

RENATO SANT'ANNA FILHO

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES  
FUNCIONAIS DE ISOLADOS PROTÉICOS DE  
GUANDU (*Cajanus Cajan* (L.) Millsp.)

rat.  
Tese apresentada à Escola superior  
de Agricultura de Lavras, como parte das  
exigências do Curso de Mestrado em Ci-  
ência dos Alimentos para obtenção do  
grau de Mestre.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS


1 9 8 4



RENATO SANT'ANNA FILHO

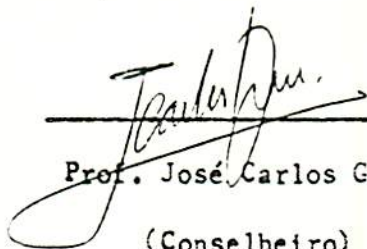
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE ISOLADOS  
PROTEÍCOS DE GUANDU (Cajanus cajan (L.) Millsp.)

APROVADA :



Prof. Evódio Ribeiro Vilela

(Orientador)



Prof. José Carlos Gomes

(Conselheiro)



Prof. Fábio de Borja Portela

(Conselheiro)

1 9 8 4

A Rajá, minha esposa,

A meu filho, Daví .



## BIOGRAFIA

RENATO SANT'ANNA FILHO, filho de Renato Sant'Anna e Maria Imaculada Gomes Sant'Anna, nasceu no dia 05 de julho de 1958, em Viçosa, Estado de Minas Gerais.

Concluiu o curso de 1<sup>o</sup> grau no Colégio de Viçosa e o 2<sup>o</sup> grau no Colégio Universitário da UFV. Em março de 1977, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em Engenharia de Alimentos em dezembro de 1980.

Em março de 1981, ingressou no curso de mestrado em Ciência dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais, concluindo-o em setembro de 1984.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL) através do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização do curso de mestrado.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) através do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização do trabalho de dissertação.

Ao Professor Evódio Ribeiro Vilela, pelo auxílio na escolha do tema, no preparo e na elaboração da dissertação e orientação.

Aos Professores José Carlos Gomes, Fábio de Borja Portela, Renato Sant'Anna, Maurílio Alves Moreira e Dirceu Jorge da Silva, pelas contribuições e sugestões apresentadas no presente trabalho.

Ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV através da oficina de fotografia e à Unidade de Apoio Educacional da UFV através do desenhista Eduardo C. Nascimento, pelas referidas colaborações.

Aos estudantes de pós-graduação Albano Salustiano Pereira, Mírian Fontes Araújo e Eliana B. de São José, pelo companheirismo durante a realização do trabalho experimental.

Aos laboratórios da UFV, de Análises de Alimentos, Biofísica, Bioquímica e Nutrição Animal através de seus laboratoristas, pela ajuda na realização dos experimentos.

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a concretização deste trabalho.

## CONTEÚDO

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	03
2.1. Características agronômicas .....	03
2.2. Composição química .....	05
2.3. Obtenção de isolados e concentrados protéicos e farinhas ..	09
2.4. Propriedades funcionais de ingredientes protéicos .....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1. Matéria prima .....	18
3.2. Moagem .....	18
3.3. Reagentes .....	18
3.4. Equipamentos .....	18
3.5. Obtenção de isolados protéicos de guandu .....	19
3.5.1. Obtenção do isolado clássico .....	19
3.5.2. Obtenção do isolado contendo cálcio .....	20
3.5.3. Obtenção do isolado contendo hexametáfosfato .....	21
3.5.4. Obtenção do isolado aquecido .....	21
3.6. Análises físico-químicas .....	22
3.6.1. Determinação de nitrogênio total .....	22
3.6.2. Determinação de cinza .....	22
3.6.3. Determinação de cálcio e magnésio .....	22
3.6.4. Determinação de sódio e potássio .....	23
3.6.5. Determinação de fósforo .....	23
3.6.6. Determinação de proteína pelo método do biureto ....	23
3.6.7. Determinação de proteína pelo método de Lowry .....	23

3.6.8. Determinação de triptofano .....	23
3.6.9. Determinação de aminoácidos .....	24
3.7. Análise eletroforética .....	25
3.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio .....	25
3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e uréia .....	26
3.8. Propriedades funcionais .....	28
3.8.1. Solubilidade versus pH e força iônica .....	28
3.8.2. Capacidade de emulsificação versus pH .....	28
3.9. Análises antinutricionais .....	29
3.9.1. Atividade ureática .....	29
3.9.2. Atividade antitriptica .....	30
3.9.3. Isolamento de inibidores de tripsina .....	30
3.9.3.1. Acoplamento da tripsina à Sapharose 4B ativada com CNBr .....	30
3.9.3.2. Preparo da coluna, aplicação da amostra e coleta de frações .....	32
3.9.3.3. Remoção das impurezas e eluição do inibidor ligado .....	32
3.9.3.4. Análise das frações, diálise e liofilização .....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
4.1. Obtenção dos isolados protéicos .....	33
4.2. Composição química .....	35
4.2.1. Composição em proteína, cinza e minerais .....	35
4.2.2. Composição em aminoácidos .....	36
4.3. Análise eletroforética .....	41
4.4. Propriedades funcionais .....	49
4.4.1. Solubilidade .....	49



	Página
4.4.2. Capacidade de emulsificação .....	54
4.5 Análise antinutricional .....	57
4.5.1. Atividade ureática .....	57
4.5.2. Atividade antitriptica .....	59
4.5.3. Isolamento de inibidores de tripsina .....	61
5. CONCLUSÕES .....	63
6. RESUMO .....	65
7. SUMMARY .....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
APÊNDICE .....	80

## 1. INTRODUÇÃO

O guandu está situado em quinto lugar entre as leguminosas no mundo. Na Índia, ocupa atualmente o primeiro lugar. No entanto, em muitas partes dos trópicos o seu potencial como alimento tem sido negligenciado.

Devido a sua grande adaptação a climas áridos e de solos de pouca fertilidade, o guandú pode ser considerado como cultura de grande valor potencial sócio-econômico para as regiões norte (quente e úmido) e nordeste (árido e seco) do Brasil, desfavoráveis ao cultivo de soja e feijão. O seu fácil cultivo o torna ajustável dentro de uma estrutura agrária ainda precária ou em fase de desenvolvimento.

O consumo de guandu pela população brasileira tem sido relativamente pequeno. Este fato pode ser atribuído a hábitos dietéticos regionais que não incluem estes grãos na dieta comum. Entretanto, a utilização de guandu na dieta brasileira pode ser incentivada através da produção de ingredientes como concentrados e isolados protéicos, e farinhas para uso em formulações de novos produtos ou mesmo em alimentos tradicionais.

O potencial de utilização de um ingrediente protéico em determinado alimento depende do seu comportamento nas diversas condições encontradas no alimento como pH, força iônica e temperatura. Deste modo, um estudo sistemático e criterioso das propriedades de um ingrediente protéico como solubilidade,

emulsificação, espumabilidade, geleificação, viscosidade, absorção de água, retenção de lipídeos, sabor e textura é indispensável ao delineamento de aplicações.

Ao lado da fração protéica de bom valor nutricional, sabe-se ainda da existência no guandu de fatores que apresentam atividade antinutricional como os inibidores de tripsina e as hemaglutininas. A inativação destes fatores é essencial para a sua utilização na alimentação humana.

O objetivo do presente trabalho é a obtenção de isolados protéicos de guandu, determinação de suas propriedades funcionais e antinutricionais e caracterização química e eletroforética destes isolados.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Características agronômicas

O guandu (Cajanus cajan L. Millsp.), pertence à família Leguminosae e sub-família Papilionoideae. Segundo VIEIRA (88) é provavelmente uma planta nativa da Ásia. Foi introduzida posteriormente na África, América Tropical e Austrália.

MOLINA et alli (49) relatam que das 13 000 espécies de leguminosas conhecidas somente 20 espécies são de importância econômica relativa na América Latina. Segundo os autores, o guandu é uma fonte promissora de proteína embora seja consumido em baixos níveis e somente em áreas específicas.

O guandu pode ser considerado como cultura anual ou perene com duas colheitas anuais. A produção de grãos pode atingir normalmente de 800 a 1500 kg/ha, porém rendimentos de 5000 kg/ha já foram relatados na Índia (88). No Instituto Agronômico de Campinas, obteve-se um rendimento de 4290 kg/ha de sementes com plantio em outubro. Rendimentos superiores a 3000 kg/ha foram conseguidos com plantio em janeiro. ABRAMS citado por

MORTON (50) relata que o plantio de guandu de abril a junho tem sido mais favorável para a variedade "kaki". Dados do Indian Agricultural Research Institute (IARI) citados por HULSE (35) apresentam variações na produção de grãos de 1250 a 1682 kg/ha.

RACHIE (63) ao discutir os méritos agronômicos de várias leguminosas a serem cultivadas em regiões tropicais coloca o guandu em 2º lugar, precedido somente pelo feijão de corda (Vigna unguiculata, Walp.) Refere-se às qualidades do guandu como sendo cultura de clima semi-árido a úmido, de ampla adaptação nos trópicos; uso potencial em sistemas de produção a curto e a longo termo (de forma perene ou anual); potencial de rendimento de 3000 a 5000 kg/ha, maior do que outras leguminosas, à exceção da soja; grande viabilidade genética e alta taxa de cruzamento, facilitando recombinação natural e uso de métodos genéticos de melhoramento; baixa incidência de doenças e ataque de insetos; excelente qualidade nutricional, com baixo teor de inibidores metabólicos.

MORTON (50) relata que quanto à adaptação, o guandu é sensível à geadas e desenvolve bem em regiões tropicais e sub-tropicais, úmidas e secas. A planta não é exigente quanto ao tipo de solo desde que seja bem drenado. Irrigação é desnecessária pois é resistente à seca. RACHIE (63) sugere que o guandu possui crescimento relativamente fácil em regiões de baixa altitude, inadequadas para o crescimento de feijão comum.

VILELA (89) verificou que os grãos de guandu da variedade "kaki" apresentam formato oval, aproximadamente arredondado, cor cinza salpicada de vermelho, menos achatado do que o feijão comum e menos arredondado do que a soja.

## 2.2. Composição química

SINGH et alli (74) verificaram numa variedade indiana de guandu "Pusa best", a seguinte composição química: cinza, 4,07%; extrato etéreo, 3,85%; proteína, 21,8%; fibra, 5,22%; carboidratos totais, 64,6%; fósforo, 369,1 mg/100g; cálcio, 294 mg/100g; ferro, 6,71 mg/100g.

ELIAS et alli (24) verificaram numa variedade de guandu de Porto Rico, a seguinte composição centesimal: umidade, 10,8%; proteína, 23,5%; carboidratos, 53,3%; lipídeos, 1,5%; fibra, 7,1%; cinzas, 3,8%.

KHAN & RACHIE citados por MORTON (50) sugerem que o guandu é tido como rico em proteína de alta qualidade variando de 19 a 28%. Dados do IARI citados por HULSE (35) apresentam variações do teor protéico de 20,7 a 21,1%.

HULSE (35) mostra o teor de lipídeos do guandu como sendo entre 1 e 2%, com mais de 50% consistindo de ácidos graxos polinsaturados.

JOHNSON & RAYMOND citados por MORTON (50) apresentam os seguintes valores para ácidos graxos: linolênico, 5,56%; linoléico, 51,41%; oléico, 6,33%; ácidos graxos saturados, 37,7%.

O guandu apresenta somente modestas quantidades de vitamina A, aproximadamente 150 UI/100g e o teor de niacina é razoável, variando de 1,5 a 2,5 mg/100g (35). Valores médios para outras vitaminas citados por MORTON (50) são os seguintes: tiamina, 0,5 mg/100g; riboflavina, 0,15 mg/100g; ácido nicotínico, 2,3 mg/100g.

O teor de carboidratos que consiste principalmente de amido, varia segundo HULSE (35) entre 50 e 60%. NIGAN & GIRI citados por MORTON



(50) encontraram os seguintes valores para outros açúcares: sacarose, 1,6%; rafinose, 1,1%; estaquiose, 2,7%; verbascose, 4,1%.

Segundo HULSE (35), o guandu é uma boa fonte de ferro contendo 6 a 9 mg/100g e contém 5 a 10 vezes mais cálcio do que os principais cereais. JOHNSON & RAYMOND citados por MORTON (50) verificaram que fósforo-fitina (75 a 89% de fitina) está presente no teor de 200 mg/100g de semente. VILELA (89) sugere que o fato do cálcio ser relativamente alto no guandu, o ácido fítico pode não interferir com a absorção deste mineral, todavia, pode interferir com a absorção de ferro, magnésio e zinco.

MORTON (50) refere-se às enzimas do guandu como a seguir: MALHOTTA & RAM verificaram que as sementes de guandu contém a enzima urease. JOHNSON & RAYMOND mostraram que a urease quando isolada na forma cristalina apresenta alta atividade. BARHAM et alli relatam uma forma simples de  $\alpha$ -galactosidase no guandu com peso molecular relativamente baixo (87.000). DEY relata uma nova enzima,  $\beta$ - $\alpha$ -arabinosidase extraída das sementes dormentes que podem ser estocadas por dois meses sem perda de atividade.

JOHNSON & RAYMOND citados por MORTON (50) verificaram que as principais proteínas do guandu são duas globulinas: cajanina que representa 58% do nitrogênio total e concajanina que representa 8%. Verificaram que ambas são altas em tirosina e moderadamente altas em cistina, arginina e lisina. Cajanina é deficiente em metionina, triptofano e treonina.

SINGH et alli (73) estudando a variação de metionina e triptofano entre 14 variedades de guandu, verificaram que a "R7" apresenta maior teor de triptofano (0,62%) do que a "R3" (0,43%) e a "NP69" apresenta maior teor de metionina (1,89%) do que a "R7" (1,20%).

MTENGO & SUGIYAMA (51) verificaram numa variedade de guandu da

Tanzânia, alto teor de triptofano (1,3%). Verificaram que a proteína de guandu apresenta escore igual a 61 quando comparado com a proteína de referência da FAO/WHO, 1973, sendo maior do que outras leguminosas à exceção da soja (escore igual a 69).

YADAV (99) cita que a quantidade máxima de proteína de reserva acumulada nas sementes de guandu ocorre entre 21 e 42 dias de maturação. Relata que aminoácidos sulfurados livres são encontrados nas sementes em baixa concentração em torno de 14 a 28 dias de maturação. Sugere que a aplicação de fertilizantes sulfurados pode elevar os níveis destes aminoácidos.

EVANS & BOULTER (26) verificaram que a presença da substância S-metil-L-cisteína no guandu, atua como um antimetabólico para cistina e metionina. Encontraram na variedade "Makarere", teor de 0,038g/16g de nitrogênio, desta substância.

HULSE (35) sugere três características indesejáveis associadas com os grãos de leguminosas: presença de substâncias que aglutinam as células vermelhas do sangue, inibidores de tripsina e tendência a induzir flatulência. Relata que a atividade hemaglutinante no guandu é pequena comparada com outros feijões, como o feijão preto e o feijão comum e a antitripsina também parece ser de pouca consequência.

BRESSANI et alli (13) sugerem que a presença de taninos em leguminosas contribui com a baixa digestibilidade da proteína. Entretanto, PRICE et alli (62) verificaram que a concentração de taninos no guandu, (0 a 0,2%), não é suficiente para causar precipitação protéica.

KARADE & EVANS (38) constataram que os princípios antinutricio

nais do feijão comum são destruídos à temperatura de 121°C durante cinco minutos. Verificaram ainda que os inibidores de tripsina e as hemaglutininas são solúveis a pH 4,0.

ELIAS et alii (24) encontraram numa variedade de guandu de Porto Rico, nível de inibidores de tripsina e eficiência protéica (PER) iguais a 10,1 UTI/ml e 0,89, respectivamente.

ELIAS et alii (25) verificaram que é necessário um cozimento de 15 minutos para o guandu alcançar valor nutritivo máximo; traduzido pelos valores de digestibilidade (80,4%) e PER (1,92).

GOPALA KRISHNA et alii (32) verificaram que 78% das proteínas de guandu são solúveis em sais, das quais 61% são globulinas. Isolaram três frações das globulinas, a saber: fração  $\alpha$  (legumina) que é insolúvel a pH 4,7; fração  $\beta$  (vicilina) e fração  $\gamma$  que são solúveis a pH 4,7. A fração  $\gamma$  assemelha-se à conglutinina de tremçoço (Lupinus mutabilis) isolada por BLAGROVE & GILLESPIE (12) e possui quatro vezes mais aminoácidos sulfurados do que a fração  $\alpha$ .

GOPALA KRISHNA et alii (32) estudaram ainda o comportamento eletroforético das globulinas de guandu e de suas frações em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS). Verificaram nove bandas protéicas para as globulinas, sete bandas para a fração  $\alpha$ , três bandas para a fração  $\beta$  e três para a fração  $\gamma$ . O tratamento térmico das amostras a 100°C durante 15 minutos ao invés do tratamento usual a 100°C durante 2 minutos não alterou o número de subunidades separadas eletroforéticamente; também não houve alteração do número de subunidades com a adição de  $\beta$ -mercaptoetanol.



### 2.3. Obtenção de isolados e concentrados protéicos e farinhas

Segundo SATHE & SALUNKHE (71), a obtenção de ingredientes protéicos de origem vegetal tem se limitado a poucas fontes como soja, amendoim, algodão, girassol devido problemas tecnológicos e aceitação do consumidor. Contudo, os autores relatam, que várias plantas desde algas, têm sido estudadas visando a utilização de proteínas de fontes não convencionais.

PACHECO et alli (55) verificaram rendimentos elevados em proteína na obtenção de isolados protéicos de tremçoço (Lupinus mutabilis), conseguidos pela extração a pH 8,7, com agitação moderada durante 60 minutos; proporção farinha:água de 1:15; precipitação a pH 4,5; lavagem e liofilização. A recuperação em proteína dos isolados protéicos obtidos em escala de laboratório e em escala piloto, foram de 57,6 e 36,4%, respectivamente.

BLAICHER et alli (11) verificaram que 72 a 82% das proteínas de colza (Brassica napus) foram dissolvidas com três etapas de extração e que 80 a 87% das proteínas foram dissolvidas com quatro etapas de extração. A recuperação em proteínas foi de 72,0%, utilizando-se, quatro extrações alternadas a pH 9,5 e pH 12,0 e precipitações consecutivas a pH 6,0 e pH 3,6. As condições de extração utilizadas foram as seguintes: proporção farinha:solvente de 1:25, temperatura de 30°C, tempo de cada extração de 10 minutos.

TAHA et alli (84) verificaram que 95% das proteínas de farinha de girassol (Helianthus annuus) são extraídas e 88,4% das proteínas são recuperadas, utilizando-se as seguintes condições: proporção farinha:solvente de 1:20; solução de NaCl 0,04M; tempo de extração de 90 minutos; precipitação a pH 4,0.

ALLI & BAKER (5) observaram rendimentos elevados em proteína na obtenção de isolados protéicos de feijão, utilizando-se as seguintes condi



ções de extração: tempo de 20 a 30 minutos; temperatura de 40 a 45°C; tamanho da partícula de 0,5 a 1,0 mm; solução de ácido málico pH 3,5 a 0,4M para o feijão (Phaseolus vulgaris) e 0,05M para o feijão (Phaseolus lunatus).

SATHE et alli (69) verificaram uma recuperação de 68% de proteínas, na obtenção do concentrado protéico de feijão alado (Psophocarpus tetragonolobus L. DC), utilizando-se duas etapas de extração com proporção farinha:solvente de 1:5, seguido de 1:4; tempo de extração de 16 horas seguido de 12 horas; pH do extratante de 10,0.

TELLA & OJHOMON (85) verificaram que o rendimento da extração da proteína de feijão de corda (Vigna unguiculata L. Walp.) é duas vezes maior quando se utiliza solução de NaCl a 2 ou 5%, do que quando se utiliza solução de NaCl a 10%.

AKOBUNDU et alli (4) verificaram que cerca de quatro vezes mais proteína da semente de Egusi (Colocynthis citrullus L.), são extraídas em solução de NaCl a 10% do que em água. Observaram diferenças marcantes nas propriedades funcionais de isolados protéicos obtidos com uma e duas etapas de extração.

SUMNER et alli (80) verificaram que isolados protéicos de ervilha (Pisum sativum) obtidos através de extração alcalina e precipitação isoelétrica apresentam melhores propriedades de espumabilidade, cor e sabor quando se utiliza secagem por atomização e melhores propriedades de capacidade de emulsificação e absorção de água quando se utiliza secagem por liofilização.

VILELA (89) verificou que a farinha de guandu possui 14,2% de proteína solúvel em água para um total de 21,8% de proteína. Observou para fa

rinhas extrudadas, uma variação de 2,5 a 4,5% de proteína solúvel.

SHEN (75) verificou que algumas proteínas de soja são insolubilizadas durante precipitação e liofilização. Refere-se à diálise em pH alcalino como meio de prevenir esta insolubilização. Observou que a perda de solubilidade não é o único critério de desnaturação protéica uma vez que o extrato dialisado possui proteínas solúveis que apresentam-se desnaturadas conforme medida da viscosidade intrínseca e da rotação ótica.

SHEN (76) verificou um aumento de 30% na solubilidade de isolados protéicos de soja, utilizando-se as seguintes condições de extração: temperatura de 62°C; agitação de 11.000 r.p.m.; centrifugação de 200.000g.

REICHERT (66) obteve concentrados protéicos de ervilha, através de um classificador de ar, com teores de proteína variando de 33,6 a 60,2%. AGUILERA et alli (2) obtiveram quatro ingredientes de feijão, a saber: farinha integral, farinha da casca, fração com alto teor de proteína, fração com alto teor de amido; utilizando-se um trocador de calor (3).

NICHOLS et alli (53) verificaram que isolado protéico de soja obtido por ultrafiltração é funcionalmente superior ao isolado tradicional.

TOBELMANN (86) verificou que variando-se a concentração de hexa metafosfato de sódio de 0,5 a 0,7%, aumenta-se significativamente a recuperação de proteínas na obtenção de co-precipitados de leite.

KINSELLA (40) relata que o aroma de feijão cru em isolado protéico de soja pode ser minimizado pelo aquecimento dos grãos antes da extração. O tratamento térmico, entretanto, reduz drasticamente a solubilidade da proteína. WOLF citado pelo autor sugere a lavagem do isolado protéico de soja com solventes orgânicos, visando melhorar o sabor, sem contudo causar precipitação protéica.



GEUGUEN et alli (29) relatam que a presença de fatores anti-trípticos e hemaglutinantes em leguminosas, podem limitar sua utilização na obtenção de isolados protéicos. Verificaram que a redução de hemaglutininas ocorre sobretudo na precipitação isoelétrica da proteína e na lavagem do isolado; enquanto que os inibidores de tripsina são mais eficientemente reduzidos através do processo de ultrafiltração. Observaram, no entanto, que cerca de um terço destes fatores ficam retidos no isolado.

#### 2.4. Propriedades funcionais de ingredientes protéicos

Segundo HERMANSSON (34) propriedades funcionais são propriedades físico-químicas que dão informação do comportamento da proteína no sistema alimentício. Para ingredientes protéicos, estas propriedades podem ser úteis na determinação do potencial de aplicação.

KINSELLA (41) sugere que a solubilidade fornece um bom índice do potencial de aplicação de um ingrediente protéico. Refere-se à curva de solubilidade versus pH como um indicador da funcionalidade global da proteína. Relata que a investigação das propriedades funcionais pode ser mais eficiente se um estudo sistemático da solubilidade é primeiramente feito em diversas forças iônicas desde que muitos alimentos são sistemas iônicos complexos.

BARTHOLOMAI (8) relata que isolados protéicos de feijão branco (Phaseolus vulgaris) apresentam um bom potencial de aplicação em bebidas protéicas vegetais, bebidas carbonatadas e alimentos sólidos e semi-sólidos. Refere-se ao concentrado protéico de pescado como tendo bom valor nutricional, mas não apresenta bons valores de embebição e de inchamento devido o fato da proteína ser altamente insolúvel.

Segundo ANDERSON et alli citados por WOLF (95), a insolubilidade da proteína de soja em pH 4,5, pode ser parcialmente reduzida pela adição de cloreto de sódio ou cloreto de cálcio, ao solvente de extração. Verificaram que os índices máximos de solubilidade ocorrem em concentração iônica de 0,7N de cloreto de sódio e 0,3N de cloreto de cálcio.

HERMANSSON (34) revela que pequenas concentrações de cálcio podem causar problemas de solubilidade em bebidas. Sugere que a ligação de cálcio tem um efeito específico de atração, além de reduzir a carga negativa líquida em pH alcalino; todavia, em altas concentrações de cálcio, a solubilidade aumenta devido efeitos protetores e de ions específicos.

MCWATERS & HOLMES (46) verificaram em três meios de dispersão da farinha de soja, que água solubilizou maior teor de proteína a pH 3,0 ou menor e a pH 7,0 ou maior. Em pH 10,0, a proteína foi quase totalmente solúvel em suspensões preparadas com água. Entre pH 4,0 e 5,0, maiores solubilidades foram obtidas em suspensões com baixo teor de sal (0,1M NaCl) do que em suspensões de água. Em suspensões com alto teor de sal (1M NaCl), a solubilidade atingiu 70,1% em pH 4,5.

SATHE et alli (68) constataram que o comportamento da curva de solubilidade versus pH do concentrado protéico de tremço (Lupinus mutabilis), caracteriza-se por solubilidades crescentes de pH 2,0 a 9,0 ao invés da forma usual de  $V$  apresentada pela maioria das proteínas de leguminosas.

HUTTON & CAMPBELL (36) constataram que o isolado protéico de soja é mais solúvel do que o concentrado protéico de soja em virtude das condições do processamento causarem maior extensão de desnaturação no concentrado do que no isolado.

PENG et alli (58) verificaram que algumas proteínas de soja que



são pouco solúveis no extratante, conferem diferentes propriedades funcionais para diversos isolados protéicos de soja comerciais.

PILOSOF et alli (60) estudaram o efeito da temperatura, do tempo e do teor de umidade no decréscimo da solubilidade de isolado protéico de feijão e da farinha de feijão. Verificaram que a velocidade de decréscimo da solubilidade foi grandemente aumentada com a elevação do teor de umidade de 1,0 a 29,7%. Observaram que o isolado foi mais sensível ao tratamento térmico do que a farinha.

AGUILERA et alli (3) verificaram que a tostagem drástica de farinha de feijão com alto teor de proteína, aumentou 60% a capacidade de absorção de água e 15 vezes a viscosidade.

DIPPOLD citado por WU & INGLETT (97) verificou que farinha de soja, contendo 85, 70, 55 e 15% de proteína solúvel, apresentou, respectivamente os seguintes valores de capacidade de absorção de água: 270, 385, 370 e 290%.

RAKOSKY citado por KINSELLA (40) afirma que isolados protéicos de soja tem substituído com vantagens as proteínas miofibrilares solúveis em sais, em produtos cárneos emulsionados. Sugere que o isolado protéico de soja, confere propriedades desejáveis nestes produtos como coesividade, emulsificação, absorção de água e formação de uma estrutura gélida firme e resistente.

PENG et alli (57) verificaram que a interação entre a proteína da soja e a proteína da carne ocorre na proteína 11 S completamente desnaturada da soja com as cadeias pesadas de miosina.

VOUTSINAS et alli (90) verificaram que os valores de capacidade de emulsificação de isolado protéico de soja aquecido são maiores do que os valores do isolado clássico devido a proteína de soja desnaturada apre

sentar maiores índices de hidrofobicidade do que a proteína de soja nativa. Observaram, por outro lado, um decréscimo da estabilidade da emulsão após aquecimento, devido agregação da proteína.

MCWATTERS & HOLMES (46) verificaram em três meios de dispersão da farinha de soja que a capacidade de emulsificação a pH 4,0 em suspensões de água foi relativamente baixa e em suspensões com baixo teor de sal (0,1 M NaCl) não houve formação de emulsão; mas em valores de pH abaixo de 4,0 e acima de 5,0, a capacidade de emulsificação aumentou consideravelmente. Em suspensões com alto teor de sal (1M NaCl), ocorreu um aumento crescente da capacidade de emulsificação, elevando-se o pH de 2,0 a 9,0.

MCWATTERS & HOLMES (47) verificaram em suspensões a 6% de farinha de amendoim (Arachis hypogaea), que as emulsões formadas em valores de pH abaixo de 4,0 são viscosas, tipo maionese, enquanto que as emulsões formadas em valores de pH acima de 4,0 são finas, tipo cobertura de saladas.

TORNBERG (87) verificou que emulsões de isolados protéicos de soja, formadas num sonificador, apresentam excelentes propriedades de emulsificação.

WANG & KINSELLA (91) verificaram que 1,0g de proteína de alfafa é capaz de emulsionar até 520 ml de óleo. WU et alli (96) encontraram para concentrados protéicos de aveia, capacidade de emulsificação de 47,0 g de óleo por grama de proteína. SATHE & SALUNKHE (70) relatam que 1,0 g de concentrado protéico de feijão é capaz de emulsionar 72,6 gramas de óleo.

NATH & RAO (52) verificaram que isolados protéicos de guar possu em grande capacidade de formação de espumas. Observaram que a presença de saponinas na farinha de guar contribui com suas propriedades de espumabilidade mas assumem que isolados protéicos são isentos destes fatores.



DEL ROSÁRIO & FLORES (21) verificaram que farinha de feijão mung (Vigna radiata L.) contendo 54,5% de proteína possui capacidade de retenção de óleo maior que a da farinha de soja contendo 55% de proteína. Observaram que uma suspensão a 3% da farinha de feijão mung, forma espuma estável, após agitação de 6 minutos, com aumento de 530% de volume. Observaram a formação de gel estável com uma concentração mínima de 10% (p/v).

RAHMA & RAO (64) verificaram que a hidrólise enzimática da proteína de algodão (Gossypium spp), aumentou quatro vezes a solubilidade e duas vezes, a capacidade de emulsificação.

KINSELLA (40) relata que a hidrólise química ou enzimática de proteínas desnaturadas aumenta a solubilidade destas.

JOHNSON & BREKKE (37) verificaram que a modificação do isolado protéico de ervilha com anidrido acético ou anidrido succínico, melhorou consideravelmente as suas propriedades de emulsificação, espumabilidade e absorção de água.

CHOI et alli (17) verificaram que isolado protéico de algodão modificado com anidrido succínico a nível de 100%, foi completamente solubilizado. Observaram que succinilação acima de 60%, aumentou consideravelmente a capacidade de emulsificação e a capacidade de retenção de óleo.

RAHMA & RAO (65) verificaram que acetilação da farinha de algodão reduz a solubilidade da proteína e aumenta a capacidade de emulsificação.

SUNG et alli (81) verificaram que N-acetil-L-homocisteína pode ser eficientemente incorporada na proteína da soja, pela incubação com papaína, na presença de N-acetil-L-homocisteína tiolactona sob condições alcalinas. Sugerem que a adição de um resíduo contendo grupo SH na proteína através da ligação peptídica, altera substancialmente a funcionalidade, melhorando as propriedades de solubilidade, emulsificação, espumabilidade e geleificação.



SUNG et alli (82) verificaram que a fosforilação a nível de 30% do isolado protéico de soja, insolubilizou completamente a proteína em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico e aumentou a solubilidade em condições levemente ácidas e neutras. Sugerem que a reação de trimetafosfato de sódio com a proteína é evidenciada pela fosfoesterificação de aminoácidos hidroxílicos e fosforamidação de lisina que promove um efeito protetor dos  $\epsilon$ -aminogrupos à formação de lisilalanina.

BETSCHART et alli (10) verificaram que a incorporação de 5 e 10% de isolado protéico de açafroa (Carthamus tinctorius L.) em pães, promoveu um aumento de 25 e 50% do teor protéico, respectivamente. Observaram que o volume específico de pães contendo 10% de isolado protéico de açafroa, foi equivalente a 85% do volume específico da farinha de trigo.

WILLS & KABIRULLAH (94) observaram que a utilização de farinha de girassol em substituição à farinha de trigo, em produtos cárneos emulsionados, resultou numa emulsão mais estável.

DESHPANDE et alli (22) verificaram que a suplementação da farinha de trigo com farinha de feijão aumentou a capacidade de absorção de água de 35,6%, a capacidade de retenção de óleo de 40,3% e capacidade de emulsificação de 12,0 a 14,0%. Observaram ainda que a espumabilidade aumentou três vezes e que as espumas formadas foram mais estáveis.

Nas últimas décadas, a soja vem ocupando destacada posição como ingrediente nas indústrias de alimentos devido principalmente às propriedades funcionais conferidas nestes alimentos. Todavia, fontes alternativas de proteínas vem sendo estudadas visando a sua aplicação no sistema alimentício sem afetar o sabor e o aroma do produto final. GOMES (30) relata que o guandu não parece estar sujeito a problemas organolépticos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Matéria prima

Sementes de guandu (Cajanus cajan L. Millsp.), da variedade kaki foram obtidas da Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas.

#### 3.2. Moagem

As etapas de moagem do guandu, desde o grão inteiro, até a produção da farinha, constaram da passagem através de um moinho tipo Willye marca Tecnal e de moinho de martelo marca Weber Bros & White Metal Works com peneira de dimensão de 0,05 mm.

#### 3.3. Reagentes

Os principais reagentes utilizados no presente trabalho e as suas marcas, estão listados no quadro 1A do apêndice.

#### 3.4. Equipamentos

Um potenciômetro digital Metrohm Herisau modelo E-500 foi usado para todas as medidas de pH. Um agitador magnético Fisatom modelo 704-4 foi

usado na extração de proteínas, ajustes de pH e diálise. Para muitas pesagens, uma balança digital Sauter modelo K-1200 foi usada. Uma centrífuga Budapesti Vegyipari Gépgyár tipo Lu-411/Lz foi usada para centrifugações de maiores volumes e uma centrífuga International foi usada para centrifugações de menores volumes. Um liofilizador Metal-Lux modelo ML-10/3 com controle Euro TR-800 foi usado na secagem dos isolados protéicos e um liofilizador Virtis modelo 10-145 MR-BA foi usado na secagem dos inibidores de tripsina. Espectrofotômetro Varian modelo 634; Spectromon modelo 204 e Spectronic modelo 20, foram utilizados nas determinações espectrofotométricas. Um espectrofotômetro de absorção atômica Varian modelo AA-175 foi usado na determinação de cálcio e magnésio e um fotômetro de chama Corning modelo 400 foi usado na determinação de sódio e potássio. Aparelhos eletroforéticos marca Técnica Permatron foram utilizados nas análises eletroforéticas em géis de poliacrilamida. Colunas modelo K-9 e reservatório de tampão modelo R-25 marca Pharmacia e coletor de fração marca Gilson modelo MFK, foram utilizados nas separações cromatográficas. Analisador automático de aminoácidos marca Beckman modelo 121 foi utilizado nas determinações de aminoácidos.

### 3.5. Obtenção de isolados protéicos de guandu

Isolados protéicos de guandu foram obtidos por variação da extração na recuperação de proteínas conforme modificação das técnicas utilizadas por BETSCHART & SAUNDERS (9), CHANG & SATTERLEE (15) e TOBELMANN (86).

#### 3.5.1. Obtenção do isolado clássico

Dissolveu-se 50g de farinha de guandu em 500 ml de água e ajust



tou-se o pH para 9,0 com NaOH 1N. Agitou-se a temperatura ambiente durante duas horas e centrifugou-se a 13000xg por 20 minutos, separando-se o sobrenadante. O volume do sobrenadante foi medido e retirou-se uma alíquota para se determinar a concentração de proteína pelo método de Kjeldahl, procedendo idênticamente com o resíduo exceto que este foi pesado. Mais duas extrações sucessivas foram realizadas, utilizando-se os mesmos procedimentos anteriores. Os três volumes de sobrenadantes obtidos foram combinados e mediu-se o volume total e a concentração de proteína. Sob agitação, foi adicionada uma solução de ácido clorídrico, 1N, até pH 4,5. Após centrifugação a 2000xg por 30 minutos, o precipitado foi coletado, separando-se o sobrenadante. O precipitado foi liofilizado e em ambas frações, determinou-se a concentração de proteína.

### 3.5.2. Obtenção do isolado contendo cálcio

A 50 gramas de farinha, adicionaram-se 500 ml de água destilada. Ajustou-se o pH para 9,0, com hidróxido de sódio 1N. Agitou-se a temperatura ambiente durante duas horas, ajustando o pH periodicamente durante a agitação. Após este tempo, a mistura foi centrifugada a 13000xg por 20 minutos, separando-se o sobrenadante. O volume do sobrenadante foi medido e retirou-se uma alíquota para se determinar a concentração de proteína pelo método de Kjeldahl, procedendo-se idênticamente com o resíduo exceto que este foi pesado. Mais duas extrações sucessivas foram realizadas, utilizando-se os mesmos procedimentos anteriores. Os três volumes de sobrenadantes obtidos foram combinados e mediu-se o volume total e a concentração de proteína. Adicionou-se cloreto de cálcio até atingir a concentração de 0,20% (p/v). Sob agitação, foi adicionada uma solução de ácido clorídrico 1N, até pH 4,5. Centrifugou-se a 2000xg por 30 minutos, separando-se o sobrena

dante e o precipitado foi coletado. O precipitado foi liofilizado e, em ambas frações, determinou-se a concentração de proteína.

### 3.5.3. Obtenção do isolado contendo hexametáfosfato

A 50 gramas de farinha, adicionaram-se 500 ml de água destilada. Ajustou-se o pH para 9,0, com hidróxido de sódio 1N. Agitou-se a temperatura ambiente durante duas horas, ajustando-se o pH periodicamente durante a agitação. Após este tempo, a suspensão foi centrifugada a 13000xg por 20 minutos, separando-se o sobrenadante. O volume do sobrenadante foi medido e retirou-se uma alíquota para se determinar a concentração de proteína pelo método de Kjeldahl, procedendo-se identicamente com o resíduo exceto que este foi pesado. Mais duas extrações sucessivas foram realizadas, utilizando-se os mesmos procedimentos anteriores. Os três volumes de sobrenadantes foram combinados e mediu-se o volume total e a concentração de proteína. Adicionou-se hexametáfosfato de sódio até atingir a concentração de 0,50% (p/v). Sob agitação, foi adicionada uma solução de ácido clorídrico 1N, até pH 4,5. Centrifugou-se a 2000xg por 30 minutos, separando-se o sobrenadante e o precipitado foi coletado. O precipitado foi liofilizado e, em ambas frações, determinou-se a concentração de proteína.

### 3.5.4. Obtenção do isolado aquecido

A 50 gramas de farinha, adicionaram-se 500 ml de água destilada. Ajustou-se o pH para 9,0, com hidróxido de sódio 1N. Agitou-se a temperatura ambiente durante duas horas, ajustando-se o pH periodicamente durante a agitação. Após este tempo, a suspensão foi centrifugada a 13000xg por 20 minutos, separando-se o sobrenadante. O volume do sobrenadante foi medi

do e retirou-se uma alíquota para se determinar a concentração de proteína pelo método de Kjeldahl, procedendo-se idênticamente com o resíduo exceto que este foi pesado. Mais duas extrações sucessivas foram realizadas, utilizando-se os mesmos procedimentos anteriores. Os três volumes de sobrenadantes foram combinados e mediu-se o volume total. Sob agitação, foi adicionada uma solução de ácido clorídrico 1N, até pH 4,5. Após a precipitação, levou-se a um banho-maria de alta temperatura marca Fisher e aqueceu-se a 90°C durante cinco minutos. Centrifugou-se a 2000xg por 30 minutos, separando-se o sobrenadante e o precipitado foi coletado. O precipitado foi liofilizado e armazenado em freezer e, em ambas frações, determinou-se a concentração de proteína. Para cálculo do rendimento, determinou-se a concentração de proteína na farinha.

### 3.6. Análises físico-químicas

#### 3.6.1. Determinação de nitrogênio total

Nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl segundo GOMES (31).

#### 3.6.2. Determinação de cinza

Cinza foi determinada de acordo com a metodologia da A.O.A.C. (6). 1,0 grama de isolado protéico foi pesado em cadinho de porcelana e mantido em mufla marca Quimis modelo 318-24 aquecida a 550°C durante 12h.

#### 3.6.3. Determinação de cálcio e magnésio

Cálcio e magnésio foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. A solução mineral foi preparada pela dissolução da





cinza em 50 ml de ácido clorídrico 0,1N.

#### 3.6.4. Determinação de sódio e potássio

Sódio e potássio foram determinados por fotometria de chama na mesma solução mineral utilizada para determinação de cálcio e magnésio.

#### 3.6.5. Determinação de fósforo

Fósforo foi determinado pelo método colorimétrico de Fiske & Subarow conforme metodologia utilizada por CHEN et alli (16).

#### 3.6.6. Determinação de proteína pelo método do biureto

O método utilizado foi o proposto por COOPER (18).

#### 3.6.7. Determinação de proteína pelo método de Lowry

O método utilizado foi o original conforme LOWRY et alli (44).

#### 3.6.8. Determinação de triptofano

Triptofano foi determinado pelo método colorimétrico de OPIENSKA-BLAUTH et alli (54). O hidrolisado foi obtido através do seguinte procedimento: 10 miligrama de proteína dos isolados protéicos foi dissolvida em 10 ml de solução tampão fosfato 0,05M pH 7,4 contendo uma mistura de 6 miligrama de alcalase e tripsina (1:1). Adicionou-se 3 gotas de clorofórmio e levou-se o erlenmeyer de 25 ml com rolha esmerilhada a um banho-maria com agitação a 37°C e agitou-se 12 horas. Findo este período, centrifugou-se a 12000xg por 30 minutos em centrífuga marca International modelo HT

adaptada em câmara fria, separando-se o sobrenadante para os ensaios subsequentes.

### 3.6.9. Determinação de aminoácidos

Aminoácidos foram determinados por cromatografia de troca iônica segundo MOORE & STEIN (49) e SPACKMAN et alli (78). O hidrolisado foi obtido através do seguinte procedimento: 10 miligrama de proteína dos isolados protéicos foi colocada em tubo de pyrex de 15 ml provido de tampa rosqueável. Adicionou-se 10 ml de ácido clorídrico 6N e hidrolizou-se em estufa aquecida a 110°C durante 24 horas. Resfriou-se os tubos e filtrou-se em papel de filtro Whatman n.1, recolhendo-se o filtrado em bécker de 50 ml com junta esmerilada. Evapotou-se o filtrado em evaporador rotativo a vácuo a 45°C até secura. Dissolveu-se o resíduo obtido em 3 ml de água destilada e filtrou-se através de filtro de fibra de vidro. Pipetou-se 1,0 ml do filtrado para balão de fundo redondo de junta esmerilada de 50 ml e evaporou-se a vácuo até secura. Dissolveu-se o resíduo obtido em exatamente 7,0 ml de solução tampão de citrato de sódio 0,2N pH 2,2 e filtrou-se através de filtro de fibra de vidro para frasco de penicilina. Aspirou-se um volume do hidrolisado até a marca dos 250 ul de uma seringa e aspirou-se numa segunda seringa 250 ul de uma mistura sintética de 18 aminoácidos contendo 2,5 umoles de cada aminoácido por mililitro, à exceção de cistina que apresenta a metade desta concentração. Procedeu-se a operação no analisador automático de aminoácidos e finda a análise, obteve-se a fita do integrador contendo as concentrações dos aminoácidos em nmoles/ml. A porcentagem de aminoácidos no isolado foi calculada através da seguinte forma:

$$\% \text{ Aminoácido} = \frac{(\text{Moles} \times \text{Peso molecular}) \text{ do Aminoácido}}{\text{Peso do isolado}} \times 100$$

### 3.7. Análise eletroforética

A metodologia utilizada foi uma modificação do método utilizado por LAEMMLI citado por PEREIRA (59).

#### 3.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio

Géis de poliacrilamida, contendo duodecil sulfato de sódio (SDS) foram preparados em tubos de vidro de 6 mm de diâmetro e 75 mm de comprimento, a partir de uma solução de acrilamida e N, N' metileno bisacrilamida a 25%, uma solução tampão 1M de tris-hidroximetilaminometano, pH 8,9, ajustado com ácido clorídrico 1N contendo 180  $\mu$ l de TEMED (N, N, N', N'-tetrametilenodiamino) e SDS a 0,2%. O gel de corrida, a 12,5% de poliacrilamida, com 1,3% de interligações, contendo 0,2% de SDS, foi preparado misturando-se quatro partes da solução de acrilamida e bisacrilamida a 25% com três partes do tampão 1M de Tris-HCl pH 8,9 contendo SDS 0,2% e uma parte de solução de persulfato de amônio a 0,28%. Para facilitar a separação, preparou-se um gel empilhador a 5% de poliacrilamida, com 1,3% de interligações, contendo SDS a 0,2%, misturando-se 2,4 ml da solução de acrilamida e bisacrilamida a 25%, 3,6 ml de água destilada, 4,5 ml da solução tampão 1M de Tris-HCl pH 8,9, contendo SDS a 0,2% e 1,5 ml da solução de persulfato de amônio a 0,28%. Amostras contendo 1% de proteína foram preparadas em tampão 0,05M de Triglicina pH 8,3 contendo SDS a 0,2%, glicerol a 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol a 2% e azul de bromofenol, aquecendo a 100°C por cinco minutos. O tampão dos eletrodos foi de acordo com DELEPAIRE & CHUA (20). Colocou-se 300 ml de tampão dos eletrodos no reservatório superior e 700 ml no reservatório inferior, evitando-se a formação de bo-



lhas de ar entre o gel e o tampão. Aplicou-se 3  $\mu$ l da amostra no topo das colunas gélicas com auxílio de uma micro-seringa. Conectou-se o sistema de eletroforese em uma fonte de alta tensão e operou-se a 8 mA por tubo. Desligou-se o sistema de eletroforese quando o azul de bromofenol atingiu a 0,5 cm da base dos tubos. Removeu-se as colunas gélicas, injetando-se água nas paredes dos tubos com auxílio de uma agulha de 7,5 cm e marcou-se com um pedaço de arame na altura do azul de bromofenol. Colocou-se os géis em tubos de ensaio numerados contendo solução de "Coomassie brilliant blue" R-250 a 0,25%, em metanol/ácido acético/água (45:9:46 v/v/v). Decantou-se o corante e cobriu-se os géis com metanol/ácido acético/água (25:7,5:67,5 v/v/v). A mobilidade relativa da proteína foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Mobilidade Relativa} = \frac{\text{Distancia percorrida pela proteína}}{\text{Distancia percorrida pelo marcador}}$$

### 3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e uréia

O gel de poliacrilamida, contendo SDS e uréia 6M, foi polimerizado em uma fina prancha quadrada entre duas placas de vidro de (1,5 mm x 125 mm x 165 mm), a partir de uma solução de acrilamida e bisacrilamida a 30%, com 2,6% de interligações e contendo uréia 6M, solução tampão 1,5M de Tris-HCl a pH 8,8, ajustado com HCl 1N, contendo uréia 6M e SDS a 0,2%. O gel de corrida foi formado em gradiente linear de 10 a 18% de poliacrilamida, através de um formador de gradiente marca Técnica Permatron, com 2,6% de interligações, contendo uréia 6M e SDS a 0,2%. A solução a 18% de poliacrilamida foi preparada misturando-se 7,4 ml da solução de acrilamida e bisacrilamida a 30% contendo uréia 6M, com 2,5 ml da solução tampão 1,5M de Tris-HCl pH 8,8

contendo uréia 6M e SDS a 0,2%, 0,5 ml de água destilada, 10 ul de TEMED e 0,6 ml da solução de persulfato de amônio a 0,28%. A solução a 10% de poliacrilamida foi preparada misturando-se 4,0 ml da solução de acrilamida e bisacrilamida a 30% contendo uréia 6M, 3,5 ml da solução tampão 1,5M de Tris-HCl pH 8,8 contendo uréia 6M e SDS 0,2%, 3,9 ml de água destilada 10 ul de TEMED e 0,6 ml da solução de persulfato de amônio a 0,28%. Após a polimerização, adicionou-se um gel empilhador a 5% de poliacrilamida, com 2,6% de interligações, contendo uréia 6M e SDS 0,2%, misturando-se 2,0 ml da solução de arilamida e bisacrilamida a 30% contendo uréia 6M, 5,5 ml de água destilada, 3,5 ml da solução tampão 1,5M de Tris-HCl pH8,8 contendo uréia 6M e SDS 0,2%, 10 ul de TEMED e 1,0 ml da solução de persulfato de amônio a 0,28%. As malhas para as amostras foram feitas com um "pente" depois que o gel é colocado. Após a polimerização, o pente foi removido. Amostras contendo 1% de proteína foram preparadas em tampão 0,05M de Triglicina a pH 8,3, contendo uréia 6M e SDS 0,2%, glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol a 2% e azul de bromofenol, aquecendo-se a 100°C por três minutos. Algumas amostras foram preparadas sem adição de  $\beta$ -mercaptoetanol, uréia e sem aquecimento. Aplicou-se 3 ul da amostra no "slot" da poliacrilamida com auxílio de uma micro-seringa. A eletroforese foi conduzida em aproximadamente 5 horas com uma voltagem constante de 150 V, à temperatura ambiente. As subunidades separadas foram reveladas com "Coomassie brilliant blue" R-250, em metanol/ácido acético/água (45:9:46 v/v/v). O gel foi descolorido em metanol/ácido acético/água (25:7,5:67,5 v/v/v). Determinou-se uma curva-padrão nas mesmas condições de análise da amostra, utilizando-se uma mistura de proteínas de pesos moleculares conhecidos. As soluções estoques utilizadas estão listadas no quadro 2A do apêndice.



### 3.8. Propriedades funcionais

#### 3.8.1. Solubilidade versus pH e força iônica

Solubilidade foi determinada pelo método da centrifugação conforme modificação do método descrito por HUTTON & CAMPBELL (36). As amostras dos isolados protéicos, equivalentes a 0,5 grama de proteína, foi adicionada água destilada ou solução de cloreto de sódio de concentração igual a 0,05, 0,1 e 1,0M, até completar o volume em 50 ml. Esta solução teve o pH ajustado para 9,0 e foi deixada sob agitação durante 2 horas. Após este período, transferiram-se para tubos de centrífuga 5,0 ml desta solução. Ajustou-se o pH para valores variando de 2,0 a 9,0, fazendo-se uso de soluções de ácido clorídrico 1N e hidróxido de sódio 1N. Centrifugou-se a 1800 xg durante 20 minutos, separando-se o sobrenadante para a determinação da concentração de proteína pelo método do biureto ou pelo método de Lowry. A porcentagem de solubilidade (%S) foi calculada pela análise de regressão através da seguinte fórmula:

$$\%S = \frac{A - a}{b} \times 10$$

onde:

A = absorvância

a = coeficiente linear

b = coeficiente angular

#### 3.8.2. Capacidade de emulsificação versus pH

Capacidade de emulsificação foi determinada pelo método da resistência elétrica conforme modificação do método de WEBB et alii (92). As amostras dos isolados protéicos, equivalentes a 10,0 miligrama de proteína,



foi adicionada uma solução de cloreto de sódio de concentração igual a 0,2M, até completar o volume em 100 ml. Esta solução teve o pH ajustado para 9,0 e foi deixada sob agitação durante 2 horas. Ajustou-se o pH até atingir valores de 4,0, 5,5 e 7,0. Transferiu-se esta solução para becker de 600 ml com um par elétrico acoplado, tomando-se o peso. Ligou-se o par elétrico a um ohmímetro marca Micronta modelo 22-204A, e agitou-se à rotação constante de 4500 r.p.m. em um agitador mecânico marca Fisatom modelo 713, gotejando óleo refinado de soja a um fluxo constante de 12 ml/minuto, até que o medidor de corrente registrasse um aumento infinito na resistência do meio. Desligou-se o agitador imediatamente e nova pesagem foi efetuada. A diferença de peso encontrada representou a capacidade de emulsificação expressa em gramas de óleo/mg de proteína.

### 3.9. Análises antinutricionais

#### 3.9.1. Atividade ureática

Atividade ureática foi determinada conforme modificação da metodologia utilizada pela A.O.C.S. citada por SMITH & CIRCLE (77). As amostras dos isolados protéicos, equivalentes a 0,2 grama, adicionaram-se 10 ml da solução tampão 0,05M de fosfato pH 7,0 ("branco") e 10 ml de solução tamponada 0,5M de uréia pH 7,0 ("teste"). Agitou-se em misturador tipo "voltex" e os tubos foram colocados em banho-maria a 30°C. Após exatamente 30 minutos, removeram-se os tubos do banho-maria e transferiram-se os sobrenadantes para recipientes plásticos apropriados para a medição de pH. Após 5 minutos, foram determinados os pH dos sobrenadantes. A diferença de pH encontrada representou a atividade ureática.

### 3.9.2. Atividade antitriptica

Atividade antitriptica foi determinada pelo ensaio caseinolítico conforme medida dos peptídeos solúveis em ácido tricloroacético segundo modificação do método de Kunitz proposta por KAKADE et alii (39). Amostras contendo 0,2% de proteína dos isolados protéicos foram preparadas em solução tampão 0,1M de Tris (hidroximetil) amino metano pH 8,0. Volumes desta solução, variando de zero a 1,0 ml, foram tomados com três repetições e foram completados até 2,0 ml com solução tampão 0,1M de Tris pH 8,0. Adicionaram-se 2 ml de uma solução de caseína a 2%, previamente ajustada a 37°C. Um "branco" foi preparado com a adição de 5 ml de solução de ácido tricloroacético a 5%. Levou-se ao banho-maria a 37°C e foi adicionado 1 ml de solução de tripsina contendo 25 microgramas/ml de ácido clorídrico 0,001M. Após exatamente 20 minutos, foram adicionados 5 ml da solução de ácido tricloroacético a 5%. Removeu-se do banho-maria e foram deixados em repouso durante 30 minutos. Após este período, a suspensão foi filtrada através de papel de filtro Whatman n.1 e as absorvâncias foram tomadas a 280 nm. Atividade antitriptica representou a média de unidade de tripsina inibida/miligrama de proteína.

### 3.9.3. Isolamento de inibidores de tripsina

Os inibidores de tripsina do isolado clássico foram purificados por cromatografia de afinidade segundo modificação dos métodos utilizados por CUATRECASAS & ANFINSEN (19) e GOMES (31).

#### 3.9.3.1. Acoplamento da tripsina à Sepharose 4B ativada com CNBr

Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio foi enxarcada com



solução 1 mM de ácido clorídrico para ocorrer a turgescência do gel e foi transferida para funil de vidro sinterizado de porosidade fina (G3). Lavou-se a Sepharose por 6 vezes com porções de 30 a 50 ml de HCl 1 mM a fim de remover os agentes estabilizantes e o material de enchimento e também para preservar a atividade dos grupos reativos da Sepharose os quais hidrolizam-se em pH elevado. Eliminou-se por filtração a vácuo, o excesso de HCl 1mM até aparência de secura. 5,0 gramas de Sepharose liofilizada forneceu ao se hidratar, 18,5 ml de volume. A 50 miligramas de tripsina, foram adicionados 10 ml de solução tampão 0,1M de bicarbonato pH 8,0 contendo NaCl 0,5 M e MgCl<sub>2</sub> 0,01M. (Tampões de Tris ou de outros compostos contendo aminogrupo são inadequados, uma vez que esses aminogrupos reagem quimicamente com o gel). O gel foi transferido para um tubo com tampa rosqueável com auxílio de uma microespátula e foi adicionada a solução recém-preparada de tripsina. Agitou-se por rotação ou por inversão o tubo contendo a suspensão do gel durante 12 horas a fim de promover a ligação da tripsina à matriz de Sepharose (nunca se deve usar agitador magnético o qual promove a quebra das partículas do gel). Retornou-se o gel para o funil de vidro sinterizado lavando-o alternadamente com cerca de 70 ml do tampão de acoplamento (bicarbonato) e 70 ml de solução tampão 0,1M de acetato pH 4,0 contendo NaCl 1M por 4 a 5 vezes a fim de remover o excesso de tripsina não acoplada. Esta etapa é essencial porque a desorção de tripsina não ligada só ocorre quando o pH é alterado. Por outro lado, este tratamento não acarreta a perda de tripsina covalentemente ligada. A presença de cloreto de sódio em ambos os tampões é importante para minimizar as alterações tripsina-tripsina causadas pela natureza polieletrólítica das mesmas. O gel foi novamente lavado com tampão de acoplamento (cerca de 70 ml) e foi armazenado em geladeira a 4°C, onde o produto ficará estável por períodos



prolongados.

### 3.9.3.2. Preparo da coluna, aplicação da amostra e coleta de frações

Amostra a 1% de isolado foi preparada em solução tampão 0,05M de Tris pH 8,0 e filtrada através de papel de filtro e milipore. Injetou-se na coluna tampão de pH 8,0 de modo a eliminar o ar do retentor e do volume morto. Suspendeu-se 15 ml da Tripsina-Sepharose 4B em 35 ml do tampão de pH 8,0, derramando a suspensão de uma só vez na coluna com o auxílio de um pequeno funil. A coluna deve estar com a extremidade inferior aberta. Quando o fluxo parou adicionou-se 15 ml do tampão de pH 8,0 para equilibrar a coluna e estabilizar a camada gélida. A coluna não fica seca por causa das altas forças de capilaridade do gel. Cessado o fluxo, injetou-se 100 ml da solução contendo inibidor no reservatório do tampão. As gotas do efluente que abandonaram a coluna foram detectadas e contadas fotoelétricamente antes de alcançarem o tubo coletor. Prefixou-se o número de gotas em 4 ml.

### 3.9.3.3. Remoção das impurezas e eluição do inibidor ligado

Eluiu-se as impurezas adicionando-se à coluna 50 ml do tampão de pH 8,0. Eluiu-se o inibidor da mesma maneira anterior, mas usando solução tampão 0,2M de KCl pH 2,0. Neste pH, o complexo tripsina-inibidor se desestabiliza ou se dissocia liberando o inibidor livre.

### 3.9.3.4. Análise das frações, diálise e liofilização

As absorvâncias das frações coletadas foram tomadas a 280 nm. Se parou-se as frações contendo inibidor, dialisou-se contra tampão de pH 2,0 durante 24 horas à 4°C em tubos de celulose marca Inlab de (0,0011 mm x 15 mm x 23 mm). A solução dialisada foi liofilizada e armazenada em freezer.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. Obtenção dos isolados protéicos

O teor de proteína da farinha de guandu (N x 5,25) foi igual a 20,3%. VILELA (89) fornece um valor de 21,8% de proteína total. Esta diferença se deve, provavelmente, ao fato de não se ter retirado a casca da semente.

Avaliou-se a eficiência do método utilizado na extração das proteínas a partir da farinha, determinando-se a quantidade de proteína extraída em cada sobrenadante. A quantidade de proteína extraída total variou de 81,4-89,9%. O teor de proteína nos resíduos, além de confirmar a quantidade extraída, serviu também para determinar as perdas durante o processo.

Do quadro 1 pode-se observar que os métodos de obtenção dos isolados protéicos apresentaram uma variação no rendimento de 49,7 a 63,5%, sendo menor que ao da semente de girassol (84), de moranga (59), de colza (11), de feijão alado (69) e aproximadamente igual ao de tremoço (55).

A diferença significativa entre a quantidade de proteína extraída e a quantidade de proteína recuperada se deve, provavelmente, às perdas de proteína durante os processos de recuperação.

Conforme quadro 1 pode-se verificar que o isolado contendo hexama-

QUADRO 1 - Efeito da variação da extração na recuperação de proteínas de isolados protéicos de guandu\*

Método de Obtenção	Proteína Recuperada (%)
Isolado clássico	59,4
Isolado contendo cálcio	49,7
Isolado contendo hexametáfosfato	63,6
Isolado aquecido	59,3

\* Determinação de proteína pelo método de Kjeldahl.

tafosfato apresentou um rendimento de 63,6%, considerado excelente, se comparado ao do isolado contendo cálcio (49,7%), do isolado aquecido (59,3%) e do isolado clássico (59,4%). Esta diferença se deve, provavelmente, ao fato de hexametáfosfato de sódio atuar com poliânion e a proteína como policação em meio ácido. ZITTLE (100) sugere que complexos insolúveis são formados devido a interação policação-poliânion e que cadeias longas de polifosfatos promovem ligações intermoleculares e agregação. Por outro lado, cloreto de cálcio atua como cátion promovendo repulsões eletrostáticas intermoleculares e solubilizando algumas proteínas. O aquecimento utilizado para o isolado aquecido promoveu um processo de desnaturação mas não foi suficiente para precipitar completamente as proteínas de modo a aumentar o rendimento em relação ao isolado clássico. A eficiência do método utilizado na extração das proteínas da farinha está ilustrado no quadro 8A do apêndice.



## 4.2. Composição química

### 4.2.1. Composição em proteína, cinza e minerais

Avaliou-se a eficiência dos métodos utilizados na obtenção dos isolados protéicos quanto ao grau de pureza destes isolados pela composição em proteína, cinza e minerais específicos.

Por meio do quadro 2 pode-se observar que o isolado clássico apresentou um teor de proteína de 82,5%, considerado excelente, se comparado ao do isolado contendo hexametáfosfato (73,2%), do isolado contendo cálcio (80,0%), do isolado aquecido (80,2%) e do isolado protéico da semente de moranga (59).

QUADRO 2 - Teores de proteína, de cinza e de minerais nos isolados protéicos de guandu

Isolado Componente	Teores (%)			
	Clássico	Cálcio	Hexametáfosfato	Aquecido
Proteína	82,50	80,00	73,20	80,20
Cinza	2,41	2,96	9,57	3,06
Fósforo	0,76	0,94	2,07	0,78
Cálcio	0,09	0,73	0,11	0,07
Magnésio	0,03	0,02	0,03	0,04
Potássio	0,37	0,32	0,85	0,90
Sódio	0,44	0,38	1,50	0,74

Conforme quadro 2 pode-se observar que a composição em termos de

cinza variou de 2,41 a 9,57%, fósforo de 0,76 a 2,07%, cálcio de 0,07 a 0,73%, potássio de 0,32 a 0,90% e sódio de 0,38 a 1,50%. Estas diferenças são devidas, principalmente, à utilização de hexametáfosfato de sódio como agente de agregação e de cloreto de cálcio como agente de solubilização.. WYATT & RONAN (98) verificaram o efeito do processamento nas proporções de sódio:potássio e de cálcio:fósforo em amendoim. Os teores de sódio e potássio encontrados no isolado aquecido foram relativamente elevados ao contrário do amendoim que sofreu perdas de potássio durante o processamento (98). O teor relativamente elevado de potássio no isolado contendo hexametáfosfato se deve, provavelmente, ao efeito sinérgico entre sódio e potássio.

#### 4.2.2. Composição em aminoácidos

Observa-se pelo quadro 3 que o isolado clássico e isolado contendo hexametáfosfato apresentaram, em relação ao isolado aquecido teores mais elevados em todos os aminoácidos. Com relação ao isolado contendo cálcio só não apresentam teor mais elevado de triptofano, que possui, dentre os aminoácidos, teor mais elevado de cistina, em relação ao isolado clássico.

Pode-se observar também pelo quadro 3 que o isolado clássico possui uma composição de aminoácidos muito semelhante ao do isolado contendo hexametáfosfato. Apresenta, no entanto, teor mais elevado de triptofano. Por outro lado, pode-se observar, que o isolado contendo cálcio possui uma composição muito semelhante ao do isolado aquecido.

A qualidade de uma proteína em termos químicos pode ser estimada pela sua composição em aminoácidos essenciais, em comparação com uma proteína tida como padrão, e desde 1955, a FAO desenhou uma proteína com esta característica. O padrão de referência de aminoácidos da FAO/WHO, 1973 foi elaborado com base numa proteína ideal constituída de aminoácidos em propor

QUADRO 3 - Teores de aminoácidos no isolado clássico, isolado contendo cálcio, isolado contendo hexametáfosfato e isolado aquecido

Aminoácido	grama de aminoácido/100 g de amostra			
	Clássico	Cálcio	Hexametáfosfato	Aquecido
Lisina	5,42	4,87	5,15	4,99
Histidina	2,88	2,52	2,81	2,61
Amônia	1,37	1,25	1,26	1,19
Arginina	5,44	5,00	5,06	5,02
Ác. aspártico	7,94	7,12	7,63	7,57
Treonina	2,74	2,63	2,72	2,61
Serina	4,20	3,82	4,04	4,00
Ác. glutâmico	13,45	12,16	12,78	12,93
Prolina	3,62	3,42	3,46	3,48
Glicina	2,68	2,63	2,59	2,54
Alanina	3,19	3,07	3,10	3,01
Cistina	0,56	0,57	0,58	0,56
Valina	3,14	3,06	2,98	3,05
Metionina	1,12	1,06	1,03	1,05
Isoleucina	2,89	2,72	2,73	2,78
Leucina	6,15	5,59	5,77	5,85
Tirosina	2,30	2,27	2,21	2,17
Fenilalanina	5,72	5,04	5,32	5,58
Triptofano	0,33	0,38	0,20	0,18



ções ótimas, pressupondo-se de que esta proteína tivesse uma utilização de 100% (56).

Pelo quadro 4 pode-se observar que o isolado clássico apresenta teores mais elevados de isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina + tirosina e valina. O isolado contendo hexametáfosfato mostra teores mais elevados de metionina + cistina e treonina. O isolado contendo cálcio só apresenta teor mais elevado de triptofano.

Da comparação de uma proteína com a padrão se estabelecem quais os primeiros limitantes, pelos aminoácidos mais deficientes em relação ao padrão. O "escore" químico é definido pela relação do primeiro aminoácido limitante com o padrão (29).

QUADRO 4 - Composição de aminoácidos essenciais do isolado clássico, do isolado contendo cálcio, do isolado contendo hexametáfosfato e do isolado aquecido, em comparação com a proteína padrão da FAO/WHO, 1973.

Aminoácido	mg de aminoácido/g de nitrogênio				FAO
	Clássico	Cálcio	Hexametáfosfato	Aquecido	
Isoleucina	245,0	231,2	242,5	228,1	250
Leucina	521,9	437,7	511,2	480,0	440
Lisina	460,0	413,1	456,2	409,4	340
Metionina + Cistina	142,5	138,7	143,1	132,5	220
Treonina	232,5	223,0	240,6	214,4	250
Triptofano	28,1	33,3	18,1	14,4	60
Fenilalanina + Tirosina	680,6	620,0	666,9	635,6	380
Valina	266,3	260,0	264,4	250,0	310

Pelo quadro 5 pode-se observar que o isolado contendo cálcio apresentou um escore de 55,5, considerado bom, se comparado ao do isolado aquecido (24,0), do isolado contendo hexametáfosfato (30,2), do isolado clássico (46,8), do glúten de trigo (31,5), do milho (49,1), do guandu (42,3) e considerado regular, se comparado ao do isolado protéico da semente de moranga (64,1), do feijão (54,1), da soja (73,6), da carne (101,0), do leite (94,5) e do ovo (125,2).

QUADRO 5 - Escore químico, aminoácidos limitantes e soma da porcentagem de aminoácidos essenciais (E/T%) dos isolados protéicos de guandu, do isolado protéico da semente de moranga (IPSM), do glúten de trigo, do guandu, do milho, do feijão, da soja, da carne, do leite, do ovo e do padrão FAO/WHO, 1973.

Material	Escore	1º Limitante	2º Limitante	3º Limitante	E/T%
Clássico	46,8	Trp	Met + Cys	Val	41,2
Cálcio	55,5	Trp	Met + Cys	Val	38,2
Hexametáfosfato	30,2	Trp	Met + Cys	Val	40,7
Aquecido	24,0	Trp	Met + Cys	Val	37,8
IPSM	64,1	Lys	Thr	-	45,0
Glúten de trigo	31,5	Lys	Thr	Val	31,9
Guandu*	42,3	Met + Cys	Trp	Val	35,9
Milho*	49,1	Lys	Trp	Thr	40,2
Feijão*	54,1	Met + Cys	Trp	Val	37,9
Soja*	73,6	Met + Cys	Thr	Val	39,4
Carne*	101,0	-	-	-	44,7
Leite*	94,5	Met + Cys	-	-	47,2
Ovo*	125,2	-	-	-	52,3
FAO/73	100,0	-	-	-	36,0

\* Fonte: FAO (27)

O quadro 5 nos permite verificar que nos isolados protéicos de guandu o escore é de: 1º limitante, triptofano; 2º limitante, metionina + cistina; 3º limitante, valina e isto dará para o isolado contendo cálcio



um escore de 55,5, ou seja, ele é 45% limitante em relação ao FAO/73. No isolado protéico da semente de moranga o escore é de: 1º limitante, lisina; 2º limitante, treonina. No glúten de trigo o escore é de: 1º limitante, lisina; 2º limitante, treonina; 3º limitante, valina. No guandu o escore é de: 1º limitante, metionina + cistina, 2º limitante, triptofano; 3º limitante, valina. No milho o escore é de: 1º limitante, lisina; 2º limitante, triptofano; 3º limitante, treonina. No feijão, o escore é de: 1º limitante, metionina + cistina; 2º limitante, triptofano; 3º limitante, valina. Na soja o escore é de: 1º limitante, metionina + cistina; 2º limitante, treonina; 3º limitante, valina. No leite o escore é de: metionina + cistina.

O padrão FAO/WHO, 1973 determina que a proteína ideal deve apresentar uma soma de aminoácidos essenciais (E/T%) igual a 36% (28, 56). Por meio do quadro 5 pode-se observar que a soma da porcentagem de aminoácidos essenciais (E/T%) dos isolados protéicos de guandu variou de 37,8 a 41,2, apresentando-se superior a do glúten de trigo (31,9), do guandu (35,9), do feijão (37,9), da soja (39,4), do milho (40,2) e inferior, a da carne (44,7), do IPSM (45,0), do leite (47,2) e do ovo (52,3).

De modo geral, a hidrólise ácida pode ser considerada como completa embora provoque a destruição total de triptofano e destruição parcial de cistina, serina e treonina por desaminação e também a desamidação completa de asparagina e glutamina (avaliados pelo teor de amônia). A ocorrência de baixos teores de cistina decorreu, provavelmente, da destruição do aminoácido durante a hidrólise ácida, uma vez que o mesmo não foi previamente oxidado com ácido perbórico (72). A hidrólise enzimática, por sua vez, foi considerada como incompleta rendendo peptídeos ao lado de aminoácidos. A ocorrência de baixos teores de triptofano se deve, provavelmente, à hidrólise incompleta da proteína e das impurezas do ácido acético em virtude da



reação de Hopkins-Cole conforme a técnica descrita por OPIENSKA-BLAUTH et alli (54). A hidrólise com ácido p-tolueno sulfônico 3N na qual não são sensíveis as perdas de triptofano (42), a reação com xanthidrol em meio clorídrico concentrado (23) e com p-dimetilamino-benzaldeído (79) constituem métodos alternativos para a determinação de triptofano.

#### 4.3 Análise eletroforética

Os resultados apresentados na figura 1 são relativos aos tratamentos dos isolados protéicos com duodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,2% e  $\beta$ -mercaptoetanol a 2%, mais aquecimento a 100°C durante cinco minutos. A concentração total de acrilamida foi igual a 12,5%.

Observam-se que todos isolados protéicos apresentaram seis bandas de pesos moleculares da ordem de 75.900, 58.600, 52.700, 37.000, 21.400, 16.200 daltons. Estes resultados levam a conclusão de que as frações de pesos moleculares de 58.600 e 52.700 sejam da fração 7 S do feijão (67). GOPA LA KRISHNA et alli (32) determinaram que a fração globulina do guandu era formada por nove subunidades com pesos moleculares próximos a 67.000, 45.000, 25.000, 17.800 e 12.400 daltons. A subunidade de maior peso molecular dos isolados protéicos, provavelmente, seja glicoproteína devido esta impedir a ligação de SDS à cadeia polipeptídica (15).

Por meio da figura 2 pode se visualizar a curva-padrão referente a mobilidade relativa versus o logaritmo do peso molecular da albumina de soro bovino, ovalbumina, quimotripsinogênio A e ribonuclease A.

Uma possível atuação dos agentes dissociantes seria que SDS forma complexos com as proteínas, minimizando as diferenças de carga e forma. O tratamento a 100°C por 2 minutos intensifica a ligação das cadeias

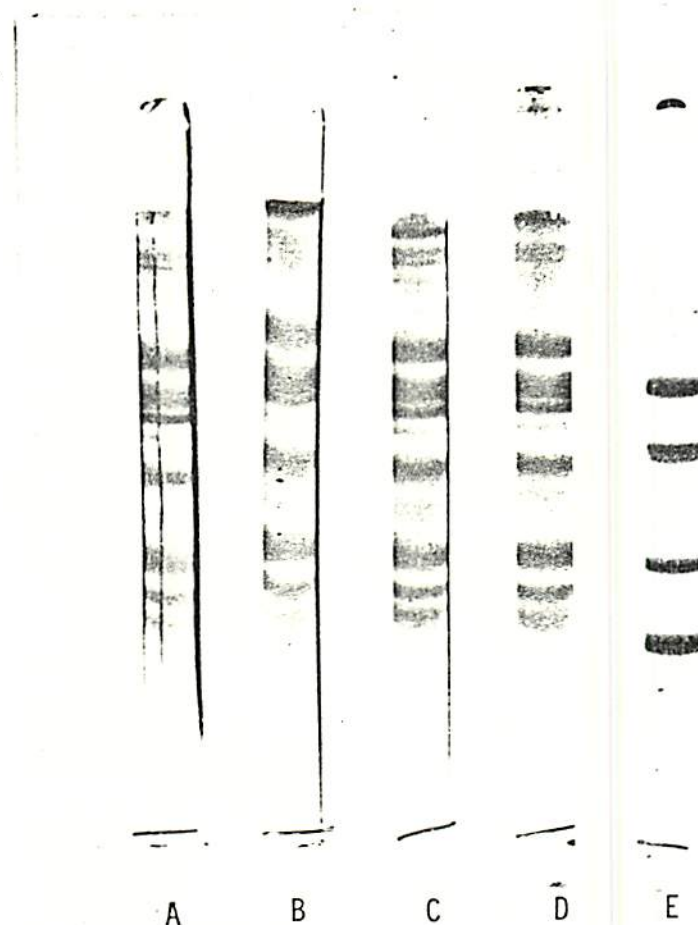


FIGURA 1 Subunidades constituintes da proteína de Isolados Protéicos de Guandu. Amostras aquecidas contendo SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol são mostradas em: A. Isolado Clássico, B. Isolado contendo Cálcio, C. Isolado contendo Hexametáfosfato, D. Isolado Aquecido, E. Padrões de Proteína. A concentração total de acrilamida foi igual a 12,5%.

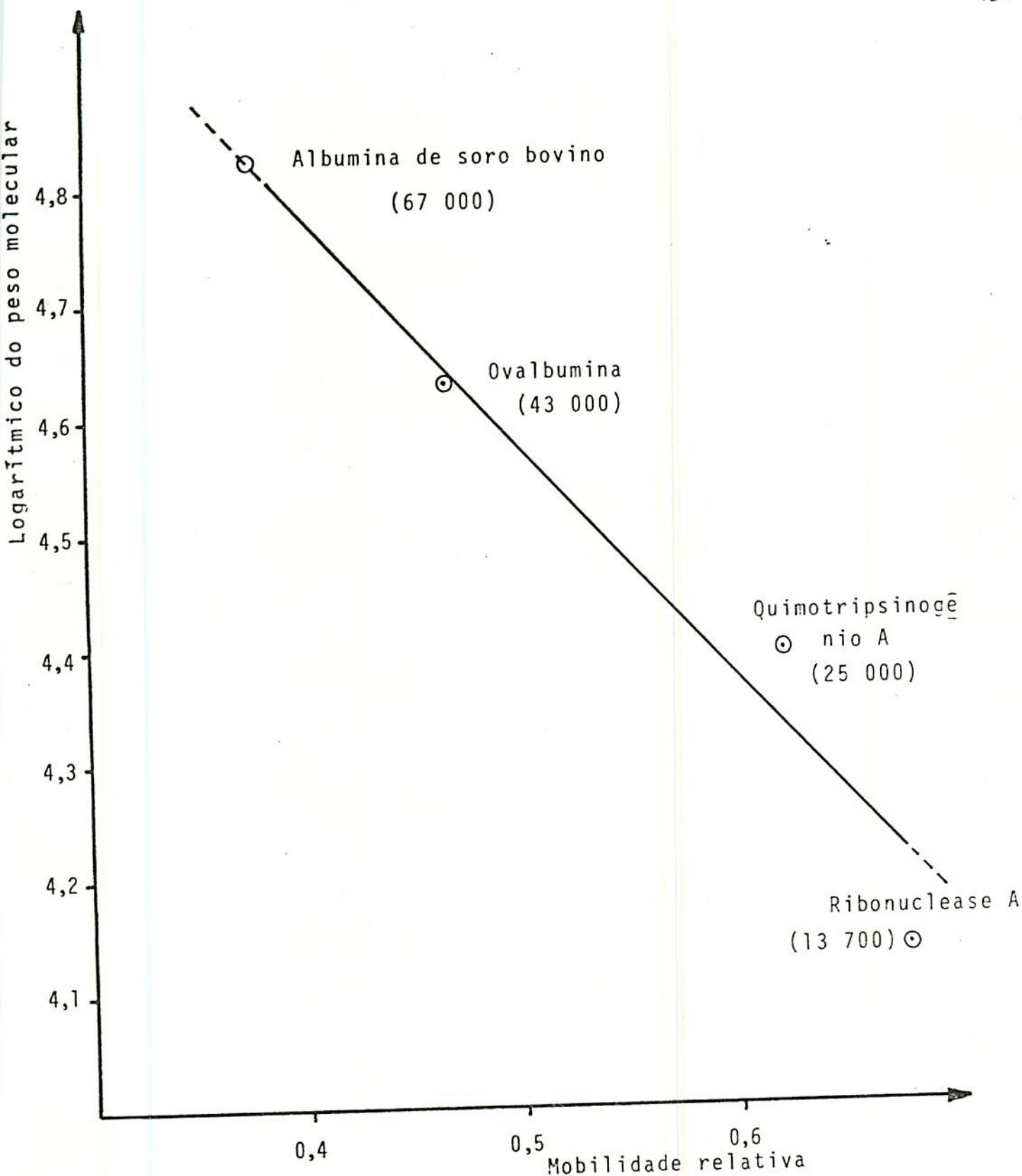


FIGURA 2 - Curva padrão para determinação do peso molecular dos polipeptídeos componentes de isolados protéicos de guandu. A concentração total de acrilamida foi igual a 12,5%.



apolares da proteína com os radicais duodecíl do detergente. SDS rompe as pontes de hidrogênio;  $\beta$ -mercaptoetanol, as ligações dissulfídricas; uréia, as ligações hidrofóbicas.

Pela figura 3 pode-se visualizar duas bandas proeminentes de pesos moleculares próximos a 67.000 daltons. A presença de várias outras bandas se deve, provavelmente, ao fato da proteína dissociar-se em suas subunidades e desenrolar-se completamente em cada cadeia polipeptídica devido a ação desnaturante de SDS combinado com uréia (1). Outro fator que influenciou neste aspecto foi o modelo eletroforético conduzido em que um gel de poliacrilamida com gradiente de concentração aumentou consideravelmente o poder de resolução. A concentração total de acrilamida variou de 10 a 18%.

O tratamento com SDS mais  $\beta$ -mercaptoetanol, da figura 4, apresentou seis bandas bem delineadas devido a redução das ligações dissulfídricas e o poder de resolução que o gel apresenta.

Pela figura 5 pode-se notar que os resultados obtidos não foram satisfatórios devido a difusão dos inibidores de tripsina no corante de revelação (30). Todavia, pôde se estimar o peso molecular destes inibidores como sendo igual a 25.400 daltons. A concentração total de acrilamida foi igual a 12,5%.

Pela figura 6 pode-se verificar um aumento vertiginoso do poder de resolução na separação dos inibidores de tripsina decorrente da utilização do gel em gradiente de concentração.

HARA et alli (33) afirmaram que a concentração de SDS utilizada influi sobremaneira na mobilidade e no número de bandas eletroforéticas, sendo necessário uma concentração de 0,5% para se conseguir uma boa dissociação e separação destas subunidades.

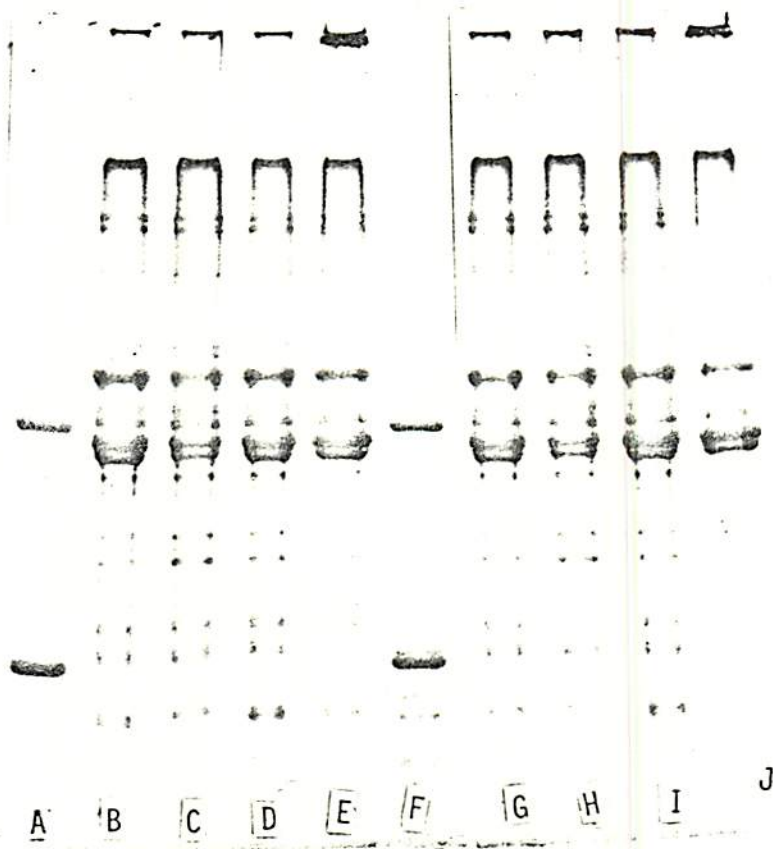


FIGURA 3 Subunidades constituintes da proteína de Isolados Protéicos de Guandu. Amostras aquecidas contendo SDS e uréia são mostradas em: A. Padrões de Proteína, B. Isolado Clássico, C. Isolado contendo Cálcio, D. Isolado contendo Hexametafosfato, E. Isolado Aquecido. Amostras sem aquecimento são mostradas em: F. Padrões de Proteína, G. Isolado Clássico, H. Isolado contendo Cálcio, I. Isolado contendo Hexametafosfato, J. Isolado Aquecido. A concentração total de acrilamida variou de 10 a 18%.



FIGURA 4 Subunidades constituintes da proteína de Isolados Protéicos de Guandu. Amostras aquecidas contendo SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol são mostradas em: A. Isolado Clássico, B. Isolado contendo Cálcio, C. Isolado contendo Hexametáfosfato, D. Isolado Aquecido. A concentração total de acrilamida variou de 10 a 18%.



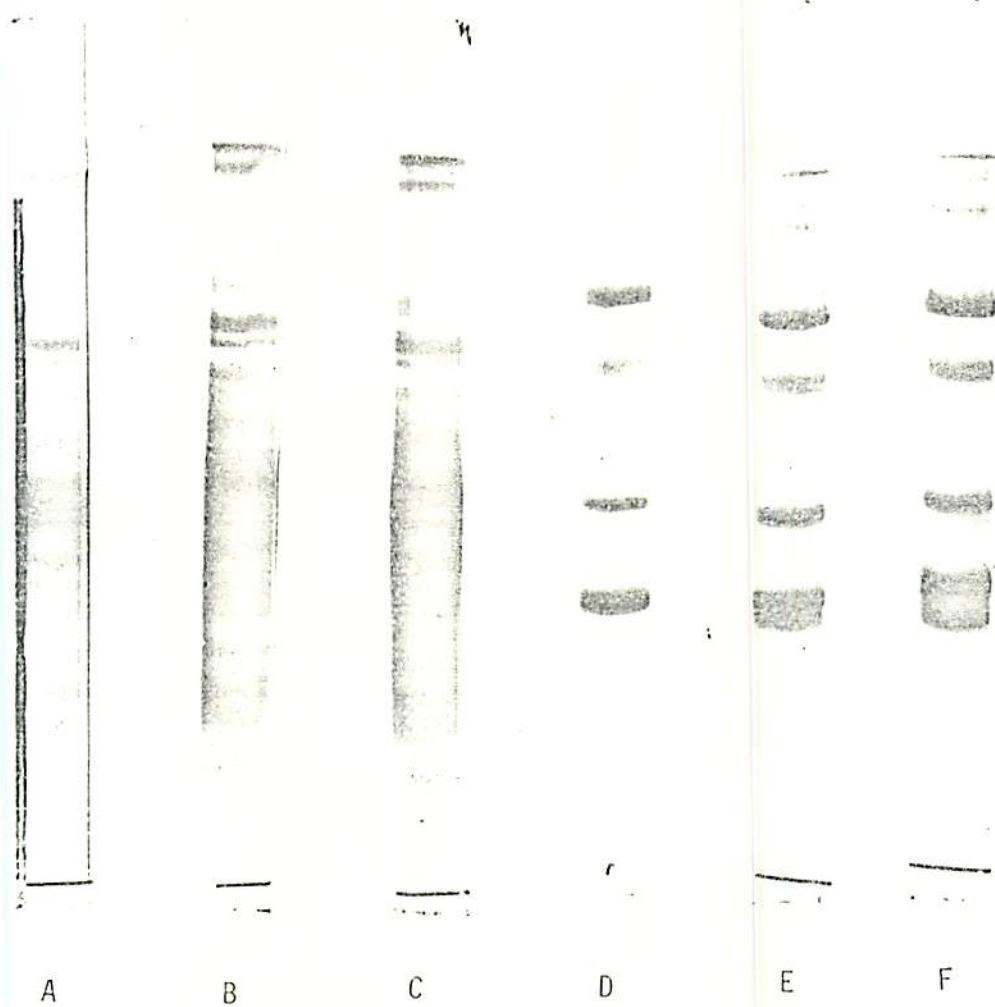


FIGURA 5 Inibidores de Tripsina componentes do Isolado Clássico. Amostras aquecidas contendo SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol são mostradas em: A, B, C. Padrões de Proteína são mostrados em: D, E, F. A concentração total de acrilamida foi igual a 12,5%.



FIGURA 6 Inibidores de Tripsina componentes do Isolado Clássico. Amostra aquecida contendo SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol foi aplicada em gel de poli(acrilamida) com concentração de acrilamida variando de 10 a 18%.

#### 4.4. Propriedades funcionais

##### 4.4.1. Solubilidade

A solubilidade pode ser considerada como uma das mais importantes propriedades funcionais de ingredientes protéicos, porque outras propriedades como a viscosidade, a geleificação, a espumalidade, a capacidade de emulsificação e a estabilidade da emulsão são diretamente dependentes da interação da proteína com a água (86). Operacionalmente, a solubilidade representa a porcentagem de proteína total retida no sobrenadante após a centrifugação de uma solução de proteína.

A figura 7 mostra graficamente os resultados das determinações dos índices de solubilidade do isolado clássico, variando-se o pH de 2,0 a 9,0 e em forças iônicas correspondentes a 0, 0,05, 0,1 e 1,0M de cloreto de sódio.

Observa-se em pH igual a 7,0 que o isolado clássico apresentou-se mais solúvel em força iônica de 0,05M de cloreto de sódio porque a presença de íons não comuns em baixa concentração decresce o valor do coeficiente de atividade dos íons protéicos, o que aumenta a concentração das proteínas em solução, a fim de satisfazer o seu produto de solubilidade.

Observa-se em força iônica 0, 0,05 e 0,1M de cloreto de sódio que as proteínas do isolado clássico apresentaram-se menos solúvel em pH 4,5 que é correspondente ao seu ponto isoeletrico porque, sendo nulas, neste pH, as suas cargas líquidas, não existem repulsões eletrostáticas intermoleculares, o que facilita a coalescência e precipitação das mesmas. Entretanto, em solução 1,0M de cloreto de sódio o isolado clássico foi mais solúvel na faixa de pH compreendida entre 4,0 e 6,0 porque íons não comuns em alta concentração ligam-se aos grupos positivos da proteína.



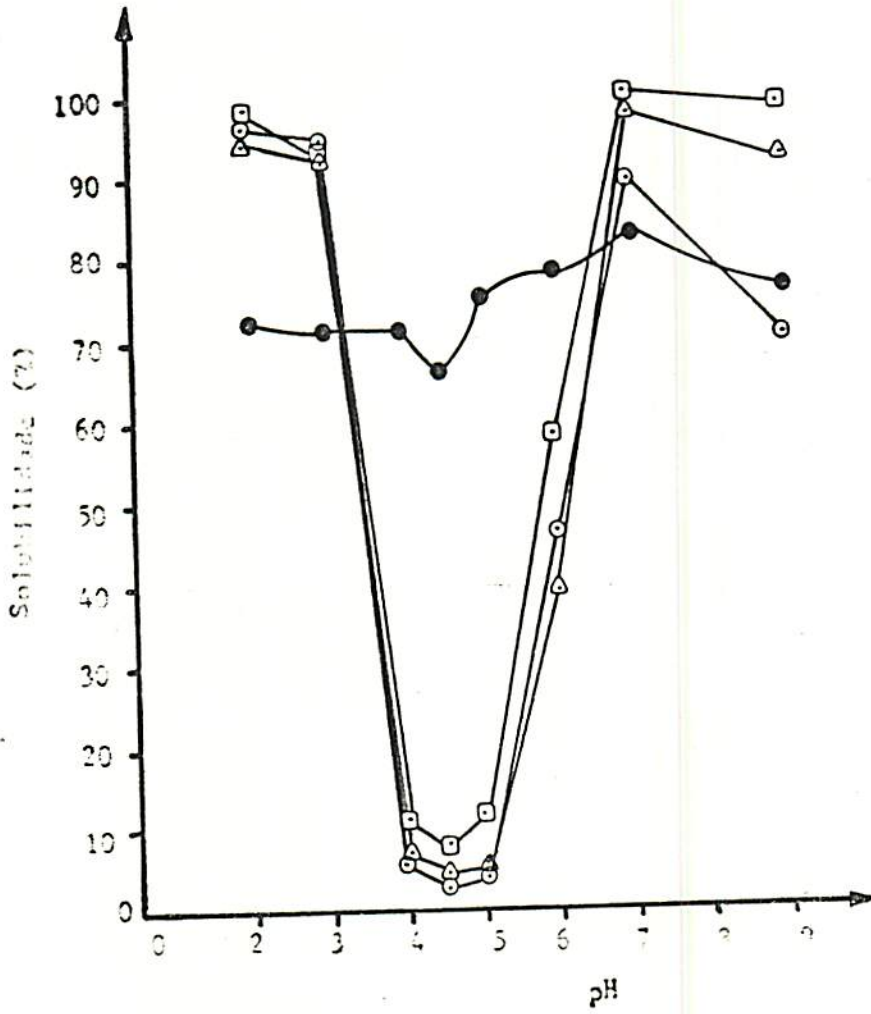


FIGURA 7 - Curvas de solubilidade versus pH do isolado clássico  
 H<sub>2</sub>O (○), 0,05 M NaCl (△), 0,1 M NaCl (□),  
 1 M NaCl (●)

De modo geral pode-se considerar que o comportamento da curva de solubilidade do isolado clássico, quando se varia o pH, é semelhante ao comportamento de isolados protéicos de outras leguminosas tais como a soja (34, 36, 46), do amendoim (47), do açafrão (10) e da semente de moranga (59).

Em face dos elevados índices de solubilidade apresentados em pH ácido pode-se afirmar que o isolado clássico possui características que possibilitam o seu aproveitamento na indústria de sucos e bebidas carbonatadas.

A figura 8 representa graficamente os índices de solubilidade do isolado contendo cálcio em diversos valores de pH e força iônica.

Observa-se que o isolado contendo cálcio foi mais solúvel em solução aquosa do que em soluções a 0,05, 0,1 e 1,0M de cloreto de sódio. Em solução aquosa, os íons de cálcio se ligam aos grupos positivos da proteína promovendo efeitos protetores no meio (34). Acima de um certo valor da concentração salina, ocorre um decréscimo na solubilidade da proteína, provavelmente, em função da competição entre os íons e as moléculas protéicas pela  $H_2O$  de solvatação. Isto causa o decréscimo na repulsão entre as moléculas de proteínas, agregação das mesmas e precipitação.

Pela figura 9 pode-se verificar que o isolado contendo hexametáfosfato foi completamente insolúvel em água e em soluções de cloreto de sódio a 0,05 e 0,1M na faixa de pH compreendida entre 2,0 e 5,0. Isto se deve, provavelmente, a forças de atração originadas em meio ácido, entre grupos positivos da proteína e grupos fortemente aniônicos de hexametáfosfato (30). Todavia, em concentração de 1,0M de cloreto de sódio, a solubilidade aumenta devido a ligação de íons de sódio à proteína, minimizando as interações proteína-hexametáfosfato.

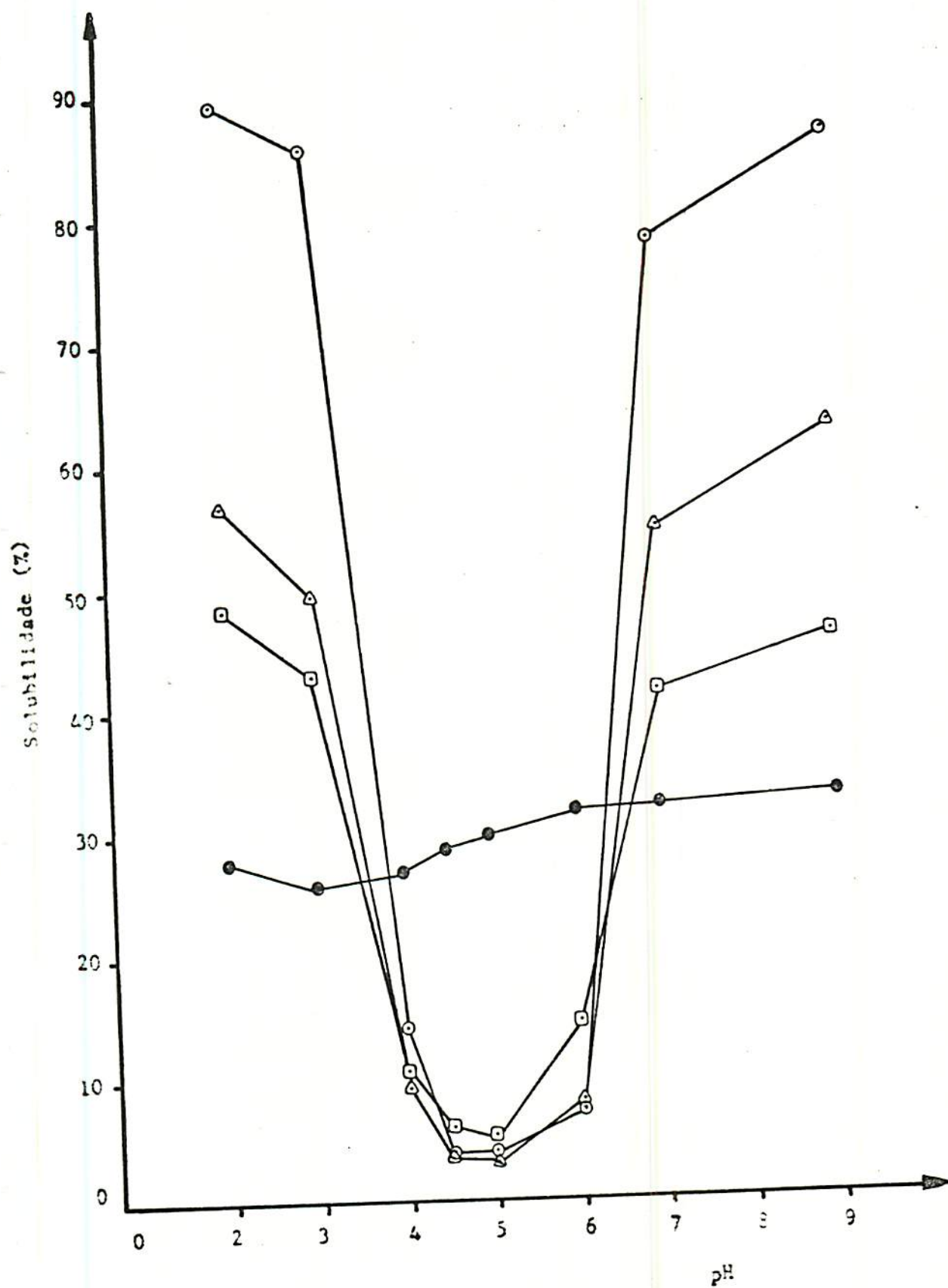


FIGURA 8 - Curvas de solubilidade versus pH do isolado contendo cálcio. H<sub>2</sub>O (○), 0,05 M NaCl (△), 0,1 M NaCl (□), 1 M NaCl (●).



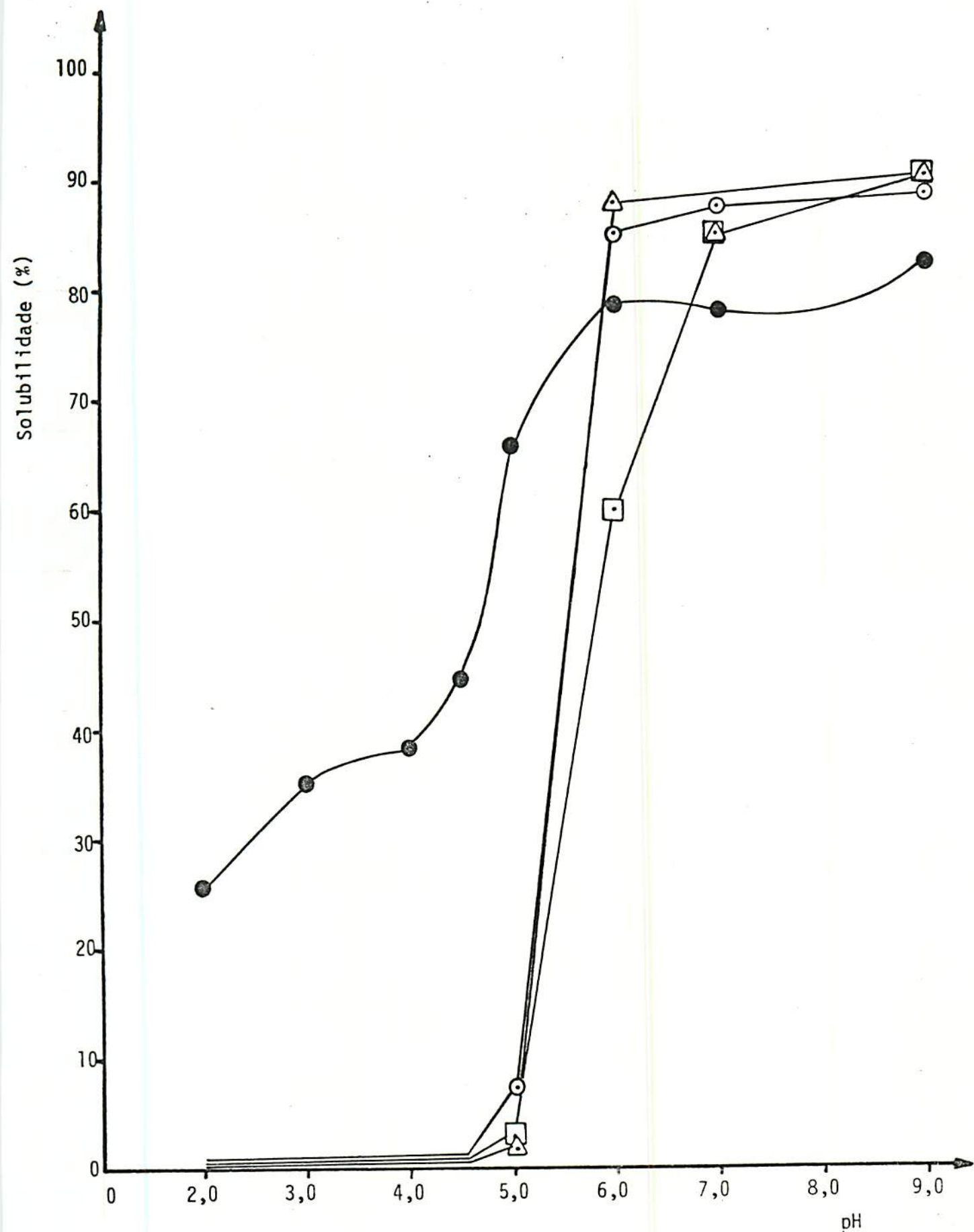


FIGURA 9 - Curvas de solubilidade versus pH do isolado proteico contendo hexametáfosfato de sódio.  $H_2O$  (○), 0,05 M NaCl (△), 0,1 M NaCl (□) e 1 M NaCl (●).

Em pH 6,0 e força iônica de 0,05 e 0,1M de cloreto de sódio, pode se verificar que o isolado contendo hexametáfosfato atingiu solubilidade quase máxima devido a ligação de grupos aniônicos de fosfato às cadeias polipeptídicas (82). Em meio básico, a solubilidade foi ainda maior devido o aumento da eletronegatividade líquida. Em força iônica de 1,0M de cloreto de sódio, a solubilidade atingiu o índice de 83,1%.

A curva de solubilidade do isolado contendo hexametáfosfato apresenta, dentro de certos limites, semelhante à do concentrado protéico de tremoço (68).

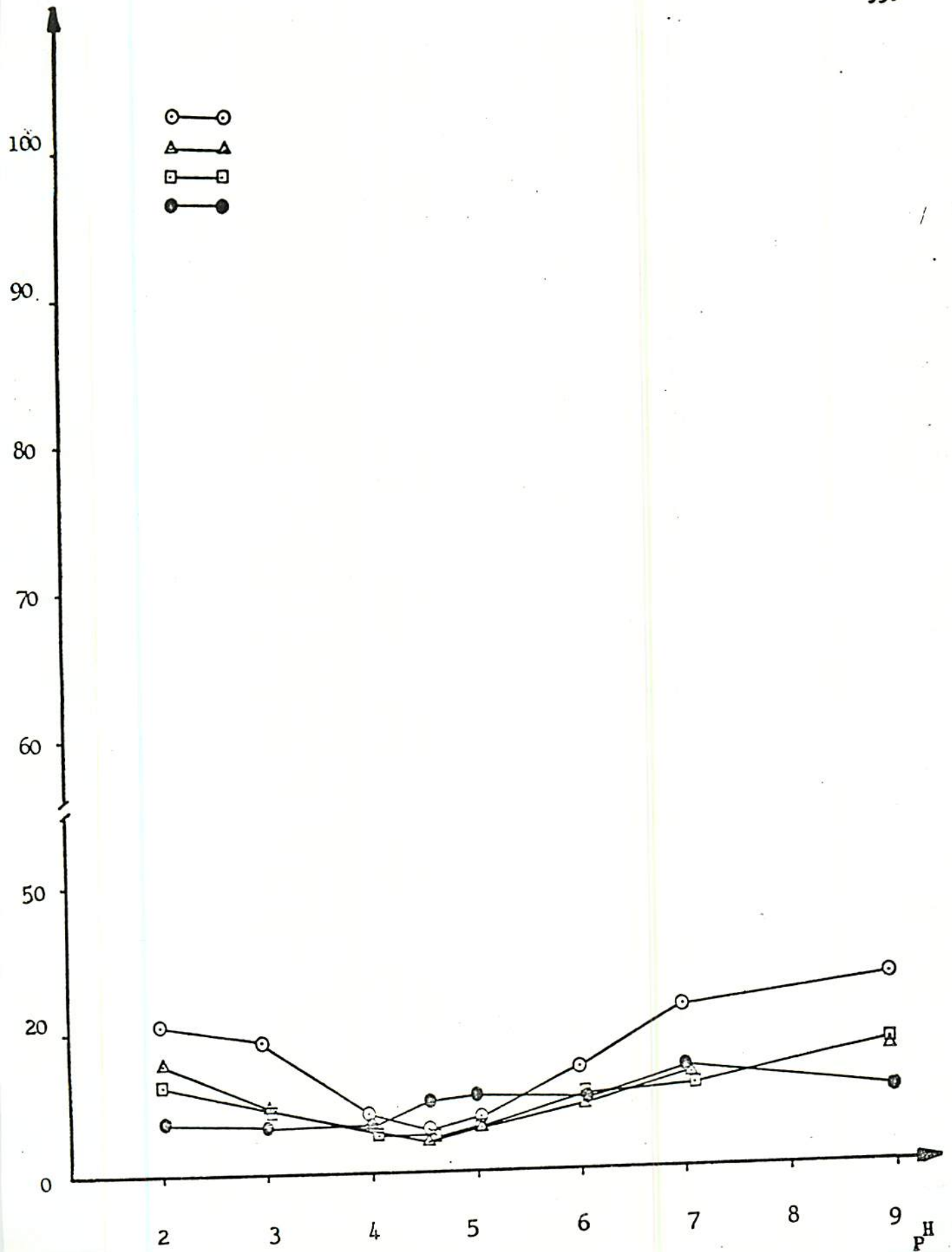
Da figura 10 pode-se visualizar que o isolado aquecido apresentou índices de solubilidade versus pH e força iônica variando de 2,5 a 13,2%. Isto se deve, provavelmente, à ocorrência de um processo de desnaturação até um ponto de coagulação das moléculas de proteínas (30).

#### 4.4.2. Capacidade de emulsificação

A habilidade das proteínas formarem emulsões com óleos e gorduras em sistemas alimentícios é extremamente importante quando da sua aplicação em produtos cárneos, maionese e coberturas de saladas. A capacidade de formar emulsões de uma proteína depende da diminuição da tensão interfacial dos componentes hidrofílicos e hidrofóbicos dos alimentos (40).

A figura 11 representa graficamente os resultados das determinações da capacidade de emulsificação dos quatro isolados protéicos de guandu, em valores de pH variando de 4,0 a 7,0 e concentração iônica a 0,2M de cloreto de sódio.

Observa-se que o isolado clássico e isolado contendo cálcio apresentam maiores índices de capacidade de emulsificação do que o isolado contendo



JRA 10 - Curvas de solubilidade versus pH do isolado aquecido. H<sub>2</sub>O (○), 0,05 M NaCl (△), 0,1 M NaCl (□), 1 M NaCl (●).



CAPACIDADE DE EMULSIFICAÇÃO ( g ÓLEO/mg PROTEÍNA )

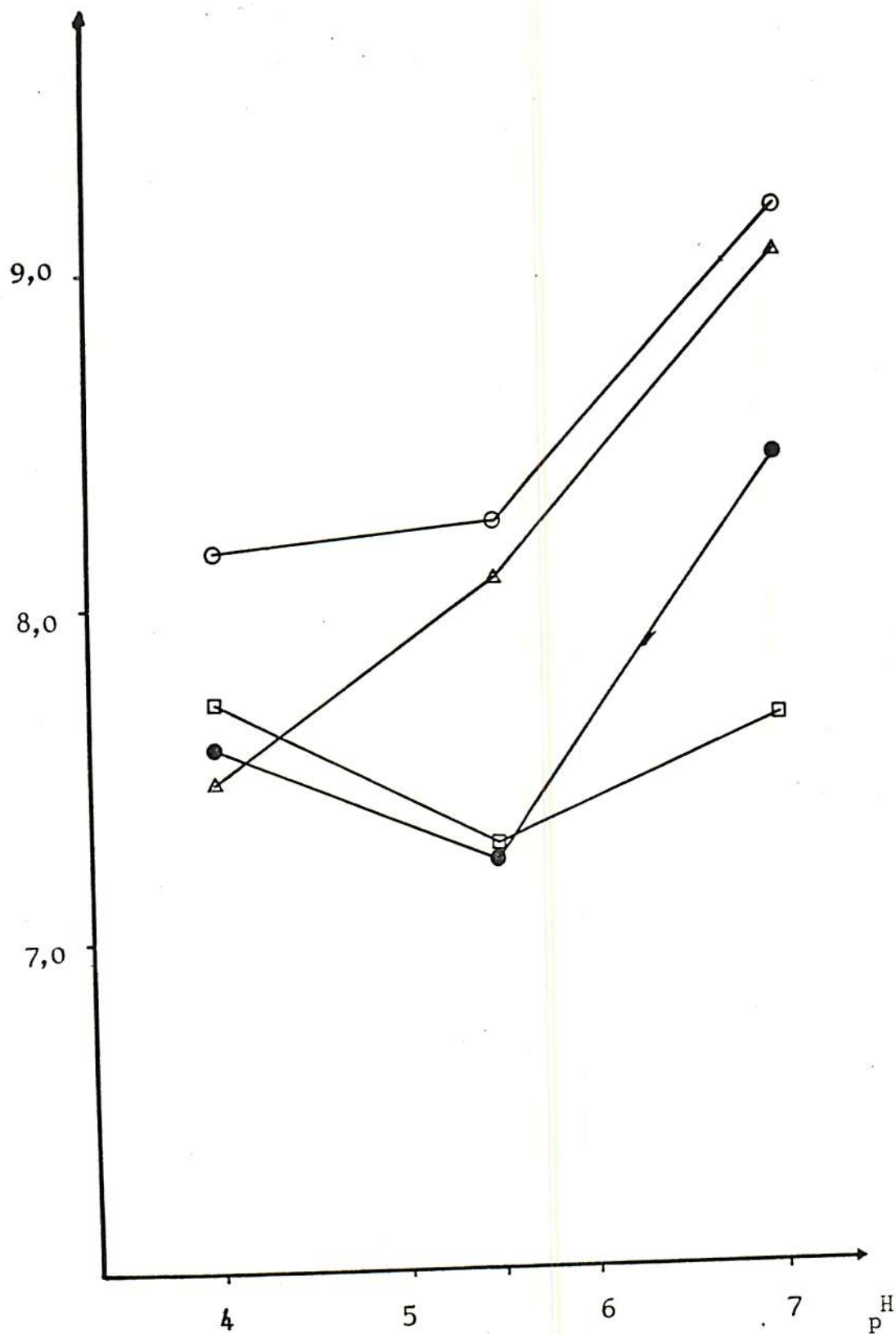


FIGURA 11 - Curvas de capacidade de emulsificação versus pH. Isolado clássico (○), Isolado contendo cálcio (△), Isolado contendo hexametáfosfato (□), Isolado aquecido (●).

hexametáfosfato e isolado aquecido exceto em pH 4,0 em que o isolado contendo cálcio apresentou menor índice de capacidade de emulsificação do que os demais isolados.

A capacidade de emulsificação de isolados protéicos de guandu em pH 7,0 e força iônica de 0,2M de cloreto de sódio quando dez miligramas de proteína foram capazes de emulsionar até 92,1 gramas de óleo é notadamente superior a dos isolados protéicos da soja (36), do feijão (70), da aveia (96), da alfafa (91) e da semente de moranga (59).

A figura 12 apresenta o sistema utilizado para a determinação da capacidade de emulsificação cuja medida é baseada no princípio de que a resistência elétrica do meio aumenta vertiginosamente quando há inversão da fase contínua.

#### 4.5. Análise antinutricional

##### 4.5.1. Atividade ureática

Em 1926, SUMNER cristalizou a enzima urease do feijão de porco, identificando-a, sem sombra de dúvida, como uma proteína. Foi a primeira enzima a ser isolada. Ocorre em alta concentração em grãos, particularmente, na soja e feijão de porco (Canavalia ensiformis L. D.C.).

A atividade ureática referente à inativação de fatores antinutricionais foi estabelecida por MCNAUGHTON (45) como o índice correspondente à mudança de pH de 0,15.

Pelo quadro 6 pode-se verificar que a atividade ureática do isolado aquecido (0,12) foi relativamente menor que a do isolado contendo cálcio (0,63), do isolado contendo hexametáfosfato (2,15) e do isolado clássico (2,31). Esta diferença se deve, principalmente, à variação nos processos de

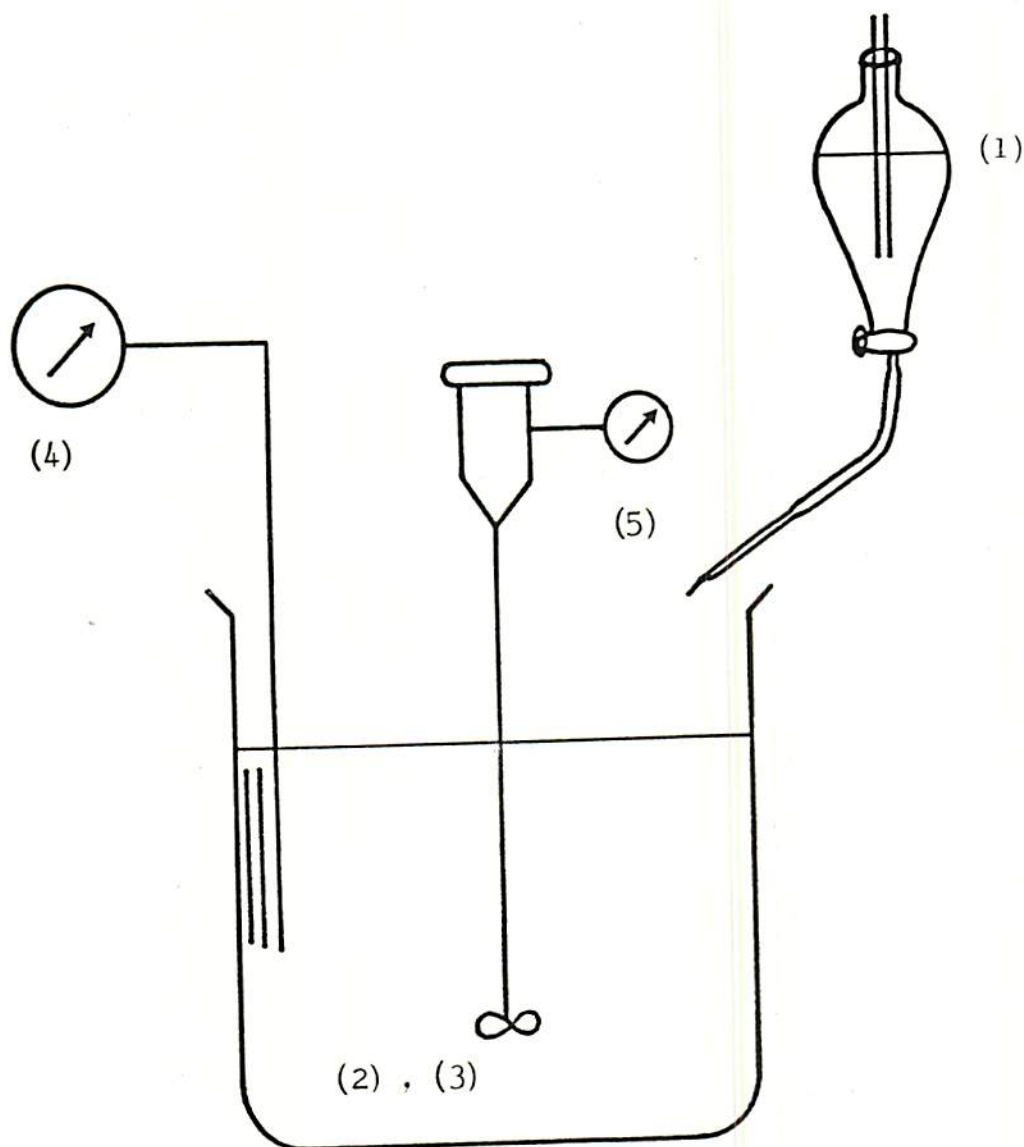


FIGURA 12 - Sistema utilizado para a determinação da capacidade de emulsificação. Reservatório de óleo (1), 100 ml de solução NaCl 0,2 M (2), Isolado contendo 10 mg de proteína (3), Ohrimetro (4), Agitador mecânico com rotação em r.p.m. (5), Cronômetro.



QUADRO 6 - Atividade ureática do isolado clássico, do isolado contendo cálcio, do isolado contendo hexametáfosfato e do isolado aquecido.

Isolado Protéico	Atividade Ureática
Isolado clássico	2,31
Isolado contendo cálcio	0,62
Isolado contendo hexametáfosfato	2,15
Isolado aquecido	0,12

obtenção dos isolados protéicos a qual promoveu a inativação total de urease do isolado aquecido, inativação parcial do isolado contendo cálcio e não inativação do isolado clássico e do isolado contendo hexametáfosfato.

Observa-se que o isolado aquecido apresentou um índice de atividade ureática inferior a 0,15, o que está de acordo com BAKER & MUSTAKAS que observaram para a soja, a inativação total da urease durante a aquecimento a 90°C (7). O isolado contendo cálcio, por sua vez, apresentou um índice próximo ao da tolerância, podendo-se concluir que a urease ficou no sobrenadante durante a etapa de precipitação isoeletrica das proteínas. Os demais isolados apresentaram precipitação virtualmente completa desta enzima.

#### 4.5.2. Atividade antitriptica

Os inibidores proteolíticos isolados de diversos grãos quando incluídos em dietas se não causam inibição completa do crescimento no animal experimental, retardam o mesmo. Foram READ HAAS, em 1933, os primeiros a reconhecerem a presença de inibidores de tripsina em material vegetal, sendo relatada a inibição da capacidade de tripsina em liquefazer a gelatina quan

do na presença de extrato aquoso de soja. Esta fração responsável por este efeito foi isolada e cristalizada por KUNITZ a partir da proteína da farinha de soja crua.

Do quadro 7 pode-se observar que a atividade antitriptica do isolado contendo cálcio (16,13) foi relativamente menor que a do isolado aquecido (24,17), do isolado clássico (26,10) e do isolado contendo hexametafosfato (47,16). Esta diferença se deve, provavelmente, à variação na recuperação de proteínas durante a etapa de precipitação isoeletrica na obtenção dos isolados protéicos.

QUADRO 7 - Atividade antitriptica do isolado clássico, do isolado contendo cálcio, do isolado contendo hexametafosfato e do isolado aquecido.

Isolado Protéico	Atividade Antitriptica
Isolado clássico	26,10
Isolado contendo cálcio	16,13
Isolado contendo hexametafosfato	47,16
Isolado aquecido	24,17

Observa-se para o isolado aquecido que o aquecimento utilizado não foi suficiente para reduzir substancialmente o nível dos inibidores de tripsina. BAKER & MUSTAKAS (7) observaram o primeiro decréscimo destes inibidores na soja à temperatura de 92°C. Para efeitos comparativos, presume-se que os inibidores foram totalmente solúveis quando da precipitação do isolado contendo cálcio, parcialmente solúveis na do isolado clássico e do isolado aquecido e insolúvel na do isolado contendo hexametafos

fato. Comparando-se os índices de atividade antitriptica dos isolados protéicos de guandu que variaram de 16,13 a 47,16, com diversas variedades de soja, estudadas por PORTELA (61), cujos índices variaram de 280,9 a 627,2, pode-se verificar que os teores de inibidores de tripsina de isolados protéicos de guandu são significativamente inferiores aos da soja.

Os cálculos relativos à determinação da atividade antitriptica dos quatro isolados protéicos de guandu estão apresentados nos quadros de 3A a 6A do apêndice. Uma unidade de tripsina livre foi arbitrariamente definida como um incremento de 0,01 unidade de absorvância, sob as condições do teste.

#### 4.5.3. Isolamento de inibidores de tripsina

Por meio da figura 13 pode-se observar a separação cromatográfica dos inibidores de tripsina quando aplicou-se 0,825 gramas de proteína através de uma coluna de afinidade. O pico representativo da fração de inibidores, está localizado à direita da seta. O extrato liofilizado desta fração, representou aproximadamente, 0,2% da proteína do isolado clássico. Na soja, é sabido, que os inibidores proteolíticos representam por volta, de 6% da proteína dos quais a maioria são inibidores de tripsina. Nos isolados protéicos de guandu, estes fatores estão presentes em baixa concentração.

A separação cromatográfica dos inibidores foi considerada, qualitativamente, excelente e, quantitativamente, regular devido à necessidade da aplicação de maiores quantidades de amostra.



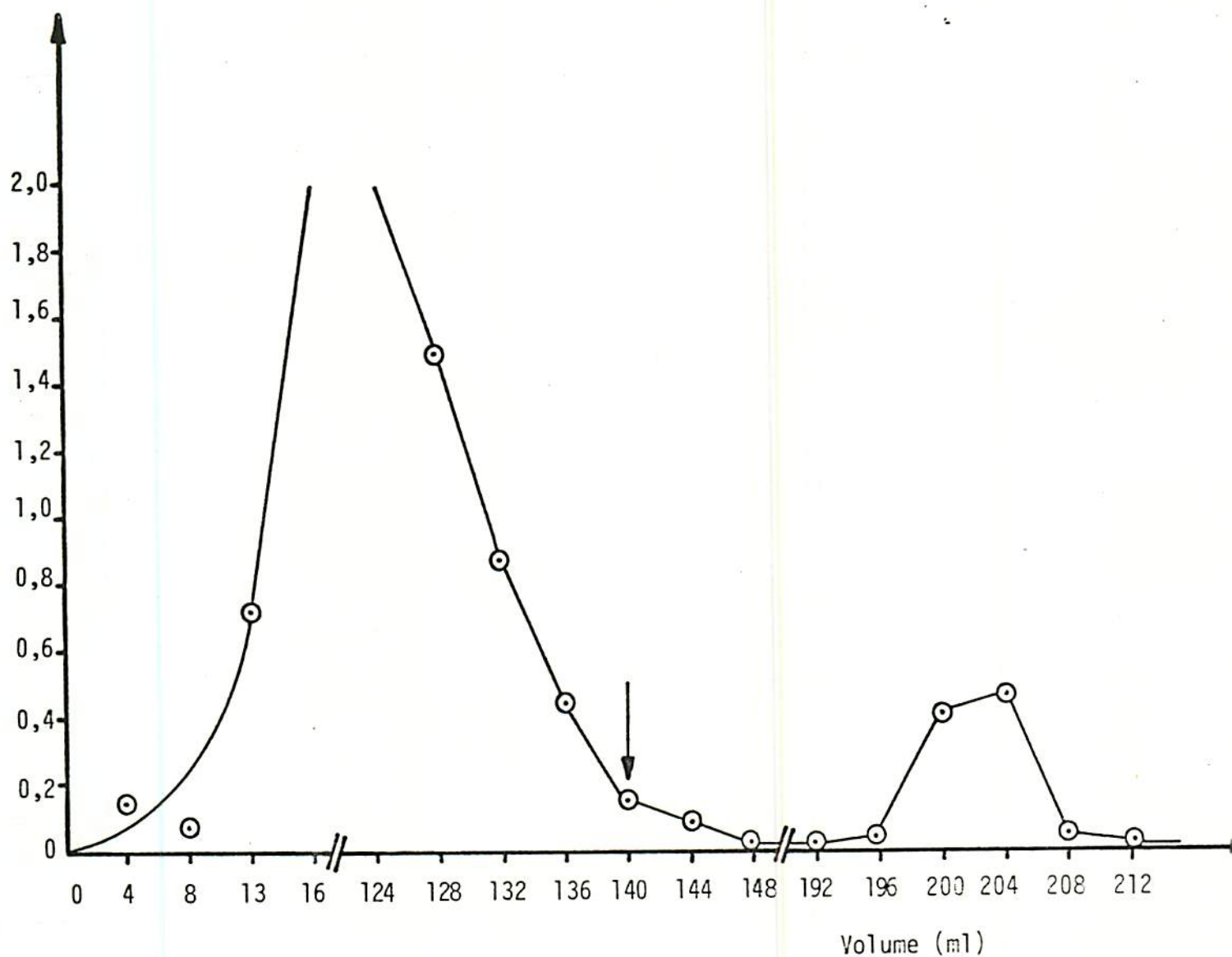


FIGURA 13 - Separação cromatográfica do inibidor de tripsina de guar  
 Coluna: agarose-tripsina. Amostra: solução a 1% do isolado  
 clássico. Seta: troca de tampão TRIS pH 8 para TRIS pH 2