo a metodologia descrita por Merker e Levine (1986) e Bernheimer (1988), com algumas modificações. As “papas de hemácias” obtidas na seção 3.4.1 foram utilizadas na preparação das suspensões de eritrócitos de rato, coelho e humano. Uma alíquota foi misturada a solução

salina (NaCl 0,9%) na proporção 1:100 (v/v). A suspensão foi levemente misturada e acondicionada a 4 °C. A suspensão foi incubada a 37 °C por 1 h na proporção 1:10 (m/v) com concentrações crescentes das amostras, variando de 8 a 2.000 µg/mL. O grau de hemólise foi calculado pela liberação de hemoglobina, medida por absorbância a 540 nm, após centrifugação a 1000 x g por 5 minutos a 25 °C. A lise completa (100%) foi obtida por diluição de proporção 1:10 (m/v) em água destilada. O controle negativo foi obtido com a mesma proporção de células em solução salina. A atividade hemolítica foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\frac{(\text{Abs da amostra} - \text{Abs do controle negativo})}{\text{Abs do controle positivo}} \times 100$$

#### ***4.4.2 Toxicidade oral aguda***

O ensaio de toxicidade aguda via oral dos isolados proteicos PIAC e PIS foi realizado de acordo com o protocolo 420 da “Organization of Economic Cooperation and Development – OECD” (OECD, 1995). Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss (n=6/grupo) com 6 semanas de idade (aproximadamente 22g) provenientes do biotério central - BIOCEN-UFC (seção 3.4.2). As amostras foram suspensas em solução salina (NaCl 0,9%) e administradas por gavagem na dose de 2.000 mg/kg de peso do animal. O grupo controle recebeu apenas solução salina. Os camundongos foram observados nas primeiras horas após a administração e duas vezes ao dia durante 14 dias. Sinais evidentes de toxicidade: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono, alterações na pele, pêlos, olhos e mucosas, do aparelho respiratório, circulatório, autônomo e sistema nervoso, foram observados. O peso dos animais foi registrado nos dias 0, 4, 7, 10 e 14. No 14º dia, os animais foram sacrificados por overdose com halotano e submetidos a autópsia para observação anátomo-morfológica dos órgãos.

#### ***4.4.3 Toxicidade oral de doses repetidas***

O estudo de toxicidade oral em doses repetidas dos isolados proteicos PIAC e PIS foi realizado de acordo com o protocolo 407 da OECD (OECD, 1995). Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar (n=5/grupo) provenientes do Biotério Central - BIOCEN-UFC. Após o desmame, os animais foram submetidos a um período de aclimação



ao novo ambiente durante cinco dias. As amostras foram suspensas em solução salina (NaCl 0,9%) e administradas por gavagem, no mesmo período do dia, durante 28 dias na dose de 1.000 mg/kg de peso do animal. O grupo controle recebeu apenas solução salina. Os ratos foram observados duas vezes ao dia por todo o experimento e o peso dos animais e consumo médio de ração foram registrados semanalmente. No 28º dia, os animais tiveram seu sangue coletado via plexo-orbital e foram sacrificados por overdose com halotano. Estes foram submetidos a autópsia anátomo-morfológica e dissecados para retirada de órgãos.

#### *4.4.3.1 Determinação de parâmetros hematológicos*

Ao final do experimentos de toxicidade, protocolo OECD 407, os animais tiveram o sangue coletado via plexo-orbital em tubos com EDTA. Os parâmetros hematológicos foram verificados utilizando um analisador hematológico automatizado (Sysmex, pocH – 100 iV Diif, Japão). Foram determinadas concentrações de leucócitos totais (WBC), eritrócitos totais (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), concentração corpuscular média (MCH), volume corpuscular médio (MCV), concentração corpuscular média de hemoglobina (MCHC), contagem de plaquetas (PLT), volume plaquetário médio (MPV), porcentagem de linfócitos do total de leucócitos (LYM %), porcentagem de neutrófilos, basófilos e monócitos do total de WBC (OTHR %) e índice de macrotrombócitos (P-LCR).

#### *4.4.3.2 Determinação de parâmetros bioquímicos*

Ao final do experimentos de toxicidade, protocolo OECD 407, os animais tiveram o sangue coletado via plexo-orbital. O sangue permaneceu em repouso à 4 °C por 1 hora para formação de coágulo e foi centrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos para a obtenção do soro que foi aliquoteado e mantido congelado a -20 °C para posteriores análises. Dez dos parâmetros bioquímicos foram verificados utilizando um analisador bioquímico automatizado Cobas C111 (Roche Diagnóstica Ltda, São Paulo, Brasil). Foram determinadas as concentrações de glucose, colesterol total, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, creatinina, proteína total, albumina, bilirrubina total e bilirrubina direta. Os níveis sanguíneos de sódio e potássio foram determinados utilizando kits Bioclin, seguindo as instruções do fabricante.

#### *4.4.3.3 Determinação do peso úmido relativo dos órgãos*

Ao final do experimentos de toxicidade, protocolo OECD 407, os animais foram autopsiados e dissecados. Os órgãos (cérebro, timo, coração, fígado, baço, rins, supra-renais, gônadas e órgãos sexuais acessórios) foram devidamente pesados e observados quanto a alterações morfológicas. Foi calculado o peso relativo dos órgãos (peso do órgão/peso da carcaça) para cada órgão de cada animal.

#### *4.4.3.4 Análises histopatológicas*

Foram escolhidos aleatoriamente dois animais por grupo. Os órgãos foram cortados, tranferidos para cassetes plásticos e fixados em formalina tamponada 10% para análise histopatológica. A desidratação ocorreu com concentrações crescentes de álcool e seguiu-se a diafanização em xilol, inclusão em parafina líquida e microtomia. As lâminas foram coradas de acordo com o tecido e encaminhados para análise histopatológica. Os órgãos analisados foram: cérebro, timo, coração, baço, fígado, supra-renais, rins, gônada e órgãos sexuais acessórios (epidídimo e testículos para ratos machos, útero e ovário para ratos fêmeas).

### **4.5 Análise Estatística**

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

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção do isolado proteico

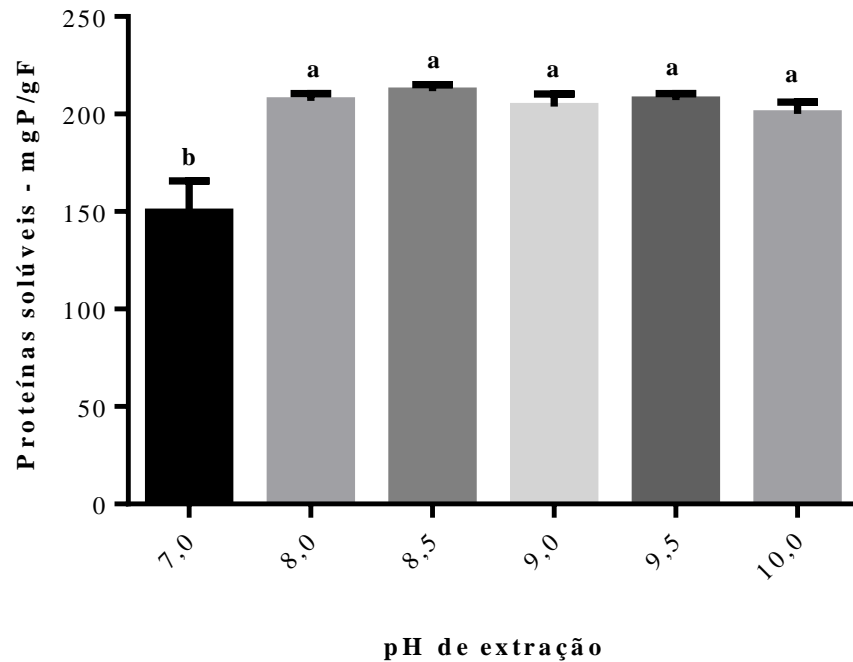
#### 5.1.1 pH de extração proteica

O gráfico 1 apresenta o rendimento das proteínas solúveis extraídas a partir de FDAC em diferentes pH (7; 8; 8,5; 9; 9,5 e 10). Os pH 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 e 10 extraíram  $206,76 \pm 3,76$ ;  $211,76 \pm 3,28$ ;  $203,92 \pm 6,29$ ;  $207,20 \pm 3,42$  e  $200,19 \pm 5,88$  mgP/gF, respectivamente. Segundo o teste estatístico, não foram observadas alterações significativas na extração proteica nestes pH. O pH 7,0 extraiu a menor quantidade de proteínas ( $149,76 \pm 16,05$  mgP/gF). Esse resultado já era esperado, uma vez que, a solubilidade das proteínas de plantas, geralmente, é elevada em pH alcalino e vai sendo reduzida em valores de pH moderadamente ácidos (BOYE *et al.*, 2010).

#### 5.1.2 Degradação de proteínas em virtude do pH

A Figura 6 apresenta o perfil da eletroforese realizada com o extrato bruto obtido a partir de FDAC extraída em pH 7; 8; 8,5; 9; 9,5 e 10. O perfil proteico não apresenta indícios de degradação que poderiam estar presentes em pH muito alcalinos. Este resultado, somado às informações obtidas no tópico 5.1.1, levaram à escolha do pH 9,0 para a extração proteica da FDAC. O pH 9,0 apresentou rendimento, em termos de extração proteica, estatisticamente igual aos pH 8; 8,5; 9,5 e 10,0, se encontrando no centro, onde pequenas variações durante a extração não prejudicariam o resultado final. Além disso, em análises realizadas anteriormente pelo grupo, percebeu-se que pH mais elevados tornam a solução contendo as proteínas solúveis intensamente viscosa, dificultando análises, tal como, a manipulação do extrato proteico. Após extração a pH 9,0 a solução se apresentou fluída e fácil de manipular. Desta forma, o pH 9,0 foi escolhido como detentor das melhores características para a extração de proteínas de FDAC.

Gráfico 1: Efeito da variação de pH sobre a extração proteica da farinha desengordurada de *Amburana cearensis*- FDAc (extração em água destilada ajustada para diferentes pH, extração por 1 h, proporção 1:50 m/v, temperatura ambiente)



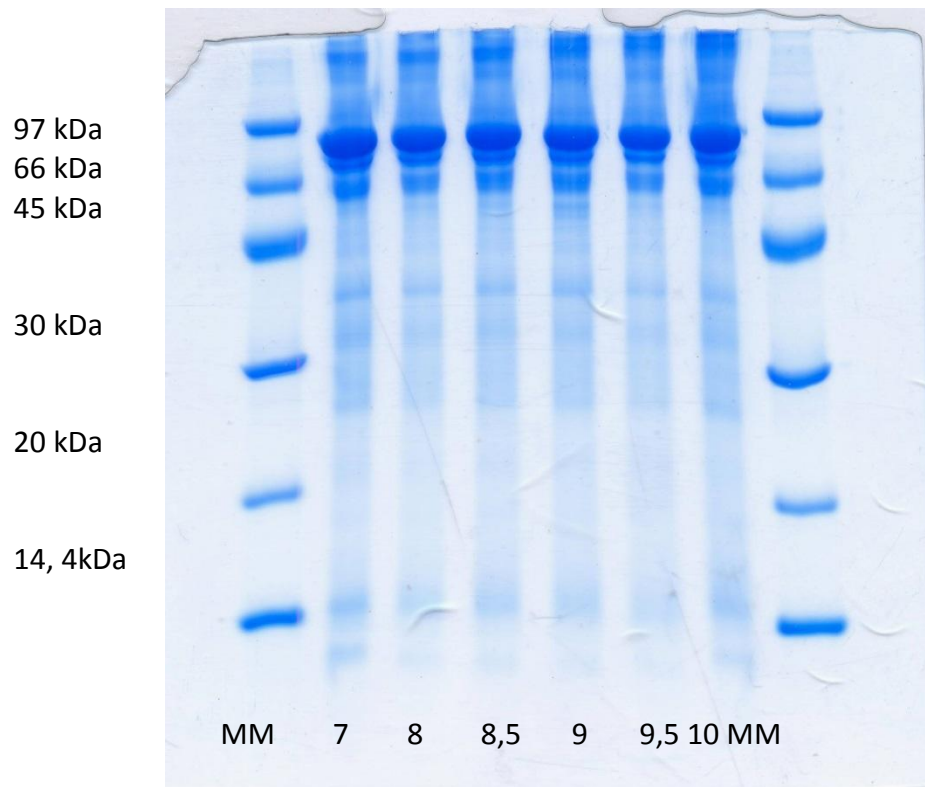
FONTE: Elaborado pelo autor

A quantidade de proteínas extraídas está representada como miligrama de proteína por grama de farinha (mgP/gF)

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados apresentados são médias e as barras mais finas representam o desvio padrão

Figura 6: Perfil eletroforético das proteínas do extrato bruto das sementes de *Amburana cearensis* produzido em pH 7; 8; 8,5; 9; 9,5 e 10



FONTE: Elaborado pelo autor

Cada linha contém 15  $\mu\text{g}$  de proteínas (DC Protein Assay™, BioRad)

MM: Marcador de massa molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad (4  $\mu\text{L}$ )

### **5.1.3 Presença e concentração de sal durante a extração**

O gráfico 2 apresenta a quantidade de proteínas extraídas (mg P/g F<sub>DAc</sub>) de acordo com a concentração de cloreto de sódio presente na solução extratora e em extração realizada apenas com água destilada. Foram testadas cinco diferentes concentrações de NaCl, onde 0,1 e 0,2 M foram as concentrações que conseguiram extrair a maior quantidade de proteínas solúveis,  $188,31 \pm 1,66$  e  $189,10 \pm 2,15$  mg P/g F, respectivamente. Não havendo diferença estatística entre os dois resultados.

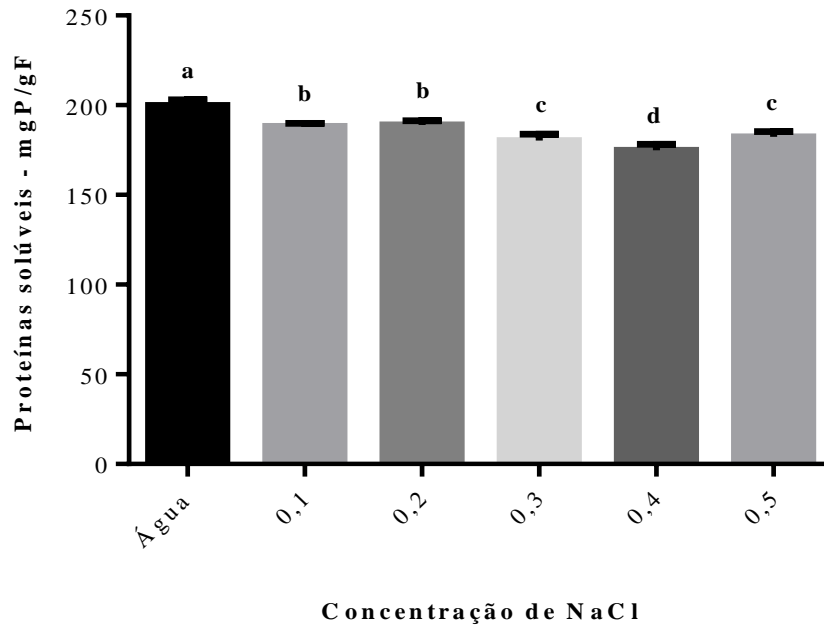
As demais concentrações (0,3; 0,4 e 0,5 M) apresentaram resultados semelhantes entre si  $180,37 \pm 3,46$ ;  $174,80 \pm 3,34$  e  $182,32 \pm 2,98$  mg P/g F, respectivamente. Podemos perceber, neste caso, que nem sempre maiores concentrações de sal resultam em uma maior extração de proteínas, o efeito pode ser indiferente ou o oposto. Segundo Yuliana (2014), a adição de uma pequena quantidade de NaCl aumenta a solubilidade proteica na solução. No entanto, novos aumentos na concentração deste sal, superiores a 0,5 M, podem resultar em uma interação de forma negativa.

A extração somente com água destilada apresentou resultado ligeiramente superior àquelas das soluções de NaCl testadas ( $199,98 \pm 3,0$  mg P/gF). Isto pode ter ocorrido devido a características intrínsecas das proteínas da F<sub>DAc</sub>. A não utilização de sal durante a etapa de extração elimina a necessidade de uma etapa de diálise do material, que culminaria em elevado gasto de tempo e limitação ao volume extraído. Portanto, foi selecionada a extração somente com água destilada como detentora das melhores características para a fabricação do isolado proteico das sementes de *A. cearensis*.

### **5.1.4 Proporção F<sub>DAc</sub>/Solvente e necessidade de reextração da amostra**

De acordo com o gráfico 3, as proporções 1:20 e 1:30 farinha/solvente foram as que detiveram os melhores resultados  $247,73 \pm 11,19$  e  $248,73 \pm 9,15$  mg P/g F, respectivamente, não existindo diferença estatística entre a extração em ambas as proporções. Estas foram seguidas por 1:10 ( $226,32 \pm 9,20$  mg P/gF). Este resultado já era esperado pois, segundo Adebowale (2008), com a diminuição da proporção farinha/solvente, ocorre um aumento na quantidade de proteínas extraídas pela solução. Quanto mais concentrada a solução, maior a dificuldade de se extrair as proteínas presentes e mantê-las solúveis.

Gráfico 2: Efeito da adição de diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) sobre a quantidade de proteínas solúveis extraídas da farinha desengordurada de *Amburana cearensis* -FDAc (extração em pH 9,0; por 1 h, proporção 1:50 m/v, temperatura ambiente)



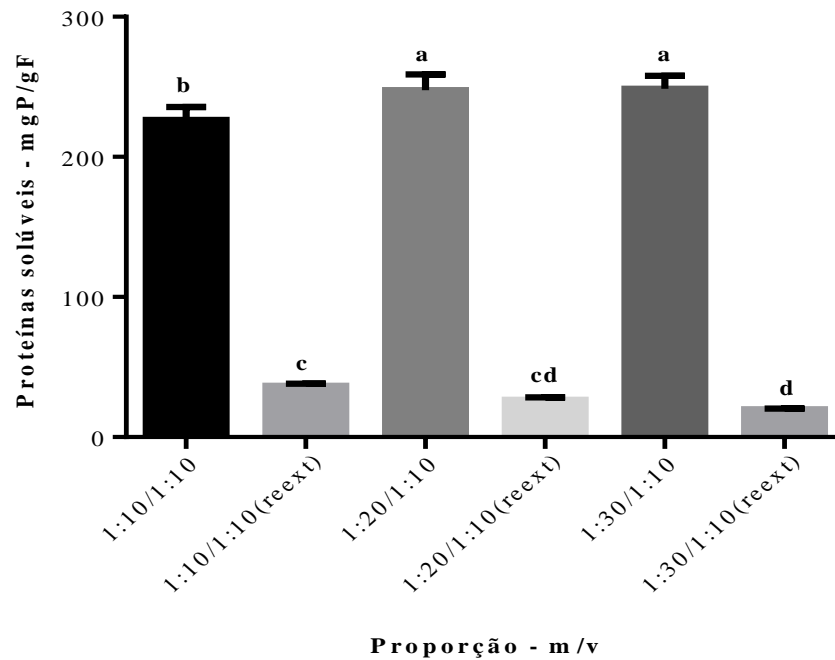
FONTE: Elaborado pelo autor

A quantidade de proteínas extraídas está representada como miligrama de proteína por grama de farinha (mgP/gF)

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados apresentados são médias e as barras mais finas representam o desvio padrão

Gráfico 3: Efeito da proporção farinha/solução extratora e da reextração sobre a quantidade de proteínas extraídas a partir da farinha desengordurada de *Amburana cearensis* -FDAc (extração em água destilada ajustada para pH 9,0; por 1 h, temperatura ambiente)



FONTE: Elaborado pelo autor

A quantidade de proteínas extraídas está representada em miligrama de proteína por grama de farinha (mgP/gF)

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados apresentados são médias e as barras mais finas representam o desvio padrão



Com relação a reextração do material os resultados foram  $36,69 \pm 1,52$ ;  $26,68 \pm 1,74$  e  $19,98 \pm 0,49$  mg P/g F para as proporções 1:10, 1:20 e 1:30, respectivamente. É possível perceber que uma segunda extração do resíduo (reextração) aumentou um pouco o rendimento nas diferentes proporções e que esse aumento foi indiretamente proporcional à quantidade de proteínas extraídas na primeira extração. A proporção que extraiu a maior quantidade de proteínas na primeira extração, extraiu a menor quantidade de proteínas na reextração e vice-versa.

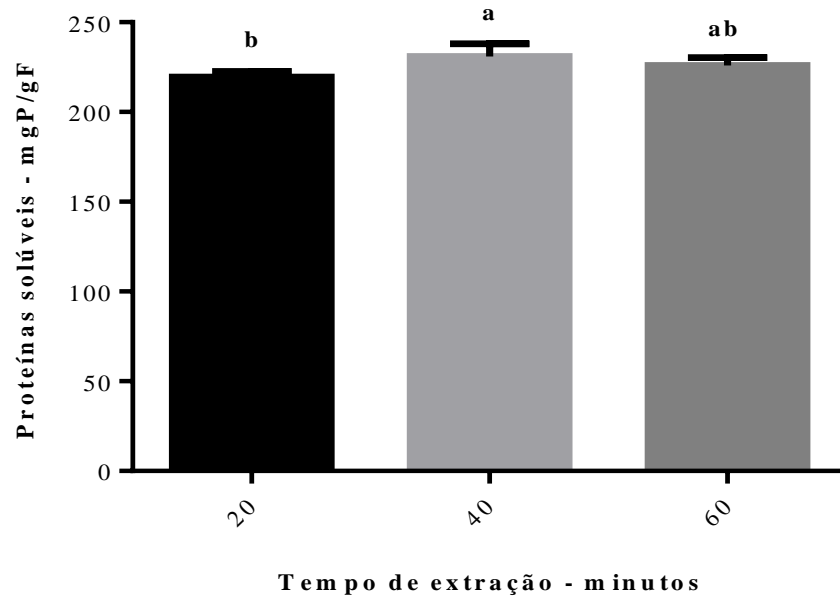
De acordo com os resultados obtidos, foi estabelecido que a extração das proteínas de FDaC para a produção do isolado proteico seria realizada na proporção 1:20 (farinha/solvente), sem a necessidade de reextração do material. Não existindo diferença significativa entre a proporção 1:20 e 1:30, esta escolha ocorreu devido a conveniência. A utilização de um protocolo com proporção 1:30 necessita de um número superior de centrifugações devido ao grande volume de líquido e isso aumenta de forma considerável o tempo gasto para a extração do material. A reextração da amostra também não se julgou conveniente, embora aproveite melhor as sementes, o pequeno acréscimo na quantidade de proteínas extraídas não justifica o tempo gasto em uma segunda reextração.

### **5.1.5 Tempo de extração**

O gráfico 4 apresenta a quantidade de proteínas extraídas de FDaC de acordo com o tempo de extração. Para os tempos 20, 40 e 60 minutos, foram extraídas  $219,50 \pm 3,08$ ;  $230,91 \pm 7,01$  e  $225,95 \pm 4,28$  mg P/g F, respectivamente. Segundo Adebawale (2008), a maior parte das proteínas são extraídas durante os primeiros 10 a 20 minutos de extração. Em períodos de tempo mais longos, superiores a 30 minutos, a quantidade de proteínas em solução vai aumentando de forma gradual, de acordo com o tempo de extração, até o momento em que a extração vai cessando.

Como os resultados obtidos para os diferentes tempos testados foram praticamente iguais, por questões de conveniência, o tempo selecionado como ideal para a extração das proteínas das sementes de *A. cearensis* foi o menor tempo, 20 minutos de extração.

Gráfico 4: Efeito do tempo sobre a quantidade de proteínas extraídas da farinha desengordurada de *Amburana cearensis* - FDAC (extração em diferentes intervalos de tempo com água destilada ajustada para pH 9,0; proporção 1:50 m/v, temperatura ambiente)



FONTE: Elaborado pelo autor

A quantidade de proteínas extraídas está representada em miligrama de proteína por grama de farinha (mgP/gF)

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados apresentados são médias e as barras mais finas representam o desvio padrão

### 5.1.6 pH de precipitação de proteínas

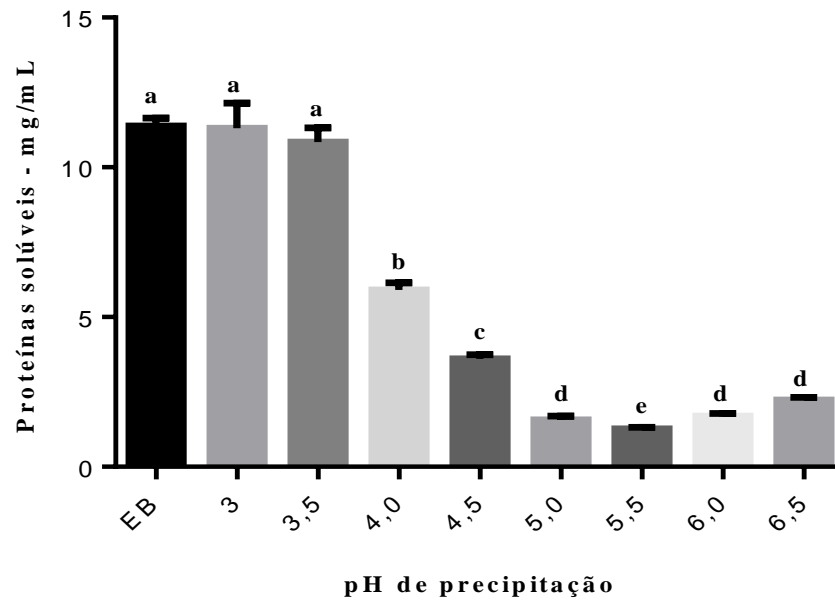
O gráfico 5 apresenta o rendimento das proteínas solúveis obtidas a partir de FDAc em pH 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6 e 6,5. Os pH que apresentaram a maior quantidade de proteínas extraídas foram o 3,0 ( $11,31 \pm 0,83$  mg/mL) e o 3,5 ( $10,85 \pm 0,47$  mg/mL). Esses pH concentraram a totalidade de proteínas presentes no extrato bruto (EB) de FDAc ( $11,38 \pm 0,26$  mg/mL), não havendo diferença estatística entre os três resultados. Em pH distinto do ponto isoelétrico, as proteínas possuem cargas líquidas diferentes de zero e repelem-se entre si, podendo interagir com moléculas de água, portanto, são mais solúveis (FILHO; VASCONCELOS, 2011).

O pH que extraiu a menor quantidade de proteínas solúveis, aquele que portanto precipitaria a maior parte delas, seu ponto isoelétrico (PI), foi o 5,5 ( $1,27 \pm 0,04$  mg/mL). Este pH foi seguido, pelo 5,0 ( $1,57 \pm 0,12$  mg/mL) e pelo 6,0 ( $1,70 \pm 0,09$  mg/mL), esses dois últimos não apresentaram diferença estatística entre si. Esses resultados condizem com o descrito por Damodaram *et al.* (2010), onde o PI das proteínas, aquele no qual sua carga líquida é igual a zero, pode variar entre 4,0 e 6,0. O ponto isoelétrico no caso das proteínas de FDAc extraídas em pH 9,0 seria por volta de 5,0 e 6,0. O pH escolhido para precipitação proteica, neste caso, foi o pH 5,5.

### 5.1.7 Produção do isolado proteico

As variáveis analisadas foram comparadas com base no teor de proteínas solúveis detectadas no sobrenadante após as diferentes extrações. Os resultados foram considerados de forma comparativa para cada variável de forma independente. Ao fim das análises, as condições ideais escolhidas para a obtenção do isolado proteico das sementes de *A. cearensis* foram: extração com água destilada na proporção 1:20 farinha/solvente (m/v) por 20 minutos, sem reextração. O pH escolhido para extração das proteínas foi o 9,0 e, como ponto isoelétrico, para precipitação proteica, foi escolhido o pH 5,5. Os demais passos realizados durante a produção do isolado (PIAc) estão descritos no tópico 4.1.8.

Gráfico 5: Efeito da variação de pH sobre a extração proteica da farinha desengordurada de *Amburana cearensis* - FDAc (extração em água destilada ajustada para diferentes pH, extração por 1 h, proporção 1:50 m/v, temperatura ambiente)



FONTE: Elaborado pelo autor

A quantidade de proteínas extraídas está representada como miligrama de farinha por mililitro (mg/mL)

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados apresentados são médias e as barras mais finas representam o desvio padrão

### **5.1.8 Determinação do rendimento bruto e rendimento líquido de proteínas**

O rendimento da obtenção de isolados proteicos é um fator determinante para sua produção, tornando-o viável para utilização do ponto de vista industrial. Dadas as condições definidas como ideais, o rendimento bruto obtido para o isolado proteico de *A. cearensis* (PIAc) foi de 17,85%, com rendimento líquido de proteínas de 53,96%. Este resultado foi positivo se comparado aos rendimentos bruto e líquido anteriormente determinados pelo grupo (15 e 45,55%) para a mesma semente (*A. cearensis*) ou aos rendimentos bruto e líquido de um isolado proteico de outra semente de leguminosa da Caatinga *Parkia platycephala*, popularmente conhecida como visgueiro (6,08 e 18,88%, respectivamente). O rendimento, neste segundo caso, foi determinado após os mesmos experimentos para se chegar às condições ideais de extração (dados não publicados), tal como foi realizado para *A. cearensis*.

Se compararmos o rendimento de proteínas do isolado aos descritos na literatura, Zhang *et al.* (2013) encontraram valores de 50,50 a 62,53% para isolados proteicos de soja após determinação de condições de extração. Medeiros (2013) encontrou rendimentos de 35,11 a 38,12% para isolados de *V. unguiculata*. Stone *et al.* (2015) encontraram rendimentos de 30,7 a 74,8 para isolados de ervilha extraídos de diferentes cultivares em diferentes condições. O rendimento proteico de *A. cearensis* está, pois, na mesma faixa dos descritos, mostrando que o isolado produzido possui bom rendimento (53,96%) e apresenta grande potencial.

## **5.2 Caracterização bioquímica e nutricional**

### **5.2.1 Teor de umidade e composição proximal**

A Tabela 1 apresenta o teor de umidade e a composição proximal da farinha integral de *A. cearensis* (FIAC), isolado proteico de *A. cearensis* (PIAc) e isolado proteico de soja (PIS) e a umidade, proteínas totais e teor de lipídios da farinha desengordurada de *A. cearensis* (FDAC). Se compararmos os resultados encontrados aos valores obtidos por Carvalho *et al.* (2011) para 14 espécies de leguminosas da Caatinga, com potencial bioativo e/ou nutricional, podemos perceber que a farinha das sementes de *A. cearensis* se apresenta bastante promissora do ponto de vista nutricional.

Tabela 1: Teor de umidade e composição proximal da farinha integral de *Amburana cearensis* (FIAc), isolado proteico de *Amburana cearensis* (PIAc) e isolado proteico de soja (PIS). Umidade, proteínas totais e teor de lipídios da farinha desengordurada de *Amburana cearensis* (FDAc). Comparação com valores mínimo e máximo encontrados em estudo realizado com 14 espécies subutilizadas de leguminosas da Caatinga

	FIAc	FDAc	PIAc	PIS	Carvalho <i>et al</i> (2011) <sup>4</sup>
<b>Umidade</b> <sup>1</sup>	4,11 ± 0,01% <sup>a</sup>	4,07 ± 0,07% <sup>a</sup>	4,49 ± 0,22% <sup>a</sup>	4,78 ± 0,28% <sup>a</sup>	6,70 - 15,90
<b>Composição proximal em base seca (%)</b>					
<b>Proteínas</b> <sup>1</sup>	21,97 ± 3,12 <sup>d</sup>	33,08 ± 0,54 <sup>c</sup>	97,86 ± 0,96 <sup>a</sup>	86,71 ± 2,38 <sup>b</sup>	10,90 - 50,0
<b>Lipídios</b> <sup>1</sup>	29,66 ± 0,20 <sup>a</sup>	4,48 ± 0,17 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,45 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,70 - 29,60
<b>Fibras</b> <sup>1</sup>	35,04 ± 1,30	NR	NR	NR	0,80 - 52,30
<b>Cinzas</b> <sup>1</sup>	4,83 ± 0,08 <sup>a</sup>	NR	2,2 ± 0,07 <sup>c</sup>	3,93 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,80 - 6,80
<b>Carboidratos</b>	8,50 <sup>3</sup>	NR	3,51 ± 0,27 <sup>2b</sup>	3,77 ± 0,19 <sup>2a</sup>	0,30 - 77,80

FONTE: Elaborada pelo autor

<sup>1</sup>Realizado de acordo com metodologias recomendadas por AOAC, 1997

<sup>2</sup>Realizado segundo metodologia de Dubois *et al.* 1956

<sup>3</sup>Realizado por diferença entre os demais constituintes

<sup>4</sup> CARVALHO, A. F. U. *et al.* 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.

Letras diferentes na horizontal indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados obtidos são médias ± desvio padrão de triplicatas

NR: Não Realizado

O valor de umidade presente em FIAc, FDAc, PIAc e PIS foi de 4,11; 4,07; 4,49 e 4,78%, respectivamente. Não ocorreu diferença estatística entre esses resultados. Carvalho *et al.* (2011) encontraram teores de umidade semelhantes para outras leguminosas, cujos valores variaram entre  $6,7 \pm 0,6\%$  para *Lonchocarpus sericeus* e  $15,9 \pm 0,5\%$  para *Caesalpinia bracteosa*. Segundo o autor, a relativa umidade presente nestas sementes, no entanto, parece não comprometer sua qualidade nutricional quando submetida a longos períodos de estocagem. Os valores mais baixos de umidade encontrados neste trabalho podem estar relacionados ao método de armazenamento do material, ao método de obtenção dos isolados ou a características intrínsecas das próprias amostras.

Destaca-se em *A. cearensis* seu elevado teor de proteínas ( $21,97 \pm 3,12\%$ ). Este teor é semelhante ao encontrado por Carvalho *et al.* (2012) para *Vigna unguiculata*, feijão muito consumido no Brasil, sobretudo nas regiões Norte e Nordeste, com valores variando entre  $17,4 \pm 1,0\%$  e  $28,3 \pm 0,7\%$  para os diferentes genótipos. Se compararmos *A. cearensis* aos resultados obtidos por Carvalho *et al.* (2011) para outras 14 leguminosas da Caatinga, as sementes também se apresentam promissoras, pois os autores encontraram teores de proteína entre  $10,9 \pm 0,4\%$  para *Hymenaea courbaril* e  $50,0 \pm 3,4\%$  para *Enterolobium contortisiliquum*.

O teor de fibra alimentar de FIAc também é bem satisfatório ( $35,04 \pm 1,3\%$ ) e possui valor próximo àquele detectado por Pereira (2013) para o feijão *Vigna unguiculata*, onde a média de fibra alimentar encontrada para 30 diferentes genótipos foi de  $17,80 \pm 1,80\%$ . Comparando o teor de fibras alimentares presentes em *A. cearensis* a outras leguminosas selvagens da Caatinga, estas se mostram bastante diversificadas, com valores variando entre  $0,8 \pm 0,0\%$  em *H. courbaril* a  $52,3 \pm 1,0\%$  em *P. platycephala* (CARVALHO *et al.*, 2011). A presença de uma grande quantidade de fibra alimentar nas sementes de *A. cearensis* as torna muito promissoras do ponto de vista nutricional. O consumo desses componentes da dieta em quantidades moderadas promove uma série de efeitos benéficos à saúde, como prevenção de doenças cardiovasculares e do trato digestório, diabetes, sobrepeso e obesidade (MACEDO *et al.*, 2012).

As sementes em estudo apresentam também alto teor lipídico ( $29,66 \pm 0,2\%$ ). Se comparado a outras leguminosas da Caatinga, seu teor de lipídios é muito promissor. Carvalho *et al.* (2011) encontraram teores lipídicos entre  $0,7 \pm 0,0\%$  para *Senna rugosa* e  $29,6 \pm 0,1\%$  para *L. sericeus*. Os ácidos graxos são componentes muito importantes na dieta, participando de complexos sistemas de sinalização intracelular, da composição das

membranas, da expressão de genes, da regulação de fatores de transcrição, dentre outras funções importantes no organismo (LONTTENBER, 2009).

O percentual de matéria mineral encontrado para a FIAc ( $4,83 \pm 0,08\%$ ) é comparável aos valores descritos para *Lupinus spp.* (3,2%), *Phaseolus vulgaris* (4,6%), *Glycine max* (5,3%) e para as demais leguminosas comumente utilizadas na alimentação humana (UNICAMP, 2011). Esses resultados também são semelhantes aos encontrados para outras leguminosas da Caatinga por Carvalho *et al.* (2011), cujos teores de matéria mineral variaram entre  $1,8 \pm 0,1\%$  para *P.platycephala* e  $6,8 \pm 0,1\%$  para *Senna obtusifolia*.

Durante a desengorduração, FIAc perdeu 84,89% de seus lipídeos, já que restaram  $4,48 \pm 0,17\%$  em FDAc. O método escolhido não foi 100% eficiente, certamente por se tratar de uma metodologia em condições de repouso (tópico 3.1). No entanto, a permanência desses lipídios não deve prejudicar a produção do isolado, se trata de pequena quantidade e a desengorduração prévia da farinha das sementes visa apenas a diminuição de fatores interferentes na extração proteica.

O teor de proteínas de PIAc foi bastante elevado ( $97,86 \pm 0,96\%$ ), superando o teor proteico de PIS, isolado proteico de soja já disponibilizado comercialmente ( $86,71 \pm 2,38\%$ ). O valor encontrado para o isolado de soja comercializado condiz com o descrito na tabela de composição nutricional do rótulo do produto, onde o isolado possui aproximadamente 85% de proteínas. Medeiros (2013) conseguiu obter isolados proteicos com teor de proteína de  $95,14 \pm 1,09\%$  para o genótipo Cauamé e  $92,44 \pm 1,07\%$  para o genótipo Tumucumaque de *V. unguiculata*. Li *et al.* (2010) obtiveram valores entre  $69,22 \pm 0,15\%$  e  $74,85 \pm 0,41\%$  de proteínas para isolados proteicos de *Vigna radiata*. O teor proteico do PIAc, portanto, se apresentou bastante promissor. Este isolado se apresentou formado basicamente por proteínas e com teor de proteínas superior àquele de um isolado de soja já comercializado (PIS).

O teor de lipídeos de PIAc foi bem baixo ( $0,38 \pm 0,03\%$ ) e pode ser comparado ao teor de lipídios de PIS ( $0,45 \pm 0,01\%$ ). O valor de matéria mineral encontrado para PIAc foi de  $2,2 \pm 0,07\%$  e para PIS  $3,93 \pm 0,03\%$ . Esses componentes nem estão descritos na tabela de composição do rótulo do isolado proteico de soja, certamente devido a seu valor desconsiderável. Este reduzido teor de lipídeos e de cinzas pode ser explicado pelo método de obtenção do isolado, que visa a extração da maior quantidade de proteínas e de reduzida quantidade de outros componentes.

O teor de carboidratos encontrado para PIAc ( $3,51 \pm 0,27\%$ ) também é comparável ao valor encontrado para PIS ( $3,77 \pm 0,19\%$ ). O valor encontrado para o isolado de soja comercializado condiz com o descrito na tabela de composição nutricional do rótulo do



produto, onde o isolado possui cerca de 3% de carboidratos. Vale ressaltar, no entanto, que o método utilizado (Dubois *et al.*, 1956) baseia-se na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados com grupos redutores livres. O valor pode estar, portanto, subestimado, dependendo da composição de carboidratos da amostra.

### 5.2.2 *Determinação da composição de aminoácidos*

A qualidade de uma proteína está relacionada principalmente a seu conteúdo de aminoácidos essenciais e a sua digestibilidade. Os aminoácidos livres em alimentos de origem vegetal são, geralmente, divididos em duas classes, denominadas essenciais e não essenciais. Aminoácidos essenciais são aqueles que não podem ser sintetizados pelo organismo em quantidades suficientes, necessitando assim ser obtidos através da alimentação (EGYDIO *et al.*, 2013). As proteínas de alta qualidade são aquelas que contêm todos os aminoácidos essenciais em níveis maiores que os de referência para crianças em diferentes faixas etárias estabelecidas pela FAO/WHO/UNU (1985). A Tabela 2 apresenta a composição aminoacídica das proteínas de FDAc, de PIAC e de PIS comparadas às necessidades nutricionais de crianças de 2 a 5 e de 6 a 12 anos. De modo geral, a composição de FDAc e de PIAC foi comparável à composição de PIS, superando o isolado comercial em alguns aminoácidos essenciais e não essenciais.

As sementes de *A. cearensis* (FDAc) apresentaram, dentre os aminoácidos essenciais, quantidades adequadas de histidina ( $2,62 \pm 0,00$ g/100 g P), treonina ( $3,41 \pm 0,01$  g/100 g P), valina ( $3,68 \pm 0,01$ g/100 g P), isoleucina ( $3,62 \pm 0,01$ g/100 g P), leucina ( $6,7 \pm 0,00$ g/100 g P), fenilalanina + tirosina ( $4,22 \pm 0,01 + 3,0 \pm 0,00$ g/100 g P) e triptofano ( $1,2 \pm 0,01$  g/100 g P) quando em comparação com os requerimentos estabelecidos pela FAO/WHO/UNU (1985) para crianças de 2 a 5 e de 6 a 12 anos. A farinha das sementes somente não preencheu os requisitos nos aminoácidos metionina + cisteína ( $0,87 \pm 0,00 + 1,20 \pm 0,00$ g/100 g P) e lisina ( $3,92 \pm 0,00$ g/100 g P). Segundo Vasconcelos *et al.* (2001) é característica inerente às proteínas das leguminosas a deficiência em aminoácidos sulfurados.

Tabela 2: Composição aminoacídica (g/100 g P) da farinha desengordurada de *Amburana cearensis* (FDAc) e do seu isolado proteico (PIAc) comparadas a um isolado proteico de soja (PIS) e às necessidades nutricionais de crianças de 2 a 5 e de 6 a 12 anos

	PIAc	PIS	FDAc	Crianças <sup>2</sup>	
				2 a 5 anos	6 a 12 anos
<b>Aminoácidos Essenciais<sup>1</sup></b>					
<b>Histidina</b>	2,81 ± 0,00 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,00 <sup>c</sup>	2,62 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,90	1,90
<b>Treonina</b>	2,90 ± 0,00 <sup>c</sup>	3,89 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,41 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,40	2,80
<b>Valina</b>	3,25 ± 0,00 <sup>c</sup>	4,71 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,68 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,50	2,50
<b>Metionina + Cisteína</b>	1,10 ± 0,00 <sup>b</sup> + 0,83 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,43 ± 0,00 <sup>a</sup> + 0,81 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,87 ± 0,00 <sup>c</sup> + 1,20 ± 0,00 <sup>a</sup>	2,50	2,20
<b>Isoleucina</b>	3,15 ± 0,00 <sup>b</sup>	4,49 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,62 ± 0,01 <sup>c</sup>	2,80	2,80
<b>Leucina</b>	6,25 ± 0,00 <sup>c</sup>	7,79 ± 0,00 <sup>a</sup>	6,70 ± 0,00 <sup>b</sup>	6,60	4,40
<b>Fenilalanina + Tirosina</b>	4,21 ± 0,00 <sup>b</sup> + 2,87 ± 0,00 <sup>b</sup>	4,91 ± 0,00 <sup>a</sup> + 3,50 ± 0,00 <sup>a</sup>	4,22 ± 0,01 <sup>b</sup> + 3,00 ± 0,00 <sup>c</sup>	6,30	2,20
<b>Lisina</b>	5,31 ± 0,00 <sup>b</sup>	6,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,92 ± 0,00 <sup>c</sup>	5,80	4,40
<b>Triptofano</b>	0,87 ± 0,00 <sup>c</sup>	1,25 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,10	0,90
<b>Aminoácidos não essenciais</b>					
<b>Ácido Aspartico</b>	8,51 ± 0,01 <sup>c</sup>	12,16 ± 0,00 <sup>a</sup>	9,56 ± 0,01 <sup>b</sup>		
<b>Ácido Glutâmico</b>	26,96 ± 0,01 <sup>a</sup>	19,84 ± 0,00 <sup>c</sup>	23,76 ± 0,01 <sup>b</sup>		
<b>Arginina</b>	16,22 ± 0,01 <sup>a</sup>	8,42 ± 0,00 <sup>c</sup>	14,41 ± 0,01 <sup>b</sup>		

Tabela 2 (continuação): Composição aminoacídica (g/100 g P) da farinha desengordurada de *Amburana cearensis* (FDAc) e do seu isolado proteico (PIAc) comparadas a um isolado proteico de soja (PIS) e às necessidades nutricionais de crianças de 2 a 5 e de 6 a 12 anos

	<b>PIAc</b>	<b>PIS</b>	<b>FDAc</b>
<b>Serina</b>	4,04 ± 0,00 <sup>c</sup>	5,29 ± 0,00 <sup>a</sup>	4,41 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>Glicina</b>	3,55 ± 0,00 <sup>c</sup>	4,04 ± 0,00 <sup>b</sup>	4,52 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>Alanina</b>	2,92 ± 0,00 <sup>b</sup>	4,03 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,87 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>Prolina</b>	4,24 ± 0,00 <sup>b</sup>	5,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	4,96 ± 0,01 <sup>a</sup>

FONTE: Elaborada pelo autor

<sup>1</sup>Song (2013)

<sup>2</sup> Necessidades nutricionais de crianças de 2 a 5 e de 6 a 12 anos estabelecidos pela FAO/WHO/UNU (1985)

Letras diferentes na horizontal indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados obtidos são médias ± desvio padrão de duplicatas

Com relação ao PIAC, este também apresentou bons níveis de aminoácidos essenciais, variando muito pouco sua composição de aminoácidos em relação à FDAc e às necessidades nutricionais de crianças de 2 a 5 e de 6 a 12 anos, estabelecidas pela FAO/WHO/UNU (1985). Se compararmos o isolado de *A. cearensis* ao isolado de soja já comercializado, a composição é bem semelhante, onde PIAC supera PIS nos níveis de histidina ( $2,81 \pm 0,00\text{g}/100 \text{ g P}$ ), cisteína ( $0,85 \pm 0,00\text{g}/100 \text{ g P}$ ), ácido glutâmico ( $26,96 \pm 0,01\text{g}/100 \text{ g P}$ ) e arginina ( $16,22 \pm 0,00\text{g}/100 \text{ g P}$ ).

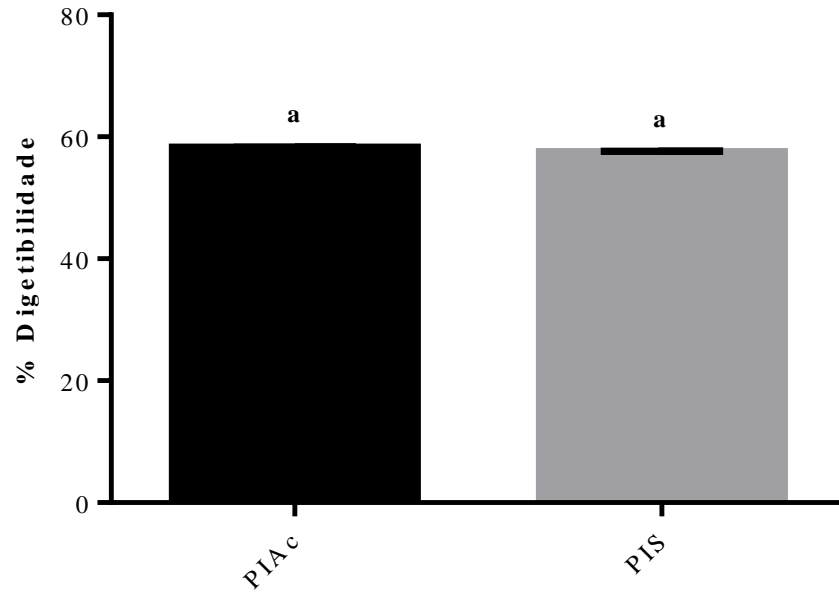
### **5.2.3 Digestibilidade in vitro**

A digestão e a absorção podem ser consideradas como parte inerente da qualidade da proteína. Apesar do conteúdo de aminoácidos essenciais ser o indicador primário da qualidade proteica, é de grande importância a utilização desses aminoácidos pelo organismo. A digestibilidade, portanto, é fundamental para a qualidade nutricional de proteínas individuais e de misturas proteicas (SCHAAFSMA, 2012).

O gráfico 6 apresenta a digestibilidade *in vitro* (%) dos isolados PIAC e PIS. PIAC apresentou digestibilidade estatisticamente igual à PIS,  $58,26 \pm 0,02$  e  $57,59 \pm 0,02\%$ , respectivamente. Tang *et al.* (2009) ao pesquisarem isolados proteicos de *Phaseolus* spp. encontraram digestibilidade de 53 a 64%, justificando os valores pela estrutura tridimensional compacta das proteínas de suas sementes. Wang *et al.* (2010) encontraram digestibilidade entre 71,04% e 87,47% para isolados proteicos de *Cicer arietinum*. Medeiros (2013) encontrou digestibilidades entre 50,07 e 63,81% para isolados de *V. unguiculata*.

As proteínas de origem vegetal geralmente apresentam menor digestibilidade do que as de origem animal, pois na maioria delas há compostos interferentes, como inibidores de proteases, lectinas, fenóis, taninos e fibras, que dificultam sua hidrólise completa pelas proteases do organismo (DAMADORAN *et al.*, 2010). Dentre os fatores que podem afetar a digestibilidade proteica estão a composição em aminoácidos da proteína, a presença de compostos fenólicos (taninos), de inibidores de proteases e fibras (BOYE *et al.*, 2010).

Gráfico 6: Digestibilidade proteica *in vitro* (%).PIAc: Isolado proteico de *Amburana cearensis* e PIS: Isolado proteico de soja



FONTE: Elaborada pelo autor

Segundo Tang *et al.* (2009)

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico t-test

Os resultados obtidos são médias  $\pm$  desvio padrão de triplicatas

Por se tratar de uma leguminosa selvagem, poucos dados sobre *A. cearensis* estão disponíveis na literatura e muitos pontos ainda necessitam ser estudados. Farias (2009) realizou ampla investigação dessa espécie e encontrou a presença de atividade inibitória de tripsina afirmando que esta atividade se deve à presença de um inibidor do tipo Bowman-Birk (BB) de 13,6 kDa. A atividade inibitória de tripsina investigada para PIAC (resultados apresentados a frente) também mostrou a presença deste inibidor e este pode ter afetado, em parte, a digestibilidade proteica do isolado. No entanto, vale ressaltar, que PIAC apresentou a mesma digestibilidade do isolado proteico de soja já comercializado, se mostrando bastante promissor em mais este parâmetro.

### **5.2.4 PDCAAS**

Segundo Schaafsma (2012), o escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS) é um parâmetro amplamente utilizado para a avaliação da qualidade das proteínas individuais e misturas de proteínas de alimentos. As vantagens desses escores são sua simplicidade e relação direta com as necessidades de proteínas humanas. Normalmente, para este cálculo, se utiliza o escore químico do aminoácido limitante e a digestibilidade verdadeira, porém para a estimação pode-se utilizar também a digestibilidade *in vitro*.

A proteína de soja é reconhecida como uma proteína vegetal de alta qualidade (HUGHES *et al.*, 2011). Segundo a Tabela 3, o PDCAAS de PIAC foi superior ao de PIS. PIAC apresentou score do AA limitante de 0,509 e PDCAAS de 0,296; enquanto PIS apresentou valores de 0,496 e 0,285 para os mesmos parâmetros, respectivamente. Hughes *et al.* (2011) calcularam o PDCAAS de três diferentes variedades de isolados proteicos de soja e de um concentrado proteico da semente e obtiveram valores entre 0,95 e 1,00. Os autores afirmaram que os valores de PDCAAS publicados podem variar de acordo com a variedade da semente bem como com a reprodutibilidade e a precisão dos métodos de ensaio.

Tabela 3: Escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS) - PIAc: Isolado proteico de *Amburana cearensis*. PIS: Isolado proteico de soja

<b>Amostra</b>	<b>Aminoácido limitante<sup>1</sup></b>	<b>Digestibilidade <i>in vitro</i><sup>2</sup></b>	<b>Score do AA limitante<sup>3</sup></b>	<b>PDCAAS<sup>4</sup></b>
<b>PIAc</b>	0,83 ± 0,00	58,26 ± 0,02%	0,509	0,296
<b>PIS</b>	0,81 ± 0,00	57,59 ± 0,02%	0,496	0,285

FONTE: Elaborada pelo autor

<sup>1</sup> AA limitante - Cisteína (Tabela 2)

<sup>2</sup> Digestibilidade segundo Gráfico 6

<sup>3</sup> Score do AA limitante (AA limitante teste/AA limitante padrão)

O padrão utilizado foi *Glicine max*, segundo Vasconcelos *et al.* (2001)

<sup>4</sup>Escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS) = AAS limitante x digestibilidade *in vitro*

Os baixos valores de PDCAAS devem estar associados à baixa digestibilidade *in vitro* encontrada para as amostras. No entanto, segundo Silva *et al.* (2010), a qualidade proteica pode ser melhorada após o processamento adequado do alimento, visando à redução ou eliminação dos fatores antinutricionais, como inibidores de enzimas digestivas. Vale ressaltar também, que o cálculo de PDCAAS leva em consideração, neste caso, apenas o aminoácido limitante para a determinação da qualidade da proteína. Realizando o cálculo de PDCAAS para os demais aminoácidos, podemos perceber que além de superar o valor encontrado para PIS realizado com o AA limitante, PIAC apresenta bons resultados em relação a vários outros aminoácidos essenciais e não essenciais.

### **5.2.5 Fatores tóxicos e/ou antinutricionais**

#### **5.2.5.1 Lectinas**

Lectinas são proteínas ligantes de carboidratos, capazes de aglutinar eritrócitos, podendo exercer ação antinutricional (SILVA *et al.*, 2010). As lectinas são encontradas em uma ampla variedade de espécies de animais e plantas, estando presentes em maior quantidade em grãos de leguminosas e gramíneas. Os resultados da análise da presença de atividade hemaglutinante em PIAC e PIS estão apresentados na Tabela 4. Não foi detectada a presença de lectinas em nenhuma das amostras de sangue (coelho, rato e humano) e em nenhuma das diluições (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 e 1:64) dos isolados testados. Esse resultado permaneceu o mesmo para o sangue tratado previamente com tripsina, onde não foi detectada atividade hemaglutinante que indicasse a presença de lectinas.

Fernandes (2011), encontrou a presença de lectinas em cinco de dez espécies de leguminosas da Caatinga (*Dioclea megacarpa*, *Erythrina velutina*, *L. sericeus*, *P. platycephala* e *S. rugosa*). Quando ingeridas, as lectinas não são degradadas durante sua passagem pelo trato digestório e podem reconhecer resíduos de carboidratos presentes nas células intestinais, ligando-se a eles. Essa ligação às células das microvilosidades intestinais provoca interferência na absorção e utilização de nutrientes. As lectinas também mostram a capacidade de inibir várias enzimas intestinais (SILVA *et al.*, 2010). A ausência de lectinas no isolado proteico de *A. cearensis*, portanto, é um ponto positivo para esta leguminosa que propomos ser introduzida na alimentação. A presença dessas moléculas dificultaria a absorção das proteínas presentes em PIAC.



Tabela 4: Análise da presença de lectinas em PIAc (Isolado proteico de *Amburana cearensis*) e PIS (Isolado proteico de soja) em diferentes concentrações (8 a 1.000 µg/mL)

<b>Tipo de sangue/ Tratamento</b>	<b>PIAc</b>	<b>PIS</b>
<b>Humano</b>	ND*	ND*
<b>Humano/ Tripsinizado</b>	ND*	ND*
<b>Coelho</b>	ND*	ND*
<b>Coelho/ Tripsinizado</b>	ND*	ND*
<b>Rato</b>	ND*	ND*
<b>Rato/ Tripsinizado</b>	ND*	ND*

FONTE: Elaborada pelo autor

Os resultados obtidos foram obtidos a partir de triplicatas

\*Não detectado na concentração de 1.000 µg/ mL ou em suas diluições

### 5.2.5.2 Inibidores de tripsina

Os inibidores de tripsina são proteínas capazes de se complexarem com as enzimas tripsina e quimotripsina, inibindo a atividade catalítica das mesmas e, dessa forma, prejudicando o processo digestivo por reduzir a digestibilidade de proteínas (FERNANDES, 2011). A Tabela 5 apresenta os resultados para inibição de tripsina por PIAC e PIS. Foi detectada forte inibição de tripsina por PIAC, com 97,77% de inibição da protease. PIAC apresentou  $17,28 \pm 0,07$  unidades de inibição (UI) por mg de proteína. Esse valor é menor do que o obtido por Farias (2009) para a inibição de tripsina das sementes de *A. ceraensis* (27,41 UI), mostrando que o método de obtenção do isolado diminuiu um pouco a atividade inibitória presente nas sementes. O mesmo autor também afirma se tratar de um inibidor do tipo Bowman-Birk de 13,6 kDa, previamente purificado por Tanaka (1989), e que reduz em 44% a inibição após a fervura das sementes por 180 minutos.

PIS não apresentou atividade inibitória de tripsina. Diversos inibidores de tripsina da soja já foram estudados, no entanto, o método de obtenção do isolado comercial deve ter eliminado ou inativado estes componentes.

Devemos ressaltar também, que em contraposição à sua atividade antinutricional, os inibidores de tripsina podem contribuir positivamente na dieta. Diversos inibidores foram estudados e apresentam atividades anticancerígenas, antiinflamatórias, no combate à obesidade, a doenças degenerativas e a doenças autoimunes (FERNANDES, 2011).

### 5.2.5.3 Inibidores de quimotripsina

A Tabela 5 apresenta os resultados do ensaio de inibição de quimotripsina por PIAC e PIS. Foi detectado  $40,74 \pm 1,4\%$  de inibição da protease quimotripsina pelo isolado PIAC. PIAC apresentou  $11,7 \pm 0,56$  unidades de inibição (UI) por mg de proteína. Este resultado já era esperado, uma vez que inibidores do tipo Bowman-Birk, como o presente em *A. cearensis*, segundo Farias (2009), possuem tanto atividade inibitória de tripsina como de quimotripsina.

PIS não apresentou atividade inibitória de quimotripsina. Da mesma forma que para tripsina, o método de obtenção do isolado comercial de soja deve ter eliminado ou inativado inibidores presentes nas sementes da leguminosa.

Tabela 5: Inibidores de tripsina e quimotripsina presentes no extrato bruto dos isolados PIAC (Isolado proteico de *Amburana cearensis*) e PIS (Isolado proteico de soja)

	<b>PIAc</b>	<b>PIS</b>
<b>Inibidor de tripsina (% de inibição)</b>	98,57 ± 0,4	ND*
<b>Inibidor de tripsina (UI/ mg de proteína)</b>	17,28 ± 0,07	ND*
<b>Inibidor de quimotripsina (% de inibição)</b>	40,74 ± 1,4	ND*
<b>Inibidor de quimotripsina (UI/ mg de proteína)</b>	11,7 ± 0,56	ND*

FONTE: Elaborada pelo autor

Os resultados obtidos são médias ± desvio padrão de triplicatas

\*Não detectado

Devemos ressaltar que o principal problema de inibidores em dietas seria a redução da digestibilidade das proteínas presentes. No entanto, a presença desta inibição de tripsina e quimotripsina para PIAC, apesar de reduzir sua digestibilidade, não deixou o isolado menos digerível que o isolado de soja já comercializado (PIS), como podemos observar no gráfico 6 já apresentado anteriormente.

### **5.2.6 Atividade antioxidante**

#### *5.2.6.1.1 Sequestro do Radical DPPH (difenil-picril-hidrazil)*

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais. Podem ser sintéticos ou naturais (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). A capacidade antioxidante dos isolados PIAC e PIS foi estimada usando o método DPPH e está descrita na Tabela 6. Não foi possível detectar a  $IC_{50}$  (Concentração necessária para inibir 50% dos radicais livres) do isolado PIAC. Já PIS apresentou  $IC_{50}$  de 5.124  $\mu$ g/ mL, valor bem elevado se levarmos em consideração que a  $IC_{50}$  da vitamina C, considerada um bom agente antioxidante, é de 52,46  $\mu$ g/ mL.

A elevada  $IC_{50}$  do PIS e a não detecção de atividade antioxidante em PIAC (de acordo com as concentrações testadas) eram resultados esperados, uma vez que os antioxidantes de plantas raramente estão presentes em proteínas na sua conformação nativa, sendo necessária hidrólise proteica para a detecção de atividade. Segundo Oliveira (2011), a hidrólise enzimática da proteína de soja aumenta sua atividade antioxidante, gerando peptídeos bioativos. Esses peptídeos normalmente se mostram inativos dentro de uma sequência de proteína, mas são liberados pelas enzimas digestivas durante o trânsito gastrointestinal ou durante o processamento dos alimentos. No caso dos isolados proteicos, uma vez que são destinados a alimentação, a hidrólise proteica realizada pelas proteases do próprio organismo podem favorecer a geração desses peptídeos.

Tabela 6: Atividade antioxidante (DPPH) presente na vitamina C, PIAc (Isolado proteico de *Amburana cearensis*) e PIS (Isolado proteico de soja). Ensaio realizado em diferentes concentrações (8 a 1.000 µg/mL)

	IC <sub>50</sub> (µg/ mL)
<b>PIAc</b>	ND*
<b>PIS</b>	5.124
<b>Vitamina C</b>	52,46

FONTE: Elaborada pelo autor

Os resultados obtidos foram obtidos a partir de triplicatas

IC<sub>50</sub>: Concentração necessária para inibir 50% dos radicais livres

\*Não detectada

### 5.3 Perfil de solubilidade e propriedades funcionais

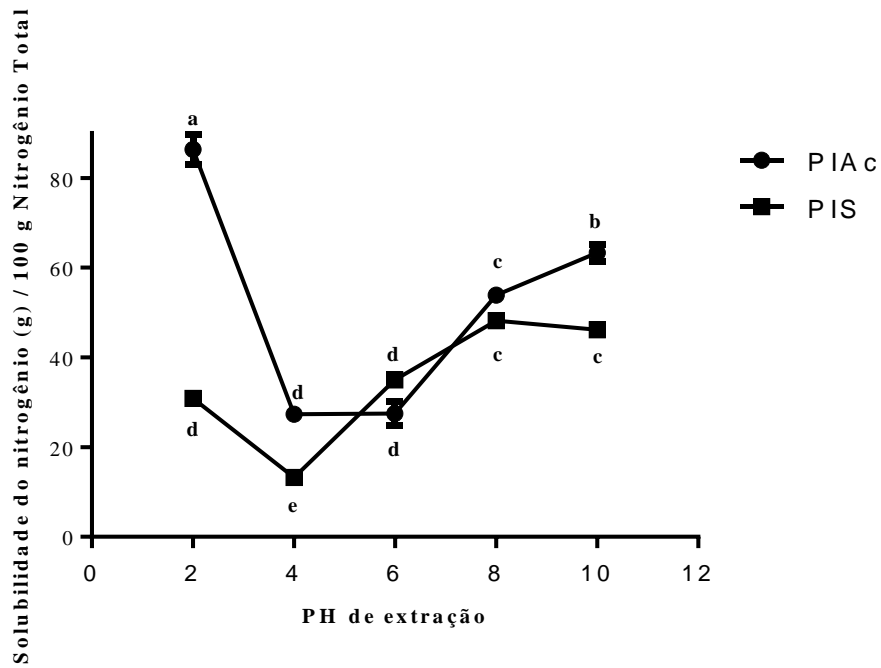
As análises das propriedades funcionais foram realizadas com PIAC e PIS para comparação dos desempenhos. O isolado proteico de soja é amplamente utilizado pela indústria alimentícia na suplementação de dietas e na inserção de características funcionais desejáveis, sendo um isolado de referência em estudos de alimentação. A caracterização funcional foi realizada quanto à solubilidade do nitrogênio, a capacidade de absorção de água, a capacidade de absorção de óleo, a atividade emulsificante e sua estabilidade, a atividade espumante e a estabilidade da espuma e a determinação da menor concentração geleificante.

#### 5.3.1 Perfil de solubilidade do nitrogênio

Em relação às propriedades funcionais (tecnológicas) dos ingredientes de produtos alimentícios, a solubilidade é considerada uma das mais importantes. Isto ocorre porque muitas outras propriedades funcionais apresentam dependência da interação da água com a proteína, tais como, a emulsão, a formação de espuma e geleificação (AVANZA *et al.*, 2012). A solubilidade da proteína é influenciada por vários fatores como: massa molecular, densidade e distribuição das cargas elétricas, que por sua vez é influenciada pelo pH, natureza e concentração dos íons ou força iônica, interações hidrofóbicas e temperatura (MEDEIROS, 2013).

O gráfico 7 apresenta o perfil de solubilidade do nitrogênio dos isolados PIAC e PIS. Ambos apresentaram o perfil de solubilidade esperado, com solubilidade mínima em pH moderadamente ácido (ponto isoelétrico da maioria das proteínas) e solubilidade máxima nas extremidades de pH, formando um gráfico com forma característica de U. Segundo Fontana *et al.* (2009), o aumento progressivo de solubilidade do pH neutro para os pH alcalinos se deve ao fato de que à medida em que o pH se torna mais alcalino, há predominância de cargas negativas, havendo uma interação mais forte entre as moléculas de proteína e as moléculas de água e, também, uma maior repulsão entre as moléculas de proteína, aumentando significativamente a solubilidade destas no meio.

Gráfico 7: Perfil de solubilidade do nitrogênio. PIAC: Isolado proteico de *Amburana cearensis* PIS: Isolado proteico de soja



FONTE: Elaborada pelo autor

Nitrogênio quantificado de acordo com Baethgen e Alley (1989)

Proporção amostra / água destilada 1% (m/v)

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

PIAc apresentou solubilidade mínima em valores de pH 4,0 e 6,0 ( $27,3 \pm 1,2\%$  e  $26,1 \pm 3,6\%$ , respectivamente), não ocorrendo diferença estatística entre os dois resultados. PIS apresentou solubilidade mínima em pH 4,0 ( $12,9 \pm 1,0\%$ ). Este resultado condiz com os descritos por Li *et al.* (2010); Pednekaret *al.* (2010) e Liang; Tang (2013), onde isolados proteicos produzidos a partir de sementes de leguminosas têm menor solubilidades nos valores de pH 4, 5 e 6. O ponto de solubilidade mínima, ou ponto isoelétrico, possui pouca aplicabilidade para a indústria de alimentos. Para a indústria alimentícia é importante saber o ponto onde as proteínas apresentam solubilidade máxima. Uma boa solubilidade é de grande importância na elaboração de molhos, sopas desidratadas, alimentos para bebês, produtos de panificação, sobremesas, dentre outros (AVANZA *et al.*, 2012).

A amostra que apresentou solubilidade máxima foi PIAc em pH 2,0 ( $86,4 \pm 4,7\%$ ), seguido por PIAc em pH 10,0 ( $63,3 \pm 2,9\%$ ) e por PIS em valores de pH 8,0 e 10,0 ( $48,2 \pm 0,3$  e  $46,2 \pm 0,9\%$ , respectivamente). As proteínas em pH distinto do ponto isoelétrico possuem cargas líquidas que se repelem entre si, podendo interagir com as moléculas de água, sendo portanto mais solúveis (DAMADORAM, 2010). Isso explica a solubilidade máxima de ambos os isolados acontecer em valores de pH distantes de seu ponto isoelétrico.

A menor solubilidade apresentada por PIS em comparação com o isolado de *A. cearensis* pode estar relacionada a características das sementes de soja. Segundo Liu *et al.* (2008), a solubilidade do isolado proteico de soja pode ser afetada pela forma de estocagem das sementes antes da produção do isolado. Não podemos saber ao certo se foi isto que ocorreu, pois o PIS utilizado foi adquirido em um estabelecimento comercial, e o fabricante não respondeu as várias tentativas de contato para esclarecer aspectos metodológicos de sua fabricação.

### **5.3.2 Capacidade de absorção de água (CAA)**

A capacidade de absorção de água (CAA) é uma propriedade que pode indicar o potencial de aplicabilidade de um isolado proteico, uma vez que altos valores de CAA são importantes para a manutenção da umidade dos produtos. A capacidade de absorção de água de proteínas é definida como gramas de água absorvida por grama de proteína quando uma proteína em pó seco é equilibrada com vapor de água a 90-95% de umidade relativa (DAMODARAN *et al.*, 2010).

O gráfico 8 apresenta a capacidade de absorção de água de PIAc e PIS. A CAA de PIAc foi de  $3,08 \pm 0,11$  g água/g amostra enquanto a de PIS foi de  $5,58 \pm 0,04$  g água/g



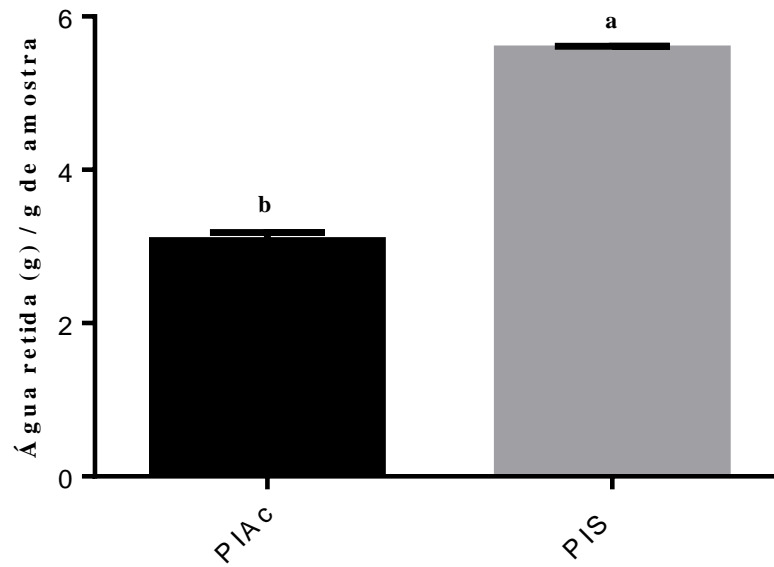
amostra. Segundo Ribeiro (2009), alguns fatores podem influenciar na capacidade de absorção de água da amostra, como concentração proteica e características intrínsecas das proteínas. Estudo realizado por Pednekar *et al.* (2010) com um isolado proteico de soja mostrou capacidade de absorção de água 3,08 g de água/g de amostra, resultado inferior ao encontrado para PIS neste trabalho e comparável ao encontrado para o isolado de *A. cearensis*.

As propriedades de hidratação das proteínas também dependem da sua composição de aminoácidos e de sua conformação. Assim, quando há proporção maior de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas, a proteína apresenta capacidade menor de hidratação do que quando é composta por aminoácidos com cadeias laterais hidrofílicas, que podem estabelecer mais facilmente pontes de hidrogênio com a água (FILHO; VASCONCELOS, 2011). Tanto PIAC como PIS apresentam elevadas quantidades de aminoácidos hidrofílicos ácidos (ácidos glutâmico e aspártico) e básicos (arginina).

Os aminoácidos mais abundantes em PIAC são ácido glutâmico, arginina e ácido aspártico (26,96; 16,22 e 8,51 g/100 g P, respectivamente). Os aminoácidos mais abundantes em PIS são ácido glutâmico, ácido aspártico e arginina (19,84; 12,12 e 8,42 g/100 g P, respectivamente). Outros aminoácidos hidrofílicos, como histidina e lisina, pouco variaram entre os dois isolados. Com relação a aminoácidos hidrofóbicos, a maior variação foi nos teores de leucina, valina e isoleucina, onde PIS apresentou quantidade um pouco superior (diferenças de até 1,54 g/100 g P) desses aminoácidos.

Podemos perceber que existe pouca relação entre quantidade de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos com a capacidade de absorção de água apresentada pelos isolados. O bom desempenho de PIS e o menor desempenho de PIAC, portanto, devem estar relacionados a localização desses aminoácidos nas proteínas. PIS deve possuir aminoácidos hidrofílicos predominantes na porção mais externa da molécula, facilitando a ligação desses a água e favorecendo a hidratação proteica, enquanto PIAC deve possuir aminoácidos hidrofóbicos em suas cadeias laterais, repelindo as moléculas de água. Deve-se ressaltar que a diferença entre as capacidades de hidratação foi pequena e que naturalmente as proteínas tendem a atingir conformações com as porções hidrofóbicas no interior das moléculas.

Grafico 8: Capacidade de absorção de água (CAA). PIAC: Isolado proteico de *Amburana cearensise* PIS: Isolado proteico de soja



FONTE: Elaborada pelo autor

Segundo Aydemir e Yemenicioğlu (2013)

Proporção amostra / água destilada de 5% (m/v)

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico t-test

Os resultados obtidos são médias  $\pm$  desvio padrão de triplicatas

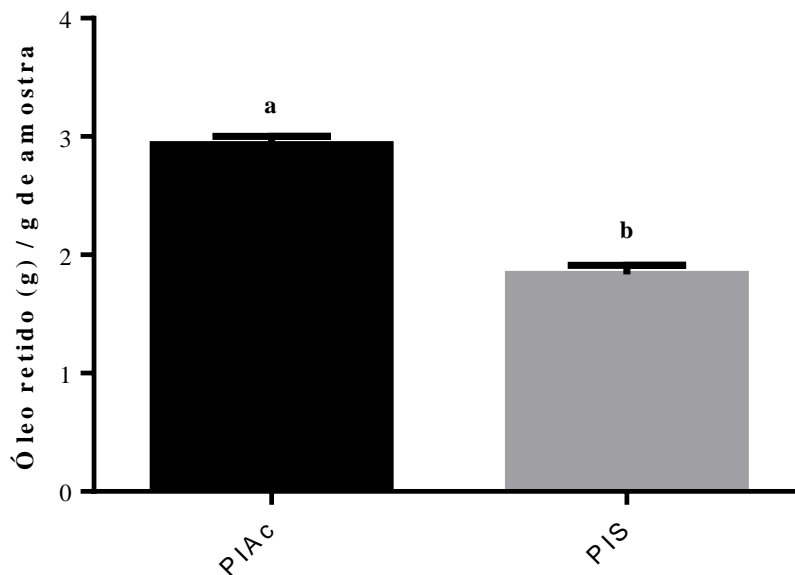
### 5.3.3 Capacidade de absorção de óleo (CAO)

A capacidade de absorção de óleo é uma importante propriedade funcional, pois desempenha um papel essencial ao manter o sabor dos alimentos (AVANZA *et al.*, 2012). O gráfico 9 apresenta a capacidade de absorção de óleo de PIAC e PIS. A CAO de PIAC foi de  $2,98 \pm 0,08$  g óleo/g amostra enquanto a de PIS foi de  $1,84 \pm 0,07$  g óleo/g amostra. Pednekar *et al.* (2010) também encontraram resultado semelhante para a capacidade de absorção de óleo de um isolado proteico de soja ( $1,97$  g óleo/g amostra).

O mecanismo de absorção de óleo envolve a retenção física deste por componentes de alimentos (principalmente proteínas) e a afinidade da proteína para as cadeias laterais não polares dos lipídios (AVANZA *et al.*, 2012). O resultado superior apresentado por PIAC pode ser associado à baixa absorção de água pela amostra. Como discutido anteriormente, isto indica que possivelmente PIAC tenha maior predominância de aminoácidos hidrofóbicos na porção mais externa da molécula proteica do que PIS, facilitando a ligação às moléculas de óleo. A absorção de gordura normalmente varia em função da quantidade relativa de grupos hidrofóbicos expostos da proteína (FONTANARI *et al.*, 2007). A menor capacidade de retenção de óleo apresentada por PIS, também pode estar relacionada à menor quantidade desses grupos hidrofóbicos expostos. Normalmente, proteínas boas ligantes de água apresentam menor capacidade de ligação a óleo e vice-versa.

Devemos ressaltar que uma elevada capacidade de absorção de óleo é essencial para a formulação de diversos produtos. Massas de bolos, maionese, molhos para salada, dentre outros, são produtos que dependem de uma boa capacidade de absorção de óleo (CHANDI; SOGI, 2006). Uma boa CAO também contribui para a palatabilidade e para a retenção de sabor nos alimentos. Esta propriedade é responsável pelo aumento de características sensoriais desejáveis em diferentes formulações, sendo muito importante do ponto de vista industrial (RODRIGUEZ-AMBRIZ *et al.*, 2005).

Grafico 9: Capacidade de absorção de óleo (CAO). PIAC: Isolado proteico de *Amburana cearensise* PIS: Isolado proteico de soja



FONTE: Elaborada pelo autor

Segundo Aydemir e Yemenicioğlu (2013)

Proporção amostra / óleo de 5% (m/v)

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico t-test

Os resultados obtidos são médias  $\pm$  desvio padrão de triplicatas

### 5.3.4 Atividade emulsificante (AEm) e estabilidade da emulsão (EEm)

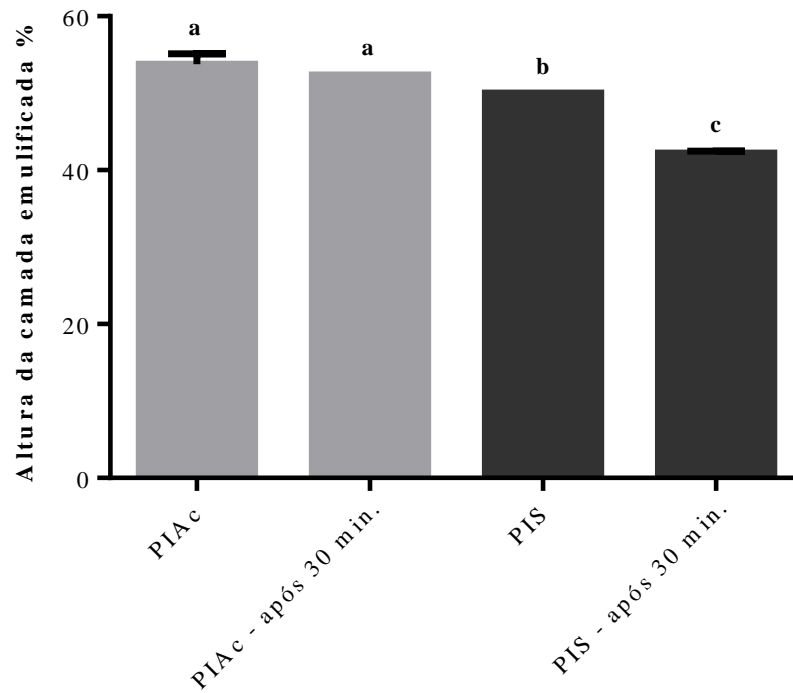
O gráfico 10 apresenta a atividade emulsificante e a estabilidade da emulsão formada por PIAC e PIS. PIAC produziu uma camada emulsionada de  $53,79 \pm 1,31\%$ , enquanto PIS formou uma emulsão de  $50,0 \pm 0,0\%$ , em relação ao volume total do ensaio. Segundo Damodaram *et al.* (2010), as proteínas desempenham um papel importante na indústria, sendo grandes agentes emulsificantes. São moléculas anfipáticas com capacidade de ligação tanto a água, quanto a óleo. As proteínas facilitam a formação, melhoram a estabilidade e proporcionam propriedades físico-químicas específicas para emulsões de óleo em água (MCCLEMENTS, 2004). A maioria das proteínas apresenta uma menor atividade emulsificante em regiões de pH próximo ao ponto isoelétrico da proteína, onde a carga líquida e a solubilidade apresentam-se reduzidas (FILHO; VASCONCELOS, 2011).

Com relação à estabilidade da emulsão, PIAC foi capaz de manter a camada emulsificada no mesmo nível após o protocolo de aquecimento a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, seguido por resfriamento em banho de gelo e nova centrifugação da amostra ( $52,38 \pm 0,0\%$ ). Não ocorreu diferença estatística entre os dois resultados. PIS, além de formar uma menor camada emulsificada, também deteve menor estabilidade da emulsão formada, reduzindo a camada emulsificada para  $42,24 \pm 0,23\%$ , uma redução de cerca de 15,52%. Ao avaliar outro isolado proteico de soja comercial, Tan *et al.* (2014) encontraram total estabilidade da emulsão formada. Medeiros (2013) não encontrou boa estabilidade para isolados proteicos de *V. unguiculata* e afirmou que a baixa estabilidade do isolado pode ter ocorrido devido à repulsão de cargas. A baixa estabilidade do PIS também deve estar relacionada a características particulares do isolado de soja adquirido, provavelmente relacionadas a sua forma de obtenção e processamento.

### 5.3.5 Atividade espumante (AEs) e estabilidade da espuma (EEs)

A formação de espuma por batimento ou agitação refere-se à expansão do volume da mistura com a incorporação de bolhas ar. O gráfico 11 apresenta a avaliação da capacidade espumante e a estabilidade da espuma formada por PIAC e PIS em diferentes intervalos de tempo (0, 30, 60, 90 e 120 minutos). Foi determinado o aumento percentual da altura da camada de espuma além do volume inicial do ensaio, após o protocolo de agitação por 5 minutos.

Gráfico 10: Atividade emulsificante (AEm) e estabilidade da emulsão (EEm) após 30 minutos a 80°C. PIAc: Isolado proteico de *Amburana cearensis* PIS: Isolado proteico de soja



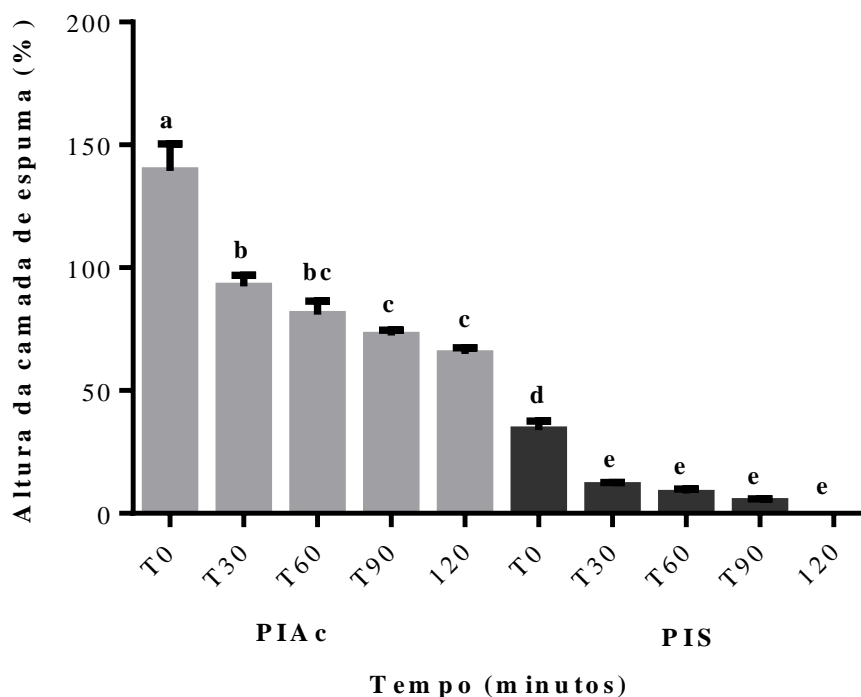
FONTE: Elaborada pelo autor

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

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados obtidos são médias  $\pm$  desvio padrão de triplicatas

Gráfico 11: Atividade espumante (AEs) e estabilidade da espuma (EEs) em T0 e após 30, 60, 90 e 120 minutos. PIAC: Isolado proteico de *Amburana cearensis* PIS: Isolado proteico de soja



FONTE: Elaborada pelo autor

Segundo Aydemir e Yemencioğlu (2013)

To : Tempo inicial/ T30 : após 30 minutos/ T60 : após 60 minutos/ T90 : após 90 minutos/ T120 : após 120 minutos

Proporção amostra/água destilada de 2% (m/v) em pH 7,0

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados obtidos são médias  $\pm$  desvio padrão de triplicatas

PIAc teve a maior capacidade espumante, com um aumento de  $139,4 \pm 11,06\%$  em relação à altura inicial da suspensão, portanto, formando uma espuma correspondente a mais que o dobro do volume inicial. O resultado obtido é muito promissor e concorda com resultados encontrados por Duranti *et al.* (2008), onde frações proteicas produzidas por precipitação isoelétrica são boas formadoras de emulsões e de espuma. PIAc apresentou bom desempenho nestas duas funcionalidades. A capacidade espumante deste isolado foi bem superior ao encontrado por Medeiros (2013) para isolados proteicos de *V. unguiculata* (47,5 a 50 %) e por Pereira (2013) para o isolado de outra variedade da mesma leguminosa (64,94%).

Diversos fatores influenciam na formação de espuma, tais como o equipamento utilizado para a preparação, a presença de sais, pH, flexibilidade, concentração das proteínas, dentre outros (DAMODORAN *et al.*, 2010). Normalmente, altas concentrações proteicas produzem espumas mais firmes e mais estáveis. O grande desempenho apresentado por PIAc pode ser justificado por seu elevado teor de proteínas, maior que 97%. As proteínas interagem na interface ar-água e são capazes de reduzir rapidamente a tensão superficial, outros componentes podem afetar de maneira negativa a produção de espuma (MARTÍNEZ *et al.*, 2009). Assim, o resultado encontrado é muito promissor pois, do ponto de vista industrial, uma boa formação de espuma é muito importante. Diversos alimentos utilizam esta potencialidade, tais como: bebidas, mousses, bolos, merengues e coberturas cremosas (BOYE *et al.*, 2010).

PIS teve  $33,85 \pm 3,7\%$  de aumento em relação à altura inicial do ensaio. O baixo desempenho na formação de espuma apresentado por PIS já era um resultado esperado. A estrutura altamente compacta da proteína de soja, em relação a outras fontes proteicas, é conhecida pela baixa potencialidade na formação de espuma. Esta estrutura não favorece a adsorção ou desdobramento da proteína na interface, não permitindo a formação adequada de uma película interfacial (PANIZZOLO; ANON, 2015). O baixo desempenho apresentado por PIS ressalta a importância do bom resultado obtido para PIAc, onde novas fontes proteicas boas formadoras de espuma são bem vindas na indústria alimentícia.

Ao avaliar a estabilidade da espuma decorridos 30, 60, 90 e 120 minutos, podemos visualizar, de acordo com o gráfico 11, que ambos os isolados apresentaram queda na altura da camada de espuma. As espumas alimentícias geralmente são bastante instáveis porque apresentam grande superfície na interface (FILHO; VASCONCELOS, 2011). Após decorridos 120 minutos os resultados para PIAc e PIS foram  $64,86 \pm 2,56\%$  e  $0,0 \pm 0,0\%$ , respectivamente. Segundo Damodoran *et al.* (2010), no ponto isoelétrico (PI) as espumas estabilizadas por proteínas são mais estáveis e isto justifica o bom resultado obtido para PIAc,



produzido nas presentes condições. Apesar da redução, PIAC foi capaz de manter a espuma, capacidade esta não observada em PIS. A espuma de PIS foi reduzida para  $11,33 \pm 1,29\%$  decorridos apenas 30 minutos, uma redução de quase 70%.

### **5.3.6 Menor concentração geleificante (MCG)**

A geleificação proteica consiste na formação de uma rede ordenada a partir de proteínas previamente desnaturadas (FILHO; VASCONCELOS, 2011). Os géis podem ser descritos pela sua capacidade de imobilizar líquidos, pela sua textura e pelas suas propriedades (ALLEONI, 2006). A Tabela 7 apresenta a capacidade de geleificação dos isolados PIAC e PIS. Ambos apresentaram capacidade de geleificação, sendo que PIAC formou gel a uma concentração de 10%, enquanto o isolado de soja só foi capaz de formar gel a uma concentração de 12%.

Medeiros (2013) encontrou formação de gel em isolados proteicos de *V. unguiculata* 8 e 10%, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho para PIAC. O valor obtido para o PIS neste trabalho, concorda com o valor encontrado por Tan *et al.* (2014), que também definiram 12% como a concentração mínima para a formação de gel em um isolado proteico de soja comercial. Ambos os isolados foram capazes de manter a mesma MCG mesmo após quatro horas a 4 °C, apresentando géis de boa qualidade. Esta estabilidade está relacionada ao equilíbrio de várias interações não-covalentes, sendo crucial para as propriedades viscoelásticas das películas tipo gel (DAMODARAN *et al.*, 2010).

O processamento de alimentos e o desenvolvimento de novos produtos requerem ingredientes tais como os agentes de geleificação, estes se acumulam em uma matriz estrutural que vai fornecer ao alimento a consistência desejável (ALLEONI, 2006). Proteínas com capacidade de formação de gel a baixas concentrações são muito importantes na indústria alimentícia. A propriedade geleificante, entre as propriedades funcionais das proteínas, é uma das mais exploradas pela indústria de alimentos para criar novos produtos que apresentam melhores ou diferentes texturas (DINIZ, 2007). A formação de gel desempenha papel fundamental em produtos cárneos, gelatinas, massa de pão, produtos lácteos, dentre outros (MEDEIROS, 2013).

Tabela 7: Determinação da menor concentração geleificante (MCG) de PIAC (Isolado proteico de *Amburana cearensis*) e PIS (Isolado proteico de soja)

Amostra	Concentração do gel (%)									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
<b>PIAc</b>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>PIS</b>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

FONTE: Elaborada pelo autor.

Resultado positivo (+) / Resultado negativo (-)

Os resultados obtidos foram obtidos a partir de triplicatas

## 5.4 Avaliação toxicológica

### 5.4.1 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica é um modelo de citotoxicidade que avalia, prioritariamente, os efeitos sobre a membrana e de variação de osmolaridade (PESSOA, 2015). É um ensaio rotineiramente utilizado para a avaliação da segurança de uso de diferentes compostos, onde uma unidade hemolítica é definida como a concentração capaz de produzir 50% de hemólise. A atividade hemolítica dos isolados PIAC e PIS estão apresentadas na Tabela 8. Não foi detectada a presença de atividade hemolítica em nenhuma das amostras de sangue (coelho, rato e humano) e em nenhuma das concentrações (8 a 2.000 µg/mL) dos isolados testadas (PIAC ou PIS). A ausência de atividade hemolítica no isolado proteico de *A. cearensis* é mais um indicativo da segurança de uso das proteínas em questão.

### 5.4.2 Toxicidade oral aguda

O ensaio de toxicidade oral aguda é rotineiramente utilizado para avaliar a capacidade de uma substância ou mistura de substâncias produzir efeitos tóxicos agudos (PESSOA, 2015). Após administração via oral de PIAC e PIS, em dose única (2.000 mg/kg de peso do animal), nenhuma morte foi registrada ou qualquer sinal de intoxicação foi observado durante os 14 dias de experimento. Não ocorreu nenhuma alteração seja ela de comportamento, física ou qualquer outro sinal que indique toxicidade. Também não foram observadas qualquer alteração macroscópica morfológica nos órgãos dissecados após o término do experimento.

O gráfico 12 apresenta a curva de evolução do peso corpóreo dos animais dos grupos teste (PIAC e PIS) e do controle (solução salina, 0,9% de NaCl). Ocorre uma sobreposição entre as curvas, não existindo diferenças significativas entre o ganho de peso dos animais dos grupos teste ou do controle. Este resultado indica que a ingestão aguda da substância não tenha causado efeitos deletérios gastrointestinais aos animais.

Tabela 8: Atividade hemolítica em hemácias do homem, rato e coelho frente à exposição aos isolados PIAC (Isolado proteico de *Amburana cearensis*) e PIS (Isolado proteico de soja) em diferentes concentrações (8 a 2.000 µg/mL)

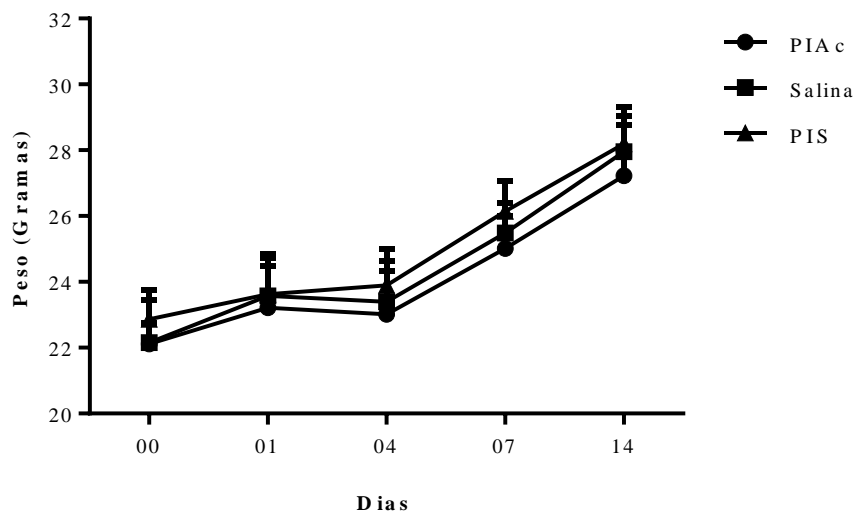
<b>Tipo de sangue</b>	<b>PIAc</b>	<b>PIS</b>
<b>Humano</b>	ND*	ND*
<b>Coelho</b>	ND*	ND*
<b>Rato</b>	ND*	ND*

FONTE: Elaborada pelo autor

Os resultados obtidos são médias  $\pm$  desvio padrão de triplicatas

\*Unidade hemolítica (UH) não detectada na concentração de 2000 µg/mL ou em suas diluições

Grafico 12: Comparação do ganho de peso de camundongos fêmeas que receberam em dose única via oral PIAc, PIS ou solução salina, todas na concentração de 2.000 mg/kg de peso do animal



FONTE: Elaborado pelo autor

Não ocorreu diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos teste e o controle pelo teste estatístico Tukey

Os resultados obtidos são médias  $\pm$  desvio padrão

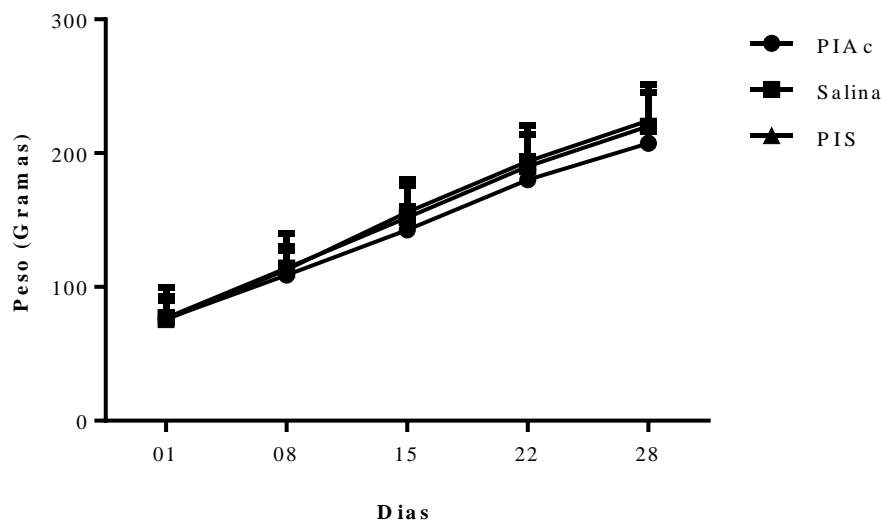
Farias (2009) estudou a toxicidade de *A. cearensis* mostrou que o extrato bruto da farinha das sementes também não apresentou atividade tóxica aguda quando injetado via intraperitoneal em camundongos. O autor afirmou a provável ausência de toxinas que poderiam causar alterações fisiológicas que culminariam com a morte dos animais. Leal *et al.* (2003) também constataram a segurança de *A. cearensis* revelarem a baixa toxicidade da planta, que não produziu nenhum efeito tóxico significativo ou morte nas avaliações toxicológicas sub-crônica e crônica realizadas pelos autores. A avaliação da toxicidade clínica do xarope de “cumaru”, em pacientes voluntários que receberam uma dose diária de 20 mL (cada), durante 30 dias consecutivos, também não mostrou nenhuma alteração nos parâmetros clínico-laboratoriais dos pacientes (ALMEIDA *et al.*, 2010). Todos esses indícios da ausência de toxicidade nas sementes de *A. cearensis* mostram que já era esperado a ausência de toxicidade também no isolado proteico obtido (PIAc) à partir de sementes de cumaru, o que se mostrou evidente no ensaio de toxicidade aguda realizado.

#### **5.4.3 Toxicidade oral de doses repetidas**

Na busca por quaisquer indícios de toxicidade para PIAc, foi realizado um ensaio de toxicidade oral por doses repetidas durante 28 dias. Este ensaio permite uma avaliação mais completa, buscando sinais de efeito cumulativo no organismo. Os estudos de toxicidade com exposições contínuas às substâncias são utilizados para mimetizar a forma mais comum de exposição humana: as exposições repetidas. Esses estudos têm por objetivo obter informações sobre a identificação de órgãos-alvo, os efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, bioquímicas, anatomopatológicas e histopatológicas (CAMPOS; AMARAL, 2009).

Não foram observados quaisquer indícios de toxicidade nos animais avaliados, machos ou fêmeas. Nenhuma morte foi registrada e não ocorreu nenhuma alteração seja de comportamento, física ou qualquer outro sinal que pudesse indicar toxicidade. Os gráficos 13 e 14 apresentam a curva de evolução do peso corpóreo dos animais machos e fêmeas, respectivamente, dos grupos teste (PIAc e PIS) e do controle (solução salina). Não ocorreram diferenças significativas entre o ganho de peso dos animais dos grupos teste ou do controle em nenhum dos sexos de animais testados. O consumo médio alimentar também não sofreu alterações entre os grupos teste e o grupo controle, em nenhum dos experimentos, com machos ou fêmeas.

Grafico 13: Comparação do ganho de peso de ratos machos que receberam dose repetida via oral de PIAC, PIS ou solução salina, todas na concentração de 1.000 mg/kg/ por dia

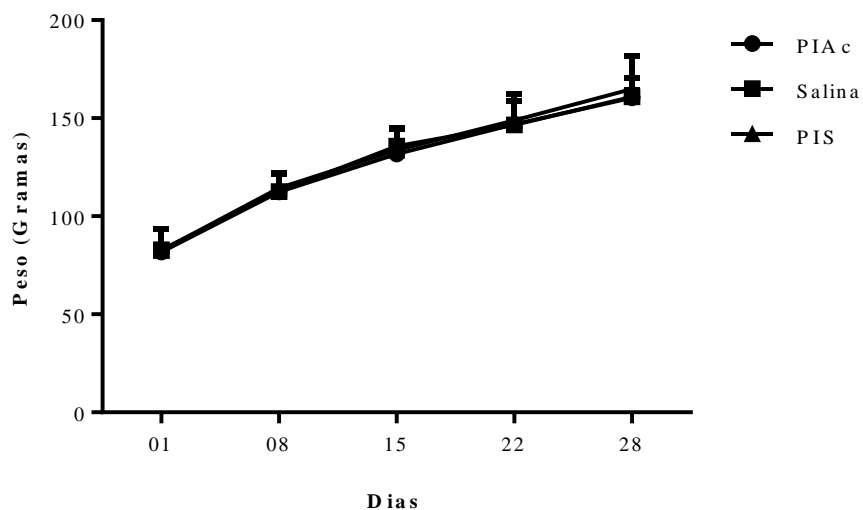


FONTE: Elaborado pelo autor

Não ocorreu diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos teste e o controle pelo teste estatístico Tukey

Os resultados obtidos são médias  $\pm$  desvio padrão

Grafico 14: Comparação do ganho de peso de ratos fêmeas que receberam dose repetida via oral dePIAc, PIS ou solução salina, todas na concentração de 1.000 mg/kg/ por dia



FONTE: Elaborado pelo autor

Não ocorreu diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos teste e o controle pelo teste estatístico Tukey

Os resultados obtidos são médias  $\pm$  desvio padrão



#### 5.4.3.1 Determinação de parâmetros hematológicos

As Tabelas 9 e 10 apresentam as concentrações determinadas de leucócitos totais (WBC), eritrócitos totais (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), concentração corpuscular média (MCH), volume corpuscular médio (MCV), concentração corpuscular média de hemoglobina (MCHC), contagem de plaquetas (PLT), volume plaquetário médio (MPV), porcentagem de linfócitos do total de leucócitos (LYM %), porcentagem de neutrófilos, basófilos e monócitos do total de WBC (OTHR %) e índice de macrotrombócitos (P-LCR) para machos e fêmeas, respectivamente. Os animais receberam dose oral repetida por 28 dias de PIAC, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/ kg/ por dia.

Não ocorreram alterações significativas nos parâmetros hematológicos dos grupos teste (PIAC e PIS) e do grupo controle (solução salina), em machos ou fêmeas. Nos machos ocorreu diferença estatística apenas na concentração corpuscular de hemoglobina entre PIAC e salina. PIAC apresentou concentração de  $34,34 \pm 0,19$  e salina de  $35,14 \pm 0,42$ , ambos em g/dL. No entanto, a diferença é muito pequena e os valores continuam dentro da mesma magnitude. PIAC também se apresentou igual estatisticamente a PIS ( $34,72 \pm 0,37$  g/dL), que não apresentou diferença significativa em relação a salina. Os três grupos, portanto, apresentam valores semelhantes entre si. Os valores encontrados para PIAC também continuam dentro dos padrões estabelecidos para ratos Wistar que são bem variáveis de acordo com a procedência dos animais (BRANCO *et al.*, 2011).

#### 5.4.3.2 Determinação de parâmetros bioquímicos do sangue

As Tabelas 11 e 12 apresentam as concentrações determinadas de 12 parâmetros bioquímicos séricos (glucose, colesterol total, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, creatinina, proteína total, albumina, bilirrubina total, bilirrubina direta, sódio e potássio) para machos e fêmeas, respectivamente. Os animais receberam dose oral repetida por 28 dias de PIAC, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/ kg/ por dia. Ocorreram alterações estatísticas nos níveis de albumina e potássio, nos machos, e nos níveis de fosfatase alcalina, nas fêmeas.

Tabela 9: Parâmetros hematológicos de ratos machos submetidos a dose oral repetida de PIAC, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/kg/ por dia, durante 28 dias

<b>Parâmetro</b>	<b>Salina</b>	<b>PIAc</b>	<b>PIS</b>
Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	11,76 $\pm$ 2,21 <sup>a</sup>	10,46 $\pm$ 2,06 <sup>a</sup>	10,70 $\pm$ 2,11 <sup>a</sup>
Eritrócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8,05 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	8,05 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	7,82 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g/dL)	15,04 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	14,88 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	14,32 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>
Hematócrito (%)	42,80 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>	43,34 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	41,26 $\pm$ 1,63 <sup>a</sup>
Volume corpuscular (fL)	53,20 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup>	53,84 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	52,76 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>
Concentração corpuscular (pg)	18,72 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>	18,48 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	18,34 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>
Concentração corpuscular de hemoglobina (g/dL)	35,14 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	34,34 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	34,72 $\pm$ 0,37 <sup>ab</sup>
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1160,25 $\pm$ 81,62 <sup>a</sup>	1193,80 $\pm$ 190,11 <sup>a</sup>	1290,5 $\pm$ 74,05 <sup>a</sup>
Linfócitos do total de leucócitos (%)	84,92 $\pm$ 3,05 <sup>a</sup>	85,44 $\pm$ 4,86 <sup>a</sup>	81,27 $\pm$ 6,11 <sup>a</sup>
Neutrófilos, basófilos e monócitos do total de leucócitos (%)	13,95 $\pm$ 1,97 <sup>a</sup>	13,67 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	18,73 $\pm$ 6,11 <sup>a</sup>
Volume plaquetário (fL)	7,44 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	7,72 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>	7,14 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>
Macrotrombócitos (%)	8,88 $\pm$ 2,06 <sup>a</sup>	8,98 $\pm$ 2,98 <sup>a</sup>	7,18 $\pm$ 1,57 <sup>a</sup>

FONTE: Elaborada pelo autor

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados obtidos são médias  $\pm$  desvio padrão

Tabela 10: Parâmetros hematológicos de ratos fêmeas submetidos a dose oral repetida de PIAc, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/kg/ por dia, durante 28 dias

<b>Parâmetro</b>	<b>Salina</b>	<b>PIAc</b>	<b>PIS</b>
Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	9,26 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	7,68 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup>	8,68 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup>
Eritrócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8,81 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	8,58 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	8,47 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g/dL)	17,36 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>	16,96 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	16,92 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>
Hematócrito (%)	41,20 $\pm$ 1,54 <sup>a</sup>	40,14 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>	40,14 $\pm$ 1,23 <sup>a</sup>
Volume corpuscular (fL)	46,80 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	46,78 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	47,40 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>
Concentração corpuscular (pg)	19,68 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	19,78 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	19,98 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>
Concentração corpuscular de hemoglobina (g/dL)	42,12 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	42,26 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	42,16 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1372,60 $\pm$ 121,20 <sup>a</sup>	1292,40 $\pm$ 117,03 <sup>a</sup>	1219,20 $\pm$ 270,52 <sup>a</sup>
Linfócitos do total de leucócitos (%)	86,44 $\pm$ 1,45 <sup>a</sup>	84,82 $\pm$ 2,36 <sup>a</sup>	85,08 $\pm$ 9,46 <sup>a</sup>
Neutrófilos, basófilos e monócitos do total de leucócitos (%)	13,56 $\pm$ 1,45 <sup>a</sup>	14,60 $\pm$ 2,27 <sup>a</sup>	10,80 $\pm$ 2,50 <sup>a</sup>
Volume plaquetário (fL)	7,28 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	7,08 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	7,46 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>
Macrotrombócitos (%)	7,13 $\pm$ 3,00 <sup>a</sup>	6,00 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	7,95 $\pm$ 2,32 <sup>a</sup>

FONTE: Elaborada pelo autor

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados obtidos são médias  $\pm$  desvio padrão

Tabela 11: Parâmetros bioquímicos séricos de ratos machos submetidos a dose oral repetida de PIAC, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/kg/ por dia, durante 28 dias

<b>Parâmetro</b>	<b>Salina</b>	<b>PIAc</b>	<b>PIS</b>
Creatinina (mg/dL)	0,25 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,05 <sup>a</sup>
Glicose (mg/dL)	94,20± 9,88 <sup>a</sup>	97,00± 15,39 <sup>a</sup>	86,75± 15,65 <sup>a</sup>
Albumina (g/dL)	3,66 ± 0,09 <sup>b</sup>	3,96 ± 0,12 <sup>a</sup>	3,44 ± 0,09 <sup>c</sup>
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,02 <sup>a</sup>
Proteínas totais (g/dL)	5,69 ± 0,17 <sup>a</sup>	5,32 ± 0,28 <sup>a</sup>	5,63 ± 0,20 <sup>a</sup>
Alanina amino transferase - TGP (U/L)	25,20 ± 3,90 <sup>a</sup>	24,0 ± 4,69 <sup>a</sup>	24,40 ± 1,67 <sup>a</sup>
Fofatase alcalina (U/L)	223,40 ± 47,71 <sup>a</sup>	248,00 ± 55,80 <sup>a</sup>	216,25 ± 31,87 <sup>a</sup>
Coleterol total (mg/dL)	65,05 ± 2,69 <sup>a</sup>	66,75 ± 8,71 <sup>a</sup>	71,78 ± 9,03 <sup>a</sup>
Bilirrubina total (mg/dL)	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
Aspartato amino transferase -TGO (U/L)	110,92 ± 21,13 <sup>a</sup>	81,95 ± 10,79 <sup>a</sup>	92,55 ± 18,97 <sup>a</sup>
Sódio (mmol/L)	116,26 ± 11,51 <sup>a</sup>	114,68 ± 6,89 <sup>a</sup>	123,18 ± 14,62 <sup>a</sup>
Potássio (mmol/L)	3,12 ± 0,00 <sup>b</sup>	5,55 ± 1,24 <sup>ab</sup>	6,69 ± 0,82 <sup>a</sup>

FONTE: Elaborada pelo autor

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados obtidos são médias ± desvio padrão

Tabela 12: Parâmetros bioquímicos séricos de ratos fêmeas submetidos a dose oral repetida de PIAc, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/kg/ por dia, durante 28 dias

<b>Parâmetro</b>	<b>Salina</b>	<b>PIAc</b>	<b>PIS</b>
Creatinina (mg/dL)	0,21 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,03 <sup>a</sup>
Glicose (mg/dL)	83,25 ± 9,18 <sup>a</sup>	91,00 ± 9,42 <sup>a</sup>	87,40 ± 10,01 <sup>a</sup>
Albumina (g/dL)	4,27 ± 0,14 <sup>a</sup>	4,43 ± 0,18 <sup>a</sup>	4,34 ± 0,14 <sup>a</sup>
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,02 <sup>a</sup>
Proteínas totais (g/dL)	2,01 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,09 <sup>a</sup>
Alanina amino transferase - TGP (U/L)	23,80 ± 4,32 <sup>a</sup>	23,00 ± 4,69 <sup>a</sup>	23,20 ± 3,90 <sup>a</sup>
Fofatase alcalina (U/L)	76,75 ± 3,30 <sup>c</sup>	139,75 ± 5,12 <sup>a</sup>	123,00 ± 6,93 <sup>b</sup>
Colesterol total (mg/dL)	52,13 ± 5,37 <sup>a</sup>	61,55 ± 5,44 <sup>a</sup>	58,03 ± 9,24 <sup>a</sup>
Bilirrubina total (mg/dL)	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
Aspartato amino transferase - TGO (U/L)	85,05 ± 8,58 <sup>a</sup>	86,23 ± 11,24 <sup>a</sup>	86,92 ± 10,92 <sup>a</sup>
Sódio(mmol/L)	119,06 ± 10,67 <sup>a</sup>	115,64 ± 7,61 <sup>a</sup>	125,52 ± 8,2 <sup>a</sup>
Potássio(mmol/L)	6,72 ± 1,41 <sup>a</sup>	6,60 ± 1,11 <sup>a</sup>	6,80 ± 1,05 <sup>a</sup>

FONTE: Elaborada pelo autor

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados obtidos são médias ± desvio padrão

A albumina é uma proteína plasmática que corresponde a cerca de 50% das proteínas totais do soro (SANTOS *et al.*, 2004). PIAC e PIS apresentaram, nos machos, concentração de albumina estatisticamente diferente do grupo controle que recebeu solução salina ( $3,96 \pm 0,12$ ;  $3,44 \pm 0,09$  e  $3,66 \pm 0,09$  g/dL, respectivamente). Devemos ressaltar, no entanto, que a diferença é bem pequena, que esta variação ocorreu apenas nos machos, que os valores continuam dentro da mesma magnitude e dentro dos padrões encontrados para ratos Wistar (BRANCO *et al.*, 2011). Apesar da diferença estatística, a variação encontrada não representa valores distantes da faixa normal para esta espécie animal.

O potássio é um íon predominantemente intracelular. Devido à grande diferença entre suas concentrações intracelular e extracelular, os fatores que controlam sua distribuição transcelular são críticos para a manutenção de níveis séricos normais (NETO; NETO, 2003). PIS apresentou concentração de potássio, nos machos, superior à encontrada para o grupo que recebeu solução salina,  $6,69 \pm 0,82$  e  $3,12 \pm 0,00$  mmol/L, respectivamente. PIAC ( $5,55 \pm 1,24$  mmol/L) se apresentou estatisticamente igual ao grupo controle e a PIS. A hipercalemia, concentração elevada de potássio no sangue, geralmente é causada pelo aumento da liberação de potássio das células ou pela baixa excreção urinária, sendo a insuficiência renal a causa mais comum (VALENTE; ATALLAH, 2005). No entanto, a alteração ocorreu apenas nos ratos machos e PIS já é um isolado comercialmente utilizado que passou por todos os procedimentos de toxicidade determinados pela ANVISA para chegar às prateleiras.

A Fosfatase alcalina está presente em altas concentrações nos ossos, rins, fígado, intestino e placenta. Constitui um indicador útil de doenças hepáticas e de doenças ósseas associadas com hiperatividade osteoblástica (BIOCLIN, 2012). Tanto PIAC como PIS apresentaram, nas fêmeas, concentração de fosfatase alcalina superior a do grupo controle que recebeu apenas solução salina. Normalmente, ocorre pouca diferença de sensibilidade entre os sexos, mas nos casos em que são observadas diferenças, as fêmeas são ligeiramente mais sensíveis (OECD, 420). PIAC, PIS e salina apresentaram as concentrações de fosfatase alcalina, nas fêmeas, de  $139,75 \pm 5,12$ ;  $123,00 \pm 6,93$  e  $76,75 \pm 3,30$  U/L, respectivamente. Os machos, apresentaram níveis de fosfatase alcalina estatisticamente iguais ao controle, mas bem superiores aos apresentados pelas fêmeas. PIAC, PIS e salina apresentaram as concentrações  $248,00 \pm 55,80$ ;  $216,25 \pm 31,87$  e  $223,40 \pm 47,71$  U/L, respectivamente.

Normalmente a fosfatase alcalina está presente na circulação sanguínea, em diferentes concentrações (NAOUM, 2007). Os valores de referência para fosfatase alcalina encontrados, para ratos Wistar, na literatura variaram bastante de acordo com a procedência e o sexo do animal. Branco *et al.* (2011) encontraram valores de fosfatase alcalina, variando entre 77,0 e

184,0 U/L. O aumento sérico dos níveis de fosfatase alcalina se relaciona predominantemente com distúrbios no fígado e nos ossos (MINCIS; MINCIS, 2006). O aumento da enzima, nas fêmeas, em relação ao grupo controle sugere estas alterações. No entanto, outros fatores podem ocasionar alterações nos níveis desta enzima. As transaminases, alanina amino transferase (TGP) e aspartato amino transferase (TGO), também utilizadas como indicativo de doenças no fígado, se mostraram estatisticamente inalteradas entre os grupos teste e controle de machos e fêmeas. Essas enzimas geralmente se mostram alteradas em caso de danos hepáticos. Devemos ressaltar também que a alteração ocorreu em ambos os grupos teste, PIAC e PIS, sendo PIS um isolado comercialmente utilizado que já passou por todos os procedimentos de toxicidade determinados pela ANVISA para chegar às prateleiras.

#### *5.4.3.3 Determinação do peso úmido relativo dos órgãos*

A Tabela 13 apresenta o peso úmido relativo dos órgãos (cérebro, timo, coração, fígado, baço, rins, supra-renais, testículos e epididímos) para machos e a Tabela 14 apresenta o peso úmido relativo dos órgãos (cérebro, timo, coração, fígado, baço, rins, supra-renais, ovários e útero) para fêmeas. Os animais receberam dose oral repetida por 28 dias de PIAC, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/kg/ por dia. Não ocorreram alterações significativas no peso úmido relativo dos órgãos nos grupos teste (PIAC e PIS) e no grupo controle (solução salina), em machos ou fêmeas.

#### *5.4.3.4 Análises histopatológica*

Não foram observadas em PIAC ou PIS quaisquer alterações macroscópicas ou histopatológicas nos órgãos dos animais avaliados (cérebro, timo, coração, fígado, baço, rins, supra-renais, testículos, epididímos, ovários e útero) em machos ou fêmeas. Não ocorreu a presença de qualquer efeito citotóxico ou sinal que indicasse toxicidade. Todos os órgãos se apresentaram histologicamente semelhantes aos do grupo controle que recebeu solução salina.

Tabela 13: Peso úmido relativo (%) de órgãos de ratos machos submetidos a dose oral repetida de PIAC, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/ kg/ por dia, durante 28 dias

<b>Orgão</b>	<b>Salina</b>	<b>PIAc</b>	<b>PIS</b>
Fígado	3,79 ± 0,54 <sup>a</sup>	3,52 ± 0,37 <sup>a</sup>	4,39 ± 0,63 <sup>a</sup>
Baço	0,25 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,13 <sup>a</sup>
Rins	0,82 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,04 <sup>a</sup>
S. Renais	0,03 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>
Testículos	1,20 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,06 <sup>a</sup>
Epidídimo	0,15 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,04 <sup>a</sup>
Timo	0,27 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,03 <sup>a</sup>
Coração	0,32 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,06 <sup>a</sup>
Cérebro	0,86 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,09 <sup>a</sup>

FONTE: Elaborada pelo autor

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados obtidos são médias ± desvio padrão



Tabela 14: Peso úmido relativo (%) de órgãos de ratos fêmeas submetidos a dose oral repetida de PIAC, PIS ou salina, na concentração de 1.000 mg/kg/ por dia, durante 28 dias

<b>Órgão</b>	<b>Salina</b>	<b>PIAc</b>	<b>PIS</b>
Fígado	3,42 ± 0,19 <sup>a</sup>	3,50 ± 0,45 <sup>a</sup>	3,61 ± 0,24 <sup>a</sup>
Baço	0,27 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,02 <sup>a</sup>
Rins	0,90 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,03 <sup>a</sup>
S. Renais	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>
Útero	0,26 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,10 <sup>a</sup>
Ovários	0,08 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>a</sup>
Timo	0,26 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,09 <sup>a</sup>
Coração	0,36 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,01 <sup>a</sup>
Cérebro	1,14 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,16 ± 0,12 <sup>a</sup>

FONTE: Elaborada pelo autor

Letras diferentes indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste estatístico Tukey

Os resultados obtidos são médias ± desvio padrão

## 6 CONCLUSÃO

As conclusões deste trabalho foram:

- As proteínas de *A. cearensis* são facilmente extraídas para obtenção de isolado proteico por precipitação isoelétrica e ao serem determinadas as variáveis envolvidas na extração foi possível estabelecer um protocolo viável que maximiza o rendimento proteico do isolado e minimiza o tempo destinado a sua produção;

- O isolado proteico obtido possui elevado grau de pureza, sendo composto basicamente por proteínas. PIAC também apresentou boa composição aminoacídica, atendendo as necessidades nutricionais de crianças em diversos aminoácidos requeridos. Digestibilidade *in vitro* e PDCAAS do isolado produzido foram semelhantes as do isolado de soja já comercializado. PIAC também não apresentou lectinas ou atividade antioxidante detectável, no entanto, apresentou inibidores tanto de tripsina como de quimotripsina;

- Após a caracterização funcional do isolado, PIAC não foi bom retentor de água, mas superou o isolado comercial de soja com grande desempenho na solubilidade, na capacidade de retenção de óleo, na capacidade emulsificante, na estabilidade da emulsão, na capacidade espumante, na estabilidade da espuma e na menor concentração geleificante. O isolado se mostrou com grande potencial tecnológico, se destacando principalmente na grande formação de espuma;

- O isolado produzido não apresentou indícios de toxicidade aguda ou atividade hemolítica que pudessem impossibilitar seu uso na alimentação. No estudo de toxicidade por doses repetidas ocorreram algumas pequenas alterações nos parâmetros bioquímicos, no entanto, estas também ocorreram no isolado de soja já comercializado. Não ocorreram alterações histopatológicas nos órgãos examinados. De forma geral, o isolado se apresentou seguro para consumo de acordo com os parâmetros avaliados.

Os resultados obtidos tornam o isolado proteico de *A. cearensis* uma alternativa com alto valor nutricional e funcional a ser utilizada pela indústria na melhoria das condições nutricionais da população nordestina brasileira. Trata-se de um bioproduto muito promissor, que requer mais estudos, no entanto, chama atenção para as grandes riquezas sub-exploradas do bioma Caatinga.

## REFERÊNCIAS

- ADEBOWALE, Y. A. *et al.* 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**, Ibadan. v. 9, n. 7, p. 3223-3238, jan. 2008.
- ALLEONI, A. C. C. Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. **Scientia Agricola**. v. 63, p. 291-298, 2006.
- ALMEIDA, J. R. G. S. *et al.* *Amburana cearensis* – uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, Pernambuco, v. 06, n. 11, p. 1-8, nov. 2010.
- ANVISA. **Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes**: Gerência de produtos especiais e gerência geral de alimentos. Brasília, 2013.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16th ed. Gaitheersburgh, 1997.
- ARARUNA, S. M. *et al.* Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 23, n. 1, p. 132-137, 2013.
- ARAÚJO, S. M. S. A região semiárida do nordeste do Brasil: Questões ambientais e possibilidades de uso sustentável dos recursos. **Revista Científica da FASETE**. v. 5, n. 5, p. 89-98, 2011.
- AVANZA, M. V. *et al.* Functional properties and microstructure of cowpea cultivated in north-east Argentina. **Food Science and Technology**. v. 49, p. 123-130, 2012.
- 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.
- 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
- BERNHEIMER, A. W. Assay of hemolytic toxins. **Methods Enzymology**. v. 165, p. 213-217, 1988.
- BIOCLIN. **Fosfatase alcalina**. Belo Horizonte: Quiabasa Química Básica. 2012.
- 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.
- BRANCO, A. C. S. C. *et al.* Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos *wistar* e camundongos *swiss* do biotério professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v.15, n. 2, p. 209-214, 2011.

BUCKO, S. *et al.* Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. **LWT - Food Science and Technology**. v. 64, p. 609-615, 2015.

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

CAMPOS, S. V.; AMARAL, L. M. S. **Toxicidade sobreaguda e subcrônica: Bases científicas para avaliação da toxicidade de agrotóxicos**. São Paulo: ILSIBrasil-Internacional Life Science Institute do Brasil, 2009, cap. 4, p. 95-130.

CANO-MEDINA, A. *et al.* Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. **Food Research International**. v. 44, p. 684-692, 2011.

CANUTO, K. M. *et al.* **Uso de plantas jovens de *Amburana cearensis* A. C. Smith: alternativa para preservação e exploração econômica da espécie**. Petrolina: Embrapa SemiÁrido, 2008. 28 p.

CARVALHO, A. *et al.* Caracterização de concentrado e isolado proteico extraído de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum). **Brazilian Journal of Food Technology**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 01-08, mar. 2009.

CARVALHO, A. F. U. *et al.* 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. *et al.* 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.

CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran proteins concentrates. **Journal of Food Engineering**, 2006.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk; FENNEMA, Owen. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2010.

DENARDIN, C. C. *et al.* Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug analysis**. v. 23, p. 387-398, 2015.

DINIZ, Adriana Cecília Pinto. **Geleificação a frio de isolados proteicos de soja**. 2007. 170 f. Tese (Doutorado em engenharia de alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

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

DRUMOND, M. A. *et al.* Caatinga: um bioma exclusivamente brasileiro... e o mais frágil. **Revista do Instituto Humanitas Unisinos**. v. 389, 2012.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, abr.-jun. 2006.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DURANTI, M. *et al.* The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. **Food Science & Technology**, Milano, v. 19, p. 624-633, 2008.

EGYDIO, A. P. M. *et al.* Free amino acid composition of Annona (*Annonaceae*) fruit species of economic interest. **Industrial Crops and Products**. v. 45, p. 373-376, 2013.

ERLANGER, B. F.; KOLOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 2, n. 95, p. 271-278, 1961.

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

FAO. **O Estado da segurança alimentar e nutricional do Brasil: Um retrato multidimensional**. Brasília: Fiat panis, 2014. 90 p.

FARIAS, Davi Felipe. **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) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FERNANDES, Geórgia Sampaio. **Prospecção nutricional e bioativa de sementes de dez espécies vegetais da Caatinga**. 2011. 332 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

FILHO, A. B. M.; VASCONCELOS, M. A. S. **Química de alimentos**. Recife: UFRPE/CODAI, 2011. 78 p.

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

FONTANA, A. *et al.* Obtenção e avaliação de concentrados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) processados por extração química. **Química Nova**, Rio Grande, v. 32, n. 9, p. 2299-2303, out. 2009.

FONTANARI, G. G. *et al.* Isolado proteico de semente de goiaba (*Psidium guajava*): caracterização e propriedades funcionais. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, p. 73-79, 2007.

GARCIA, M. C. *et al.* Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. **Talanta**. v. 106, p. 328-349, 2013.

GARIGLIO, Maria Auxiliadora et al. **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010. 368 p.

HAN, S. W.; CHEE, K. M.; CHO, S. J. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. **Food Chemistry**. v. 172, p. 766-769, 2015.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. v. 72, n. 6, p. 912-916, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2592313>> Acesso em: 14 ago. 2016.

HOJILLA-EVANGELITA, M. P. *et al.* Preparation, composition and functional properties of pennycress (*Thlaspi arvense* L.) seed protein isolates. **Industrial Crops and Products**. v. 55, p. 173-179, 2014.

HUGHES, G. J. *et al.* Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores (PDCAAS) for Soy Protein Isolates and Concentrate: Criteria for Evaluation. **Journal Of Agricultural Food Chemistry**, St. Louis, v. 59, p. 12701-12712, 2011.

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

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

LEAL, L.K.A.M. *et al.* Toxicological study of the hydro alcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. **Pharmaceutical Biology**. v. 4, p. 308-314, 2003.

LI, W. et al. 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.

LIMA, R. C. C.; CAVALCANTE, A. M. B.; MARIN, A. M. P. **Desertificação e mudanças climáticas no semiárido Brasileiro**. Campina Grande: Instituto nacional do semiárido-INSA, 2011. 211 p.

LIU, C. *et al.* Functional properties of protein isolates from soybeans stored under various conditions. **Food Chemistry**, v. 111, p. 29-37, 2008.

LONTTENBER, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. Revisão. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.53, n. 5, p. 595-607, 2009.

LOSAN. Lei de segurança alimentar e nutricional. Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. n. 11346. 2006.

LÚCIO, A. M. F. N.; SILVA, G. H.; LOPES, I. S. Influência da época de coleta e armazenamento na qualidade fisiológica da semente de cumaru. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo, v. 7, n. 3, p. 48-56, set. 2010.

MACEDO, T. M. B.; SCHMOURLO, G.; VIANA, K. D. A L. Fibra alimentar como mecanismo preventivo de doenças crônicas e distúrbios metabólicos. **Revista UNI**. v. 2, n. 2, p. 67-77, 2012.

MAGALHÃES, T. Caatinga, um bioma desconhecido e a Convivência com o Semi Árido. **Revista do Instituto Humanitas Unisinos**. v. 389, ano XII, 2012.

MARINS, B. R.; TANCREDI, R. C. P.; GEMAL, A. L. **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária: reflexões e práticas**. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/ Fundação Oswaldo Cruz, 2014. 288 p.

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

MEDEIROS, Jackeline Lima de. **Caracterização bioquímica e funcional de isolados proteicos de genótipos de excelência de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MENSOR L. L. *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother**. v. 15, p. 127-130, 2001.

MERKER, M. P.; LEVINE, L. A protein from the marine mollusc *Aplysia californica* that is hemolytic and simulates rarchidonic acid metabolism in cultured mammalian cells. **Toxicon**. v. 24, n. 5, p. 451-465, 1986.

MCCLEMENTS, D. J. Protein-stabilized emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 9, p. 305-313, 2004.

MINCIS, M.; MINCIS, R. **Prática clínica**. Enzimas hepáticas: aspectos de interesse prático. São Paulo: Grupo editorial Moreira Júnior, p. 56-60, 2006.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 01 de junho de 2015.

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

MOURA, N. S. *et al.* Ensaios toxicológicos: Um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, v. 8, n. 15, 2012.

NAÇÕES UNIDAS. **O futuro que queremos: Fatos sobre a alimentação**. Rio de Janeiro: Rio +20, 2012.

NAOUM, P. C. **Doenças que alteram parâmetros bioquímicos**. São Paulo: Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, 2007.

NASCIMENTO, V. T. *et al.* 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, Aug. 2011.

NETO, O. M. V.; NETO, M. N. Distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico. *In*: URGÊNCIAS E EMERGÊNCIAS NEFROLÓGICAS, 36., 2003, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto. 2003. p. 325-337.

NESTERENKO A. *et al.* Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**. v. 42, p. 469-479, 2013.

OECD, 1995. Guideline No. 407. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. Revised 18 december 2007.

OECD, 1995. Guideline No. 420. Acute Oral Toxicity- Fixed Dose Method.

OLIVEIRA, Cibele Freitas. **Estudo da hidrólise da proteína de soja utilizando proteases de *Chryseobacterium sp.* para o uso como antioxidante em alimentos**. 2011. 85 f. (Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Porto Alegre, 2011.

PANIZZOLO, L. A.; ANON, M. C. Foaming properties of soy protein isolate hydrolysates. **Journal of Food and Nutrition Sciences**. v. 3, n. 1, p. 1-9, 2015.

PEDNEKAR, M. *et al.* Radiation processing and functional properties of soybean (*glycine Max*). **Radiation Physics and Chemistry**. v. 79, p. 490-494, 2010.

PEREIRA, Patrícia Guedes. **Proteína da soja: Os efeitos do seu consumo sobre os diferentes grupos populacionais**. 2013. 29 f. (Curso de Nutrição) - Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Brasília, 2013.

PESSOA, Igor Parra. **Caracterização química, atividade antioxidante e segurança de uso de sementes de *Licania rígida benth.*** 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

PIMENTEL, J. V. F.; GUERRA, H. O. C. Semiárido, caatinga e legislação ambiental. **Prima Facie**, Paraíba, v. 8, n. 14, p. 104-126, 2010.

PROSKY, L. *et al.* Determination of insoluble, soluble, and total dietary fibre in foods and food products. Interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, v. 71, p. 1017-1023, 1988.

RIBEIRO, H. J. S. S. *et al.* Caracterização de concentrado proteico de feijão comum preto, cultivar Iapar 44, novo e envelhecido. **Ciênc. Technol. Aliment.** vol. 29, n. 3, p. 571-580. 2009.



RODRÍGUES-AMBRIZ, S. L. *et al.* Composition and functional properties of *Lupinus campestris* protein isolate. **Plant Food of Human Nutrition**. v. 10, p. 100-107, 2005.

RODRIGUES, I. M. *et al.* Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. **Journal of Food Engineering**. v. 109, p. 337-346, 2012.

RUIZ, G. A. *et al.* Effect of extraction pH on heat-induced aggregation, gelation and microstructure of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). **Food Chemistry**. v. 209, p. 203-210, 2016.

SANTOS, N. S. J. *et al.* Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Revista de Nutrição**. v. 17, n.3, p. 339-349, jul./set., 2004.

SANTOS, O. V. *et al.* Avaliação de misturas proteicas com farinha desengordurada da castanha do Brasil e isolado proteico de soja: comportamento técnico e morfológico. **Sinergia**. v. 13, n. 1, p. 35-41, 2012.

SCHAAFSMA, G. Advantages and limitations of the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) as a method for evaluating protein quality in human diets. **British Journal of Nutrition**, v. 108, p. 333-336, Aug. 2012.

SILVA, C. O. *et al.* Influence of processing on the protein quality of new soybean cultivars intended for human food. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 3, May- June, 2010.

SILVA, M. C. *et al.* Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30 (Supl.1), p. 103-107, 2010.

SILVA, Renata Maria Pereira da. **Caracterização bioquímica e funcional da semente e isolado proteico de um genótipo de feijão - caupi** [*Vigna unguiculata* ( L.) Walp.]. 2013. 71 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SILVA, L. R. *et al.* Flavonoides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicologica Argentina**. v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

SLYWITCH, E. **Guia alimentar de dietas vegetarianas para adultos**. São Paulo: Sociedade vegetariana brasileira (SVB), 2012. 66 p.

SONG, J. *et al.* Evaluation of sugar, free amino acid, and organic acid compositions of different varieties of vegetable soybean (*Glycine max* [L.] Merr). **Industrial Crops and Products**. v. 50, p. 743-749, 2013.

SOUSA, Nathanna Mateus de. **Isolado protéico de *Amburana cearensis* (Allemao) A. C. Smith como nova fonte de proteínas alimentares: caracterização funcional e análise toxicogenômica *in vitro***. 2014. 113 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SOUZA, P. P. *et al.* Artificially-aged cachaça samples characterised by direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry. **Food Chemistry**. v. 143, p. 77-81, 2014.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**. v. 39, n. 12, p. 1412-1416, 1967. Disponível em < <http://wyndmoor.arserrc.gov/page/1967/2739>>. Acesso em: 15 ago. 2016.

STONE, A. K. *et al.* Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. **Food Research International**. v. 76, p. 31-38, 2015.

TAKEUTI, D.; OLIVEIRA, J. M. Para além dos aspectos nutricionais: uma visão ambiental do sistema alimentar. **Segurança Alimentar e Nutricional**. v. 20, p. 194-203, 2013.

TARIQ, A; MUSSARAT,S; ADNAN, M. Review on ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological evidence of Himalayan anticancer plants. **Journal et Biophysica Acta-Biomembranas**. v. 164, p. 96-119, 2015.

TAN, Ee-san; NGOH, Ying-yuan; GAN, Chee-yuen. A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation. **Food Chemistry**, Malaysia, v. 152, p. 447-455, nov. 2014.

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

TANG, Chuan-he; CHEN, Ling; MA, Ching-yung. Thermal aggregation, amino acid composition and in vitro digestibility of vicilin-rich protein isolates from three Phaseolus legumes: A comparative study. **Food Chemistry**, Hong Kong, v. 113, p. 957-963, ago. 2009.

UNICAMP. **Tabela brasileira de composição de alimentos** / NEPA - UNICAMP. 4 ed. rev. e ampl. Campinas: NEPA - UNICAMP, 2011. 161 p.

VALENTE, O.; ATALLAH, A. N. **Atualização terapêutica**: Manual prático de diagnóstico e tratamento. ed. 22. Artes Médicas. 2005. 2096 p.

VASCONCELOS, I. M. *et al.* Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 55-62, 2001.

WANG, X. *et al.* Subunit, amino acid composition and in vitro digestibility of protein isolates from Chinese kabuli and desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. **Food Research International**, Xinjiang, v. 43, p. 567-572, jul. 2010

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Biological Chemistry**. v. 244, p. 4406-4412, 1969.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); UNITED NATIONS UNIVERSITY (UNU) (Switzerland). **Protein and amino acid requirements in human**

**nutrition:** Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva: Switzerland, n. 935. 2007. 284 p.

YASUMATSU, K. *et al.* Whipping and emulsifying of soybean products. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 36, n. 5, p. 719-727, 1972.

YULIANA, M. *et al.* 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. 621-626, 2014.

ZHANG, Y. *et al.* Application of high density steam flash-explosion in protein extraction of soybean meal. **Journal of Food Engineering**. v. 116, p. 430-435, 2013.