

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

Isolamento, fracionamento e caracterização parcial das proteínas de
amêndoas de Baru (*Dipteryx alata* Vog.).

Kézia Soares da Cruz

Orientador: Prof. Dr. Valdir Augusto Neves

Araraquara

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

Isolamento, fracionamento e caracterização parcial das proteínas de
amêndoas de Baru (*Dipteryx alata* Vog.).

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Nutricionais

Kézia Soares da Cruz

Orientador: Prof. Dr. Valdir Augusto Neves

Araraquara

2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C957i Cruz, Kézia Soares da
Isolamento, fracionamento e caracterização parcial das proteínas de
amêndoas de Baru (*Dipteryx alata* Vog.). / Kézia Soares da Cruz. –
Araraquara, 2010
103 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: Valdir Augusto Neves

. 1. *Dipteryx alata* Vog. 2. Proteínas. 3. Fracionamento. 4. Digestibilidade
in vitro. I. Neves, Valdir Augusto, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

KÉZIA SOARES DA CRUZ

ISOLAMENTO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL
DAS PROTEÍNAS DE AMÊNDIAS DE BARU (*Dipteryx alata*).

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Valdir Augusto Neves
(Orientador)

Prof. Dr. Osvaldo de Freitas
(Membro Titular)

Prof. Dr. José Paschoal Batistuti
(Membro Titular)

Prof^a. Dr^a. Aureluce Demonte
(Membro Suplente)

Prof. Dr. Jonas Contiero
(Membro Suplente)

Araraquara, 09 de novembro de 2010.

Resumo

O baru (*Dipteryx alata* Vog.), fruta nativa do Cerrado brasileiro, apresenta uma amêndoa com alto teor de proteínas, entretanto, informações sobre suas propriedades são ainda escassas. O objetivo do trabalho foi caracterizar algumas das propriedades físico-químicas da proteína dessa semente. Percentuais de 74,13; 81,56 e 76,50 de proteínas foram solubilizadas frente às diferentes proporções massa:volume 1:10, 1:30 e 1:50, respectivamente. Em relação aos tempos 30, 60 e 90 minutos de extração solubilizaram-se 78,59, 80,45 e 73,74% das proteínas totais, respectivamente. Frente às modificações de pH e concentração de NaCl, verificou-se um comportamento típico da predominância de globulinas, caracterizado por máxima solubilidade em pHs 2,0 (87,9%) e acima de 8,0 (89,87%) e mínima solubilidade (8,5%) em pH 4,5, em água, e aumento junto ao ponto isoelétrico associado a crescente concentração salina no meio extrator. O fracionamento pelo critério de solubilidade em diferentes sistemas revelou teores de 13,97% de albuminas; 61,74% de globulinas, 0,48% de prolaminas, 3,25% de glutelinas e 4,61% de proteínas insolúveis. A digestibilidade *in vitro*, determinada pela sequência enzimática pepsina-pancreatina, mostrou 85,59% e 90,54% de hidrólise em relação à caseína para a farinha desengordurada e a globulina total da amêndoa, respectivamente. A proteólise da globulina majoritária obtida em Sephadex G-200, pelas enzimas tripsina, quimotripsina e pepsina, separadamente, mostrou percentuais de hidrólise, em relação à caseína, de 62,38, 17,92 e 71,38, respectivamente, após 120 minutos de incubação, sendo o progresso das proteólises acompanhados em SDS-PAGE. O perfil cromatográfico em colunas de filtração em gel mostrou a existência de uma forma protéica majoritária na fração globulina total que, em coluna de troca-iônica de DEAE-celulose, foi eluída em concentração próxima a 0,12 M de NaCl. O peso molecular (PM) da globulina majoritaria foi estimado em 405-436 kDa e seu perfil eletroforético revelou 3 bandas principais de PM 62-64, 66 e 73-76 kDa e, em condições redutoras, originaram-se bandas entre 42-44 e 20-22 kDa, além da permanência de banda minoritária em 66 kDa. Tais características observadas indicam que a fração globulina da amêndoa seria composta predominantemente por uma globulina do tipo 11S.

Palavras-chave: *Dipteryx alata* Vog., baru, proteínas, fracionamento, digestibilidade *in vitro*

Abstract

The Baru (*Dipteryx alata* Vog.), a fruit native to the Brazilian Cerrado, has a seed with a high protein content, however, informations about its properties remain scarce. The aim of this study was to characterize some of the physicochemical properties of this seed protein. Protein percentage of 74.13, 81.56 and 76.50 were solubilized using the mass:volume ratios 1:10, 1:30 and 1:50, respectively. During the extraction times 30, 60 and 90 minutes were solubilized 78.59, 80.45 and 73.74% of total proteins, respectively. Changes in pH and salt concentration revealed a typical behavior of globulin predominance, characterized by greater solubility at pH 2.0 (87.9%) and above 8.0 (89.87%) and lower solubility (8.5%) at pH 4.5 in water, and solubility improvement near the isoelectric pH by increasing salt concentration in the extractant. Fractionation according to protein solubility in different solvents showed 13.97, 61.74, 0.48, 3.25 and 4.61 percent of albumin, globulin, prolamin, glutelin and insoluble protein, respectively. The *in vitro* digestibility determined by pepsin-pancreatin enzymatic sequence showed 85.59% and 90.54% of hydrolysis, in relation to casein, for the defatted flour and total globulin from baru seed, respectively. After 120 minutes of incubation, proteolysis of the major globulin obtained from Sephadex G-200 by trypsin, chymotrypsin and pepsin, separately, showed hydrolysis percentages, in relation to casein, of 62.38, 17.92 and 71.38, respectively, and the progress of these proteolysis was monitored by SDS-PAGE. The chromatographic profile in gel filtration columns revealed the existence of one major protein form in total globulin, which was eluted off the DEAE-celulose ion-exchange column at 0.12 M NaCl concentration. The molecular weight (MW) of globulin was estimated at 405-436 kDa and its electrophoretic profile showed three main bands of MW 62-64, 66 and 73-76 kDa, and in reducing conditions originated bands between 42-44 and 20-22 kDa, besides the presence of a minor band at 66 kDa. These observed characteristics indicate the seed globulin would be predominantly composed for one type of 11S globulin.

Key-words: *Dipteryx alata* Vog., baru; proteins; fractionation; *in vitro* digestibility

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I: Isolamento, fracionamento e caracterização parcial das proteínas de amêndoas de Baru (*Dipteryx alata* Vog.)

Figura 1: Fruto do Barueiro (<i>Dipteryx alata</i> Vog.).....	16
Figura 2: Procedimento de extração e isolamento das frações protéicas da farinha de amêndoa de baru.....	32
Figura 3: Efeito do pH e Concentração de NaCl na solubilidade das proteínas da farinha de amêndoa de baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) desengordurada.....	44
Figura 4: Eletroforese das proteínas nativas em gel de poliacrilamida em condições não-dissociantes.....	49
Figura 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol (A) e com SDS (B) das proteínas da farinha de amêndoa de Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) desengordurada.....	50
Figura 6: Determinação de Ponto Isoelétrico da fração globulina da amêndoa de Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.), extraída, isolada e solubilizada em solução de NaCl 0,2 M: turbidez (320 nm) e Percentual de globulina solúvel em diferentes pHs.....	54
Figura 7: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS das globulinas precipitadas em diferentes pHs.....	55
Figura 8: Perfil cromatográfico da fração globulina total da amêndoa de Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.), em coluna de Sepharose CL-6B (100 x 2,5 cm).....	56
Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol (A) e com SDS (B) do picos majoritário eluído em coluna de Sepharose CL-6B.....	57
Figura 10: Perfil cromatográfico da fração globulina total da amêndoa de Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.), em coluna de Sephacryl S-300 HR (80 x 2,0 cm).....	58
Figura 11: Eletroforese das proteínas nativas em gel de poliacrilamida em condições não-dissociantes.....	58
Figura 12: Estimativa de Peso Molecular (PM) da globulina de amêndoa de Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) em coluna de Sephacryl S-300 HR (80 x 2,0 cm).....	59

Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol (A) e com SDS (B) dos picos eluídos em coluna de Sephacryl S-300 HR.....	60
Figura 14: Perfil cromatográfico da fração globulina total da amêndoa de Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.), em coluna de Sephadex G-200 (50 x 2,5 cm).....	61
Figura 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (A) e com SDS e β -mercaptoetanol (B) dos picos eluídos em coluna de Sephadex G-200.....	62
Figura 16: Perfil cromatográfico da fração globulina total da amêndoa de Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.), em coluna de Dietilaminoetil-celulose (18x1,5cm).....	64
Figura 17: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (A) e com SDS e β -mercaptoetanol (B) do pico eluído em coluna de DEAE-celulose.....	65
Figura 18: Percentual de hidrólise da Globulina Majoritária da amêndoa de Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog., GMB) e Caseína, frente a ação das enzimas Tripsina (A), Quimotripsina (B) e Pepsina (C) em diferentes tempos de hidrólise.....	68
Figura 19: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol dos produtos de diferentes tempos de hidrólise da globulina majoritária da amêndoa de Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) com a Tripsina (A), Quimotripsina (B) e Pepsina (C).....	71

CAPÍTULO II: Partial characterization of proteins from baru (*Dipteryx alata* Vog) seeds

Figure 1: Effect of pH and NaCl concentration in the baru flour protein solubility...	92
Figure 2: Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of the protein fractions from baru seed.....	94
Figure 3: (A) Determination of Isoelectric Point (IP) of the baru total globulin solubilized in 0.2 M NaCl solution; (B) SDS-PAGE of total globulins in the range of isoelectric pH.....	97
Figure 4: Chromatographic profile of the baru total globulin fraction on Sepharose CL-6B (100 x 2.5 cm).....	98
Figure 5: (A) Chromatographic profile of the baru total globulin fraction in a Diethylaminoethyl-cellulose column (18 x 1.5 cm); (B) SDS-PAGE with (+ ME) and without (- ME) β -mercaptoethanol of the chromatographic peak.....	99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: Isolamento, fracionamento e caracterização parcial das proteínas de amêndoas de Baru (*Dipteryx alata* Vog.)

Tabela 1: Composição em aminoácidos (g/16g de N) da polpa e da semente (amêndoa) de baru.....	19
Tabela 2: Composição centesimal das farinhas de amêndoa de baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) integral e desengordurada.....	41
Tabela 3: Efeito da proporção massa:volume (M:V) na solubilidade das proteínas da farinha de amêndoa de baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) desengordurada.....	43
Tabela 4: Efeito do tempo de extração na solubilidade das proteínas da farinha de amêndoa de baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) desengordurada.....	43
Tabela 5: Composição das frações protéicas da farinha de amêndoa de baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) desengordurada.....	46
Tabela 6: Digestibilidade <i>in vitro</i> da farinha desengordurada e da fração globulina total da amêndoa de baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.).....	51
Tabela 7: Percentual de hidrólise da Globulina Majoritária de Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) e Proteína Padrão frente à diferentes enzimas após 120 minutos de hidrólise.....	69

CAPÍTULO II: Partial characterization of proteins from baru (*Dipteryx alata* Vog) seeds

Table 1: Chemical composition of the baru seed flour.....	91
Table 2: Composition of the protein fractions of defatted baru seed flour.....	93
Table 3: <i>In vitro</i> digestibility of defatted flour and total globulin from baru seed...	96

LISTA DE ABREVIATURAS

DEAE-celulose	Dietilaminoetil-celulose
HCl	Ácido Clorídrico
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Quilo Dalton
KOH	Hidróxido de potássio
M	Molar
m:V	Relação massa-volume
ME	β -mercaptoetanol
mM	Milimolar
N	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetros
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
%H	Percentual de Hidrólise
pI	Ponto Isoelétrico
PM	Peso Molecular
rpm	Rotação por minuto
S	Unidades de Svedberg
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzenossulfônico
V	Volts
Ve	Volume de Eluição
Vo	Volume de Exclusão, void

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: Isolamento, fracionamento e caracterização parcial das proteínas de amêndoas de Baru (*Dipteryx alata* Vog.)

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. OBJETIVO GERAL.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1. BARU: CARACTERIZAÇÃO E ASPECTOS NUTRICIONAIS.....	16
3.2. PROTEÍNAS VEGETAIS: O CASO DAS LEGUMINOSAS.....	21
3.3. FRAÇÕES PROTÉICAS NAS LEGUMINOSAS: CARACTERÍSTICAS...	23
3.3.1. Globulinas.....	24
3.3.2. Alguns exemplos de Globulinas em sementes.....	25
4. MATERIAL E MÉTODO.....	29
4.1. MATERIAIS.....	29
4.2. MÉTODOS.....	29
4.2.1. Preparo da farinha desengordurada de amêndoas de baru.....	29
4.2.2. Análise da composição centesimal.....	29
4.2.3. Estudo de solubilidade da proteína da farinha.....	30
4.2.4. Extração das frações protéicas da farinha desengordurada.....	31
4.2.5. Característica nutricional da proteína de amêndoas de Baru...	33
4.2.5.1. Digestibilidade <i>in vitro</i> das proteínas totais e globulinas.....	33
4.2.5.2. Perfil de Hidrólise da Globulina Majoritária.....	34
4.2.6. Determinação do Ponto Isoelétrico da fração globulina.....	36
4.2.7. Perfil Cromatográfico da fração globulina.....	36
4.2.7.1. Cromatografia de filtração em gel.....	36

4.2.7.2. Cromatografia de troca iônica.....	38
4.2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	38
4.2.9. Determinação de carboidratos.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA AMÊNDOA DE BARU.....	41
5.2. ESTUDO DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA DA FARINHA.....	42
5.3. SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS.....	46
5.4. PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS.....	49
5.5. DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> : PROTEÍNAS TOTAIS E GLOBULINAS...	51
5.6. CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO GLOBULINA.....	54
5.6.1. Ponto Isoelétrico (pI).....	54
5.6.2. Perfil Cromatográfico da fração globulina.....	55
5.6.3. Determinação de Carboidratos.....	67
5.8. PERFIL DE HIDRÓLISE: GLOBULINA MAJORITÁRIA.....	67
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
REFERÊNCIAS.....	77

CAPÍTULO II: Partial characterization of proteins from baru (*Dipteryx alata* Vog) seeds.

Abstract.....	84
1. INTRODUCTION.....	85
2. MATERIAL AND METHODS.....	86
2.1. Material.....	86
2.2. Methods.....	87
2.2.1. Analysis of the chemical composition.....	87
2.2.2. Protein determinations.....	87
2.2.3. Solubility tests on protein flour.....	87
2.2.4. Protein fractionation.....	88

2.2.5. <i>In vitro</i> digestibility.....	88
2.2.6. Characterization of the globulin fraction.....	89
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	90
3.1. Chemical composition of baru seeds.....	90
3.2. Solubility of the proteins from baru seed.....	91
3.3. Protein fractionation.....	93
3.3.1. SDS-PAGE.....	95
3.4. <i>In vitro</i> digestibility.....	95
3.5. Characterization of total globulins.....	96
3.5.1 – Isoelectric point (IP).....	96
3.5.2 - Chromatographic profile.....	97
CONCLUSIONS.....	100
ACKNOWLEDGMENTS.....	100
REFERENCES.....	100

CAPÍTULO I:

**Isolamento, fracionamento e caracterização parcial das proteínas
de amêndoas de Baru (*Dipteryx alata* Vog.)**

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro caracteriza-se pela grande biodiversidade e riqueza de sua fauna e flora. Nota-se a importância da preservação desse bioma e, para tanto, a necessidade da valorização de suas potencialidades. Muitos frutos nativos do cerrado destacam-se por apresentar alto valor nutricional e características sensoriais peculiares, podendo ser empregados na elaboração de produtos alimentícios. No entanto, existem poucas informações quanto às características físico-químicas, potencial tecnológico e nutricional de algumas espécies.

Dentre tais espécies conhecidas, temos o barueiro (*Dipteryx alata* Vog.), da família *Leguminosae* (subfamília *Faboideae*), o qual faz parte do grupo das espécies nativas usadas pela população regional como alimento e fonte de renda familiar. É uma das espécies mais promissoras para o cultivo, devido a seu uso múltiplo, alta taxa de germinação de suas sementes e produção de mudas (SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004). Ainda que tenha perspectivas de bom potencial econômico, o fruto é comercializado apenas informalmente nas regiões do Cerrado.

Dados da literatura mostram que os frutos do baru são considerados boa fonte de proteínas, óleo, carboidratos e fibra alimentar. O elevado teor protéico da amêndoa de baru tem despertado o interesse por algumas possíveis aplicações como ingrediente na forma de concentrado ou isolado nos setores de alimentação e farmacêutico (VIANNA; FAVARO, 2008).

Sabe-se que a qualidade nutricional da proteína está relacionada à sua digestibilidade e capacidade de satisfazer as necessidades de aminoácidos essenciais para síntese protéica, promoção de crescimento normal em crianças e manutenção no adulto. Paralelamente, o conhecimento das características físico-

químicas destas moléculas permite sua aplicação em diversos produtos alimentícios e verificação do seu comportamento frente aos diversos tratamentos empregados em seu processamento. Conhecer tais características moleculares é, certamente, um aspecto importante.

Os estudos referentes ao aspecto alimentar e nutricional do baru disponíveis na literatura tratam da composição centesimal e de minerais, caracterização dos lipídeos, conteúdo, composição em aminoácidos, qualidade nutricional e propriedades funcionais das proteínas totais (TOGASHI; SGARBIERI, 1994, 1995; TAKEMOTO *et al.*, 2001; MARTINS, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2008). No entanto, observa-se falta de informações mais detalhadas sobre as proteínas do Baru, principalmente no que se refere a suas frações separadamente; de dados com relação ao valor nutritivo da sua amêndoa e, conseqüentemente, da viabilidade de sua utilização como alimento, além de seu cultivo.

As globulinas são as proteínas principais nas leguminosas, por isso sua caracterização individual é essencial para fundamentar estudos básicos e aplicados. No caso da proteína majoritária das sementes de Baru, a literatura não registra dados sobre suas propriedades físico-químicas e características de hidrólise enzimática.

Deve-se considerar que o conhecimento dessas propriedades de frutas do cerrado é primordial para seu aproveitamento no sentido mais amplo, favorecendo o seu desenvolvimento sustentável, ou seja, evita os riscos de sua extinção, aumenta a renda dos agricultores, fornece matéria-prima para a agroindústria e alimentos para a população (MARTINS, 2006). Nesse sentido, maior atenção e estudos são necessários na elaboração de um quadro mais abrangente sobre a semente de baru.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar algumas das propriedades físico-químicas e nutricionais das proteínas da amêndoa do baru (*Dipteryx alata* Vog.) na sua forma nativa.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este trabalho teve como objetivos específicos:

Determinar a composição química da amêndoa de baru;

Avaliar as características de solubilidade das proteínas dessa amêndoa em função de diferentes variáveis;

Extrair, isolar e quantificar as diferentes frações protéicas que constituem a proteína total dessa amêndoa;

Caracterizar as propriedades da proteína majoritária da amêndoa, com destaque para algumas propriedades moleculares e teor de carboidratos;

Avaliar a digestibilidade *in vitro* da proteína da amêndoa de baru e de suas frações protéicas principais nas suas formas nativas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. BARU: CARACTERIZAÇÃO E ASPECTOS NUTRICIONAIS

O baru (*Dipteryx alata* Vog.) é uma leguminosa arbórea encontrada em solos bem drenados e férteis do cerrado brasileiro, abundante nas regiões de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais. Possui outros nomes populares que variam com o local, tais como: cumaru, cumbaru, fruta-de-macaco, castanha-de-burro, barujó, castanha-de-ferro, coco-feijão, cumarurana, cumbary, emburena-brava, meriparágé e pau-cumaru. Geralmente, os frutos encontram-se maduros no período de julho a outubro (TOGASHI; SGARBIERI, 1994; SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004).



Figura 1. Fruto do Barueiro (*Dipteryx alata* Vog.).

Fonte: <http://www.guzera.com.br>. Acesso em 19/03/2010.

O fruto do barueiro (Figura 1) é formado por uma casca fina e escura de coloração marrom, polpa (mesocarpo) com sabor adocicado e adstringente que abriga uma amêndoa (semente) dura e comestível, a qual representa cerca de 5% da massa em relação ao fruto. Alguns frutos apresentam polpa menos adocicada ou com mais tanino. A variação no sabor e textura é devido ao estágio de maturação

dos frutos e também da origem genética (SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004; ROCHA, 2007).

O baru tem diversas aplicabilidades, desde paisagismo e recuperação de áreas degradadas, até uso medicinal. Na alimentação humana, a polpa de Baru é consumida sob a forma de geléia ou licores. O sabor da amêndoa é agradável e menos acentuado que o do amendoim, sendo consumida torrada como aperitivo ou usada no enriquecimento de inúmeras receitas. O óleo, extraído de forma artesanal, pode ser obtido de amêndoas torradas e trituradas, ou ainda, extraído da amêndoa a frio, processo que gera uma massa útil para a fabricação de farinha (SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004; ROCHA, 2007).

Quanto à composição nutricional, os dados obtidos por Togashi e Sgarbieri (1994) revelam como componentes mais abundantes na polpa as fibras insolúveis (28,2%), os açúcares (20,4%) e o amido (38%), enquanto nas sementes predominam óleo (40,3%), proteínas (29,6%) e fibras (19%).

Devido ao seu alto teor lipídico, a amêndoa contém valor energético mais elevado que a polpa, sendo aproximadamente 500 kcal/100g de amêndoa (TAKEMOTO *et al.*, 2001) contra aproximadamente 300 kcal/100g de polpa (ROCHA, 2007). De acordo com as determinações de Togashi e Sgarbieri (1994), o óleo de semente de baru tem ácidos graxos com cadeias entre 16 e 24 átomos de carbono, sendo 78,5% ácidos graxos insaturados. Os ácidos graxos predominantes foram o oléico (44,5%) e o linoléico (31,7%). Do ponto de vista dos índices de saponificação e de iodo esse óleo se assemelha ao óleo de amendoim. Além desse aspecto, a semente apresenta alto teor de minerais. Foram encontrados quatro dentre seis macrominerais considerados essenciais (Cálcio, 140 mg/100g; Magnésio, 178 mg/100g; Fósforo, 358mg/100g; Potássio, 827 mg/100g) e também

quatro microminerais dentre oito essenciais (Cobre, 1,45mg/100g; Ferro, 4,24mg/100g; Manganês, 4,9mg/100g; Zinco, 4,1mg/100g) (TAKEMOTO *et al.*, 2001).

O teor de proteínas nas amêndoas de baru, considerando o valor próximo a 30% encontrado por Togashi e Sgarbieri (1994), é superior ao teor protéico de ervilha (*Pisum sativum* L.), feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), grão de bico (*Cicer arietinum* L.) e lentilha (*Lens culinaris* Med.), cujos valores encontrados por Costa *et al.* (2006) foram aproximadamente 22%, 21%, 18%, 21%, respectivamente. Entretanto, é inferior ao teor protéico da soja (*Glycine max*), que está em torno de 40% (NIELSEN, 1984). Por outro lado, a concentração de proteína na amêndoa de baru supera a de outro exemplo de leguminosa arbórea, o jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.), cujos valores encontrados na literatura estão por volta de 6% (MARTINS, 2006) a 9% (MATUDA; NETTO, 2005).

Considerando o seu uso potencial e comparando-a aos valores aproximados do teor protéico de algumas nozes e sementes, encontrados por Venkatachalam e Sathe (2006), a semente do baru também apresenta maior conteúdo protéico do que a amêndoa (*Prunus dulcis*; 19%), a Castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*; 14%), a Castanha-de-caju (*Anacardium occidentale*; 19%), a avelã (*Corylus avellana*; 14%), a macadâmia (*Macadamia integrifolia*, 8%), a noz pecã (*Carya illinoensis*; 7%), o pinhão (*Pinus pinea*; 13%); o pistache (*Pistacia vera*; 20%), a noz (*Juglans regia*; 13%) e o amendoim (*Arachis hypogaea*; 22%).

Quanto à composição em aminoácidos das proteínas presentes na polpa e na amêndoa de baru, os valores encontrados por Togashi e Sgarbieri (1994) indicam que na polpa há a ausência de cisteína, baixos teores de metionina, tirosina e triptofano e alto teor de prolina. Os aminoácidos limitantes na semente, a

semelhança do que ocorre em outras leguminosas, também são os sulfurados; porém os teores de triptofano e tirosina são maiores que na polpa, os de ácido glutâmico é alto e os de ácido aspártico baixo (Tabela 1).

Tabela 1. Composição em aminoácidos (g/16g de N) da polpa e da semente (amêndoa) de baru.

Aminoácido	Polpa	Amêndoa	
		Crua	Torrada
Valina	3,25	4,49	4,53
Isoleucina	2,46	3,00	2,79
Leucina	4,38	7,15	7,04
Treonina	2,35	3,04	2,95
½ cistina	0,00	0,00	0,00
Metionina	0,41	0,74	0,84
Tirosina	0,87	2,34	2,10
Fenilalanina	2,37	4,20	4,20
Histidina	1,47	2,10	1,95
Lisina	4,84	5,65	4,17
Triptofano	0,53	1,26	0,92
Ácido aspártico	10,06	7,47	7,56
Serina	2,67	3,03	2,91
Ácido glutâmico	8,11	19,18	19,30
Prolina	17,91	4,17	4,20
Glicina	2,98	3,79	3,80
Alanina	3,84	3,64	3,67
Arginina	3,50	7,26	6,99

Fonte: Togashi e Sgarbieri (1994, p.90).

Atualmente, na literatura disponível não são revelados dados a respeito das frações protéicas presentes na amêndoa de Baru, nem tão pouco a respeito da composição em aminoácidos de tais frações. Entretanto, sabe-se que normalmente a fração protéica principal em leguminosas são as globulinas, as quais podem apresentar como aminoácidos limitantes os sulfurados (LOURENÇO, 2000).

Portanto, tal perfil de aminoácidos descritos pelos autores pode ser indicativo da predominância dessa fração protéica.

O tratamento térmico (200°C por 15 minutos) das sementes acarretou perdas dos aminoácidos lisina (26%), triptofano (27%), tirosina (10%), histidina (7%), isoleucina (7%), serina (4%) e arginina (3%) (TOGASHI; SGARBIERI, 1994). Entretanto, os autores encontraram diferentes teores de inibidor de tripsina nas sementes de baru o qual foi inativado pelo tratamento térmico empregado. A digestibilidade aparente da proteína total da semente de baru, crua e torrada (200°C por 15 minutos), foi determinada por Togashi e Sgarbieri (1995). Em comparação à digestibilidade da proteína padrão (caseína; ~91%), tanto a proteína da semente crua (~73%) quanto da torrada (~66) foram inferiores, sendo o valor de digestibilidade da crua estatisticamente superior à torrada ($p < 0,05$).

Ainda não há dados oficiais sobre a produção e a comercialização dos produtos provenientes do baru. No entanto, grande parte desse comércio ainda é baseada no extrativismo que, se por um lado pode gerar renda para a comunidade, por outro, quando excessivo, pode prejudicar a preservação da fauna e da flora local. Como o baru apresenta boa produtividade e germinação das sementes, crescimento rápido e mais de 95% de sobrevivência, além de ser um produto de fácil armazenamento e com pouca incidência de pragas e doenças, seu potencial para plantação em escala comercial é muito grande (SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004). Observa-se crescente interesse no estabelecimento de políticas públicas que venham a privilegiar a cadeia de produção/comercialização de produtos *in natura*, semi-processados e processados provenientes de espécies do cerrado brasileiro.

Nesse sentido, estudar mais a natureza e as propriedades da proteína da amêndoa de baru, bem como os fatores que interferem na suas propriedades físico-

químicas, nutricionais e funcionais torna-se fundamental para agregação de valor a esse fruto.

3.2. PROTEÍNAS VEGETAIS: O CASO DAS LEGUMINOSAS

A qualidade ou valor nutricional da proteína depende de seu conteúdo de aminoácidos essenciais e da proporção dos mesmos, além de sua utilização fisiológica após a digestão e absorção. Esse valor nutricional varia de acordo com a fonte protéica, com os tratamentos utilizados no processamento do alimento e ainda interações com outros componentes presentes no alimento ou na alimentação do indivíduo (FRIEDMAN, 1996).

Devido à utilização de pequenas quantidades de amostras nas análises, maior simplicidade e rapidez nos resultados em relação a outros métodos *in vivo*, métodos de determinação da digestibilidade de proteínas *in vitro* tem sido empregados em inúmeros trabalhos disponíveis na literatura como um dos parâmetros para se determinar o valor nutricional protéico (MONSOOR; YUSUF, 2002; NEVES; SILVA; LOURENÇO, 2004; PIRES *et al.*, 2006; TAVANO; NEVES, 2008). Todos os métodos de determinação de digestibilidade *in vitro* se baseiam em digerir a amostra com enzimas proteolíticas em condições padronizadas, sendo normalmente uma simulação do que ocorre no trato gastrointestinal. A diferença está entre o número e a natureza das enzimas que se utilizam e a medida final a ser realizada (PIRES *et al.*, 2006).

Demonstra-se que proteínas de origem vegetal são menos susceptíveis à digestão *in vivo* do que proteínas de origem animal. No caso das proteínas de leguminosas, o baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados, a estrutura compacta das proteínas, a presença de componentes não protéicos (fibra dietética, taninos,

fitatos) e/ou proteínas anti-fisiológicas (inibidores de proteases, lecitinas), as quais podem prejudicar a digestão e aumentar a excreção de nitrogênio endógeno, têm sido propostos como fatores responsáveis pelo baixo valor protéico aparente (FRIEDMAN, 1996; DURANTI; GIUS, 1997; CARBONARO *et al.*, 2000; NEVES; SILVA; LOURENÇO, 2004; TAVANO; NEVES, 2008).

Atualmente, proteínas vegetais podem ser consideradas como ingredientes funcionais versáteis ou como componentes biologicamente ativos mais do que nutrientes essenciais. As várias espécies de leguminosas podem originar efeitos fisiológicos de diferente magnitude devido às diferentes composições químicas e efeito sinérgico dos seus componentes. Atividades biológicas relevantes de suas proteínas estariam relacionadas à prevenção e/ou controle de uma série de doenças crônicas. A soja é a espécie mais estudada, mas é provável que várias leguminosas desempenhem efeitos benéficos similares (DURANTI; GIUS, 1997; MARCONE, 1999).

A fim de responder adequadamente e efetivamente à presente demanda por fontes alternativas de proteínas que tenham propriedades funcionais, nutricionais e fisiológicas similares e/ou superiores às da soja, pesquisas envolvendo identificação, isolamento, caracterização molecular, demonstração de atividade biológica e elucidação do mecanismo de ação do componente de interesse são necessárias (DURANTI, 2006; MARTINS; BENTO, 2007; SCARAFONI; MAGNI; DURANTI, 2007).

Essa pode ser mais uma possível ação a ser observada para componentes da semente de baru, a semelhança do observado para outras leguminosas, e que nesse caso merece maiores estudos.

3.3. FRAÇÕES PROTÉICAS NAS LEGUMINOSAS: CARACTERÍSTICAS

As proteínas de reserva nutricional compreendem apenas algumas espécies moleculares, porém constituem percentual elevado da proteína total nas sementes (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995; LOURENÇO, 2000).

Um estudo detalhado das proteínas de reserva de sementes foi feito por Osborne (1924 apud SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995, p. 945), que classificou essas proteínas em grupos com base em sua solubilidade e extração em água (albuminas), solução salina (globulinas), soluções alcoólicas (prolaminas) e soluções ácidas ou alcalinas (glutelinas). Essas várias classes de proteínas de reserva possuem muitos atributos que permitem-nas serem utilizadas em várias aplicações alimentares e não alimentares (MARCONE, 1999).

As Albuminas são facilmente coaguláveis pelo calor e apresentam perfil de aminoácidos essenciais mais adequados. Entretanto, representa uma fração menor da proteína total das leguminosas e, por ser um grupo de proteínas mais abrangente, é constituída também por enzimas e outras proteínas metabólicas como, por exemplo, inibidores de tripsina (DURANTI; GIUS, 1997; LOURENÇO, 2000). As globulinas constituem a principal proteína de reserva das leguminosas e, por isso, é a responsável pelas propriedades físicas e nutricionais dos produtos protéicos dessas sementes, apresentando baixas concentrações de aminoácidos sulfurados e triptofano, mas altas concentrações de lisina. Já, as prolaminas que contêm elevados teores de prolina e nitrogênio amídico (derivado da glutamina), e as glutelinas apresentam-se em maiores concentrações nos cereais (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995; LOURENÇO, 2000).

3.3.1. Globulinas

As globulinas variam em peso molecular (PM) e cargas entre as diferentes espécies botânicas devido à heterogeneidade das subunidades e polipeptídeos de suas estruturas. Essas diferenças são explicadas por uma variedade de razões, incluindo diferenças nos tamanhos de polipeptídeos ditadas à nível genético; diferenças no processo proteolítico (pós-translacional ou co-translacional) da síntese dos polipeptídeos; o tipo e número de resíduos de açúcar envolvidos na glicosilação (VENKATACHALAM; SATHE, 2007). Quanto à digestibilidade, normalmente apresentam resistência estrutural à ação proteolítica da tripsina e quimotripsina, entretanto, também há variações conforme o gênero, espécie, variedade e cultivar botânicos das sementes das quais foram extraídas (LOURENÇO, 2000).

Essa fração protéica pode ser divididas em 2 grupos principais, classificados de acordo com seus coeficientes de sedimentação (unidades de Svedberg - S): as 7S (do tipo vicilinas) e as 11S (do tipo leguminas). Ambos os grupos são deficientes em cisteína e metionina, embora as globulinas 11S, geralmente, contêm níveis um pouco maiores desses aminoácidos. A proporção entre essas diferentes globulinas variam de espécie para espécie (DERBYSHIRE; WRIGHT; BOULTER, 1976; SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995).

Normalmente, as globulinas do tipo 7S necessitam de concentrações de sal menores do que as 11S para se solubilizar, tal diferença de solubilidade possibilita separar efetivamente as 11S de 7S (SUCHKOV *et al.*, 1990; GARCIA *et al.*, 2005).

Com base em várias investigações estruturais e químicas, observa-se que as globulinas 11S de sementes tem várias propriedades similares: são hexâmeros de PM entre 300 a 400 kDa, compostos por 6 subunidades, sendo que cada subunidade consiste de um polipeptídeo ácido (de PM entre 27 e 37 kDa) e um

polipeptídeo básico (de PM entre 20 e 24 kDa) ligados por ligações dissulfídicas (DERBYSHIRE; WRIGHT; BOULTER, 1976; CHEN; PAREDES-LOPEZ, 1997). Desta forma, esta proteína poderia ser classificada por apresentar um perfil de subunidades compatível à essas características gerais e universais (MARCONE; KAKUDA; YADA, 1998). Entretanto, algumas propriedades de superfície parecem ser uma característica diversa entre essas globulinas (MARCONE, 1999). As 7S são, geralmente, trimeros de PM entre 150 a 200 kDa, constituídas por subunidades não idênticas α (57 a 68 kDa), α' (57 a 72 kDa) e β (42 a 52 kDa) não ligadas por ligações dissulfídicas (DERBYSHIRE; WRIGHT; BOULTER, 1976; CHEN; PAREDES-LOPEZ, 1997; GARCIA *et al.*, 2005).

Embora as globulinas 7S e 11S não mostrem similaridades óbvias no sequenciamento de aminoácidos, elas tem propriedades similares, incluindo a capacidade de formar estruturas triméricas e hexaméricas. No caso da 7S, a proteína madura é trimérica, mas pode sofrer agregação reversível à hexameros, dependendo da força iônica. A 11S madura é hexomérica, mas é inicialmente formada e transportada através de sistema secretório como um trímero intermediário. Métodos comparativos mais detalhados indicam que a cadeia básica (C-terminal) da 11S está relacionada a região C-terminal da 7S e acredita-se que as 11S tem estrutura terciária similar à da 7S (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995).

3.3.2. Alguns exemplos de Globulinas em sementes

Na literatura estão disponíveis inúmeros trabalhos que descrevem as características moleculares das globulinas em sementes de leguminosas e de outras famílias. Em algumas sementes, essas características foram, e ainda são, detalhadamente exploradas.

Um exemplo clássico é representado pelas globulinas 11S e 7S na soja, denominadas glicinina e β -conglucina, respectivamente, e que perfazem cerca de 70% das proteínas totais entre diferentes cultivares, essas apresentam-se em proporções que variam de 3:1 a 1:1. A glicinina é um hexamero de PM entre 310 e 350 kDa, cujas subunidades apresentam cadeias ácidas, de PM em torno de 40 kDa, e cadeias básicas, de PM em torno de 20 kDa, unidas por ligações dissulfídicas. A β -conglucina apresenta PM entre 150 a 200 kDa e é constituída por 3 subunidades não idênticas que em baixa força iônica dimerizam-se à hexameros. Ao menos 4 diferentes grupos de subunidades, denominadas α' , α , β e γ formam esta 7S (NIELSEN, 1984).

Duranti *et al.* (2008) no seu trabalho de revisão sobre o tremço (*Lupinus albus*) descrevem as características das globulinas presentes nessa semente, sendo as principais a α -Conglutina (11S) e a β -Conglutina (7S), que representam, respectivamente, 35-37% e 44-45% das proteínas totais da semente. A 11S, de PM entre 330 a 430kDa, é constituída por 6 subunidades entre 62 e 74 kDa e cada subunidade é formada por cadeias ácidas (47-52 e 42-44 kDa) e básicas (20-22 kDa) unidas por ligações dissulfídicas, sendo algumas cadeias ácidas glicosiladas. A 7S, de PM 143 a 260 kDa, é uma proteína trimérica, cujas subunidades apresentam alto (53-64 kDa), médio (25-46 kDa) e baixo (17-20 kDa) PM relativo, não são unidas por ligações dissulfídicas e são tipicamente glicosilados.

Neves e Lourenço (1995) observaram que a 11S da lentilha (*Lens culinaris*) tem uma estrutura oligomérica complexa, apresentando 12 subunidades polipeptídicas não unidas por ligações dissulfídicas de PM entre 14,5 e 61 kDa, sendo as principais as de 34, 20 e 57 kDa, e, sob aquecimento, essa estrutura não sofre agregação.

Na caracterização da fração globulinica de um tipo de feijão tropical (*Lablab purpureus* L), Venkatachalam e Sathe (2007) verificaram que ligações dissulfídicas não faziam parte de sua organização molecular e que os 3 polipeptídeos predominantes nessa fração apresentavam PM na faixa entre 51 e 64 kDa e eram glicosilados. Por essas características, concluíram que a fração globulinica estudada era qualitativamente similar à globulina principal do feijão comum, a faseolina (7S). Quanto à digestibilidade *in vitro*, dados eletroforéticos revelaram que essa globulina após aquecimento foi menos resistente à hidrólise pela pepsina, protease na qual apresentou-se mais eficiente que a tripsina e a quimotripsina.

Carbonaro, Grant e Cappelloni (2005) estudaram globulinas 7S e 11S predominantes, respectivamente, no feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L) e no feijão de fava (*Vicia faba* L). Em condições redutoras, a 7S apresentou polipeptídeos de PM entre 43 e 53 kDa, as quais corresponderam às 4 subunidades de faseolina; a 11S apresentou como principais componentes a α -cadeia em 34 kDa e as β -cadeias entre 18 e 26 kDa. Quanto aos valores de digestibilidade *in vivo*, testada pela avaliação do conteúdo intestinal de ratos após 1 hora de administração das frações nativas ou aquecidas, os autores observaram que 92% da 7S e 95% da 11S nativas foram digeridas e que a desnaturação térmica reduziu essa digestibilidade (89% e 79%, respectivamente). Os autores afirmam que a menor digestibilidade da 11S após o aquecimento está relacionada à alta hidrofobicidade dos polipeptídeos básicos da sua estrutura.

A exemplo de globulinas de outra família, Garcia *et al.* (2005), caracterizaram a 11S e a 7S do endosperma de coco (*Cocos nucifera*) maduro, encontrando PM de 326 e 156 kDa, respectivamente. Em condições redutoras, a 11S apresentou subunidades protéicas em 34 e 24 kDa e uma subunidade minoritária em 55 kDa,

referente à polipeptídeos básicos e ácidos recombinados. Já a 7S apresentou 3 polipeptídeos principais de PM 24, 22 e 16 kDa, sendo comparada pelo autor à vicilinas de outras espécies. Uma característica rara foi observada nas frações do estudo: a presença de carboítrados no polipeptídeo básico da 11S e a ausência de carboítrados na 7S.

Outro exemplo são as globulinas da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* L.) caracterizadas por Sharma *et al.* (2010). A 7S mostrou ser uma glicoproteína de PM 114 kDa, apresentando em condições redutoras um polipeptídeo em 13 kDa, dois em 38-42 kDa e dois em 54-57kDa. Neste caso, os autores observaram que as subunidades de 13 e 38-42 kDa unidas por ligações dissulfídicas compunham subunidades de 55 kDa. O PM encontrado para a 11S foi 289 kDa e, em condições redutoras, mostrou ser composta por polipeptídeos ácidos (30-32 kDa) e básicos (20-21 kDa), os quais compõem subunidades em 45 e 54-57 kDa através de ligações dissulfídicas.

Nota-se que estudos de isolamento, caracterização físico-química e hidrólise proteolítica das globulinas em diferentes espécies são necessários para fundamentação dos estudos básicos e aplicados, por outro lado, não há registros sobre essas propriedades da proteína majoritária da semente de baru.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. MATERIAIS

Os frutos (*Dipteryx alata* Vog.) foram coletados dos barueiros da zona rural do município de Jussara, Goiás. As amêndoas, após serem extraídas da polpa do fruto, foram selecionadas, limpas e descascadas manualmente.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparo da farinha desengordurada de amêndoas de baru

Para elaboração de farinha desengordurada, as amêndoas descascadas foram trituradas em moedor de grãos manual, resultando a farinha integral da amêndoa. O produto obtido foi desengordurado através de dupla extração lipídica com n-hexano na proporção 1:5 (m:V) cada, sob agitação por período de 2 horas à temperatura ambiente, seguindo-se à secagem em estufa com circulação de ar à 35°C para a retirada do solvente. A farinha obtida foi padronizada em tamis de 60 mesh e, então, utilizada para os diferentes estudos propostos.

4.2.2. Análise da composição centesimal

A análise da composição centesimal das farinhas integral e desengordurada da amêndoa de baru foi feita através de: determinação do teor de umidade (gravimetria, após secagem em estufa a 105°C até peso constante); determinação de proteínas (Nitrogênio Total pelo método de Kjeldahl); determinação de lipídeos (BLIGH; DYER, 1959); determinação do teor de cinzas (calcinação da amostra em mufla a 550°C); determinação de carboidratos totais (por diferença) (AOAC, 1995).

4.2.3. Estudo de solubilidade da proteína da farinha

Para avaliar as melhores condições de extração das proteínas da amêndoa de baru realizou-se os ensaios de relação massa de farinha:volume de extrator, tempos de extração, além do efeito de pH e concentração salina (NaCl), conforme segue abaixo:

Foram estabelecidas as relações 1:10, 1:30, 1:50 (m:V) para a avaliação da solubilidade das proteínas em função da proporção de massa de amostra (farinha desengordurada) *versus* volume de extrator (solução de NaCl 0,5 M, pH 6,9). Os extratos foram submetidos à agitação mecânica durante 1 hora e centrifugados à 10000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante recolhido e separado.

Foram estabelecidos os tempos de agitação mecânica 30, 60 e 90 minutos para a avaliação da solubilidade das proteínas em função do tempo de extração, em solução de NaCl 0,5 M (pH 6,9) na proporção 1:30 (massa de farinha:volume de extrator). Os materiais foram centrifugados à 10000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante recolhido e separado.

Os sobrenadantes foram, então, utilizados para as determinações de proteínas solúveis pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. As determinações foram realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à Análise da Variância (ANOVA). Para valores significativos, utilizou-se o teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%, para comparação entre as médias, com o auxílio do software BioStat® 2007.

Para a determinação da curva de solubilidade das proteínas em função de pH e concentração de sal (NaCl) crescentes, adotou-se a proporção 1:30 (massa de farinha:volume de extrator) e o tempo de agitação mecânica de 30 minutos para cada amostra. Os solventes utilizados foram H₂O e solução de NaCl nas

concentrações 0,2 M, 0,5 M e 1 M. Os pHs foram ajustados com soluções de HCl e NaOH para valores de 1,0 à 12. Os materiais foram centrifugados à 10000 rpm por 30 minutos e os sobrenadantes recolhidos e utilizados para as determinações de proteínas solúveis.

4.2.4. Extração das frações protéicas da farinha desengordurada

A extração das frações foi realizada adotando-se o critério de solubilidade em diferentes sistemas extratores, baseado no procedimento de Osborne, com algumas modificações. A farinha desengordurada foi dispersa em H₂O, com ajuste de pH em torno de 7,0, na proporção 1:30 (m:V), submetida à agitação mecânica durante 1 hora e centrifugada à 15000 rpm durante 40 minutos. O sobrenadante foi dialisado em membranas de diálise (com poros de cerca de 10 kDa), por cerca de 24-36 horas, contra água destilada até visualização de precipitado, sendo observada 7 trocas de água destilada para manutenção da pressão osmótica e, então, separadas por centrifugação (15000 rpm por 40 minutos) as frações albuminas (sobrenadante) e globulinas (precipitado). O resíduo foi novamente extraído com solução de NaCl 0,5 M, com ajuste de pH em torno de 7,0, na proporção 1:30 (m:V). Após centrifugação, o sobrenadante obtido foi submetido ao processo de diálise conforme citado acima, novamente centrifugado, e assim obteve-se outra porção de globulinas (precipitado), a qual foi agregada à primeira. Para aumentar o rendimento da extração de albuminas e globulinas, os procedimentos de agitação e de centrifugação foram repetidos 2 vezes cada. O resíduo da extração salina foi disperso em solução alcoólica a 70%, submetido à agitação mecânica por 1 hora e centrifugado, sendo então obtida no sobrenadante a fração prolamina. O resíduo foi disperso em solução de NaOH 0,1 N, submetido à agitação e centrifugado, obtendo-

se assim a fração glutelina e o resíduo final, contendo proteínas insolúveis nos solventes utilizados nesse processo.

Os percentuais de proteína extraídas em cada fase foram calculados tomando-se como base a proteína total da farinha e quantificados através da determinação Nitrogênio Total de cada fração pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995). O procedimento descrito está representado na Figura 2.

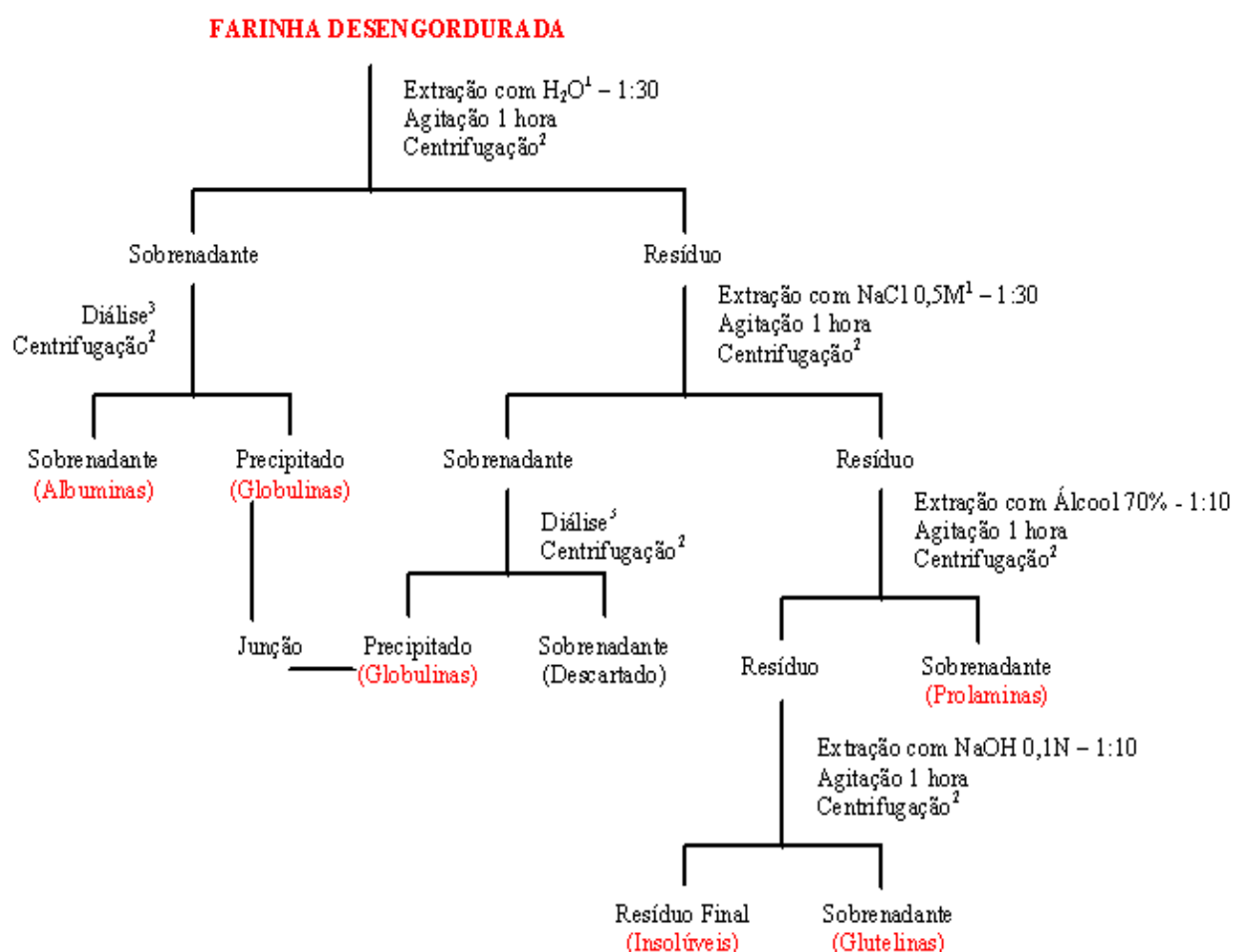


Figura 2. Procedimento de extração e isolamento das frações protéicas da farinha de amêndoa de baru. 1: Ajuste de pH ~7,0; 2: 15000 rpm por 40 minutos, em temperatura entre 6 e 8°C; 3: Diálise contra H₂O destilada, durante 24 a 36 horas, em temperatura entre 6 e 8°C.

4.2.5. Característica nutricional da proteína de amêndoas de Baru

4.2.5.1. Digestibilidade *in vitro* das proteínas totais e globulinas

A determinação do percentual de hidrólise enzimática da proteína total e da globulina total da amêndoa de baru foi realizada após tratamento das proteínas com sequência de enzimas pepsina e pancreatina, como descrito por Akeson e Stahman (1964). As amostras em estudo foram hidrolisadas pelo uso de solução de pepsina (Sigma P-7012), em pH 1,5 (tampão KCl/HCl), por 3 horas, à 37°C. Após o tempo de reação, elevou-se o pH do meio à 8,0 (Tampão fosfato de Sódio) e deu-se sequência à hidrólise com solução de pancreatina (Sigma P-7545), por 24 horas, à 37°C. Para a correção do teor de Nitrogênio presente no meio independente da reação de hidrólise (solução de enzimas e degradação da amostra) foram preparados, sob as mesmas condições, os brancos das amostras e das enzimas. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA), até concentração final de 10%. Toda a solução foi centrifugada à 7000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes, após serem filtrados, foram ajustados em volume específico e utilizados na determinação do Nitrogênio Total pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995).

A porcentagem de hidrólise de cada amostra foi calculada como porcentagem do nitrogênio solúvel comparado ao nitrogênio total da amostra, pela fórmula:

$$\%H = \frac{Na - (Nba + Nbe)}{NT} \times 100$$

Onde: Na = Nitrogênio solúvel no sobrenadante da amostra;

Nba = Nitrogênio solúvel no sobrenadante do branco da amostra;

Nbe = Nitrogênio solúvel no sobrenadante do branco das enzimas;

NT = Nitrogênio total.

A digestibilidade *in vitro* foi, então, calculada em relação à porcentagem de hidrólise da proteína padrão, representado pela Caseína (Sigma C-8654).

Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram submetidos à Análise da Variância (ANOVA). Para valores significativos, utilizou-se o teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%, para comparação entre as médias, com o auxílio do software BioStat® 2007.

4.2.5.2. Perfil de Hidrólise da Globulina Majoritária

Avaliou-se o perfil de hidrólise da globulina majoritária da amêndoa de Baru pelas enzimas Pepsina (Sigma P-7012), Tripsina (Sigma T-0134) e Quimotripsina (Sigma C-4129), separadamente, calculando-se o percentual de hidrólise em relação à caseína.

A globulina majoritária foi obtida pela passagem da globulina total em coluna Sephadex G-200, conforme procedimentos descritos posteriormente. As frações referentes ao pico contendo a globulina majoritária solubilizada em tampão de eluição (fosfato de potássio 10 mM, pH 7,5, contendo 0,5 M de NaCl e 0,01% de azida sódica) foram homogeneizadas e, então, determinou-se o teor protéico pelo método de Lowry *et al.* (1951).

Nos ensaios, a proporção de enzima:substrato utilizada foi 1:10 para as três enzimas, sendo a pepsina solubilizada em pH 1,0 (tampão KCl/HCl) e a tripsina e a quimotripsina em pH 7,8 (Tampão fosfato de Potássio 50 mM). A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio, à 37°C, contendo 500 µg de proteína, e interrompida em diferentes tempos de incubação (0, 2, 5, 10, 15 30, 60 e 120 minutos) pela diluição (10 vezes) e resfriamento do meio com água destilada à 4°C. Foram preparados, sob as mesmas condições, brancos da enzima e da solução das

proteínas. Cada ponto foi preparado em triplicata, sendo uma das repetições tratadas com tampão contendo SDS e β -mercaptoetanol, aquecidas em ebulição durante 5 minutos e reservadas para posterior análise eletroforética. As demais repetições foram utilizadas para as determinações dos grupamentos amino-livres pela reação com ácido 2,4,6-Trinitrobenzenossulfônico (TNBS), conforme o método descrito por Fields (1971), modificado por Spadaro *et al.* (1979), adicionando-se 0,4 ml de tampão borato/KOH (pH 9,5) e 0,2 ml de solução de TNBS 5 mM às alíquotas da amostra (0,4 ml, em triplicata). Após 40 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 ml de solução 18 mM de sulfito de sódio em fosfato de sódio 2 M procedendo-se à leitura das absorbâncias à 420 nm contra branco da reação.

Para a construção de curva de referência utilizou-se o aminoácido L-leucina (0 a 100 nmols). Os resultados de grau de hidrólise foram calculados como a porcentagem de aminoácidos livres, expressa como μ moles de L-leucina, em comparação ao total de μ moles de aminoácidos presentes na amostra original. O valor médio do total de moles de aminoácidos presentes nos 500 μ g de cada amostra foram estimados com base no peso molecular médio dos aminoácidos (PM=113).

Então, considerou-se:

$$\%H = \frac{AAs - (AAba + AAbe)}{AAtm}$$

Onde: AAs= moles de Aminoácidos determinados na amostra;

AAba= moles de aminoácidos determinados no Branco da amostra;

AAbe= moles de aminoácidos determinados no Branco da Enzima;

AAtm= moles totais de aminoácidos na amostra considerando-se 1 mol de aminoácidos = 113g).

4.2.6. Determinação do Ponto Isoelétrico da fração globulina

A fração globulina proveniente do procedimento de extração e isolamento descrito anteriormente foi ressuspensa em solução de NaCl 0,2 M. Dessa solução, alíquotas iguais foram diluídas em solução de NaCl 0,2 M, ajustadas em volumes (25 ml) e acertadas em pHs entre 2,0 a 12,0 com soluções de NaOH e HCl, sendo o aumento de pH feito com intervalo de valores de 1,0 unidade e, na faixa compreendida entre 4,2 a 5,0, de 0,1 unidade. Após agitação leve por 10 minutos, determinou-se a turbidez dessas soluções pela medida da absorbância a 320 nm. Esses materiais foram centrifugados (16000 rpm por 15 minutos) e, no sobrenadante, determinou-se proteínas solúveis pelo método de Lowry *et al.* (1951). O Ponto Isoelétrico da globulina foi considerado o pH que apresentou a máxima turbidez e/ou a mínima solubilidade.

Os precipitados das soluções provenientes da faixa de pH entre 4,3 e 4,8 foram ressuspensos em tampão fosfato de potássio (10 mM) com 0,3 M de NaCl e 0,01% de azida (pH 7,5) e submetidos a análise eletroforética.

4.2.7. Perfil Cromatográfico da fração globulina

4.2.7.1. Cromatografia de filtração em gel

a-) Sepharose CL-6B

A fração globulina total, após a extração e isolamento, foi ressuspensa em tampão de corrida fosfato de potássio 10 mM (pH 7,5), contendo 0,3 M de NaCl e 0,01% de azida sódica, sendo, então, aplicada em coluna contendo resina Sepharose CL-6B (100 x 2,5 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. Foram coletadas frações de aproximadamente 4,6 ml cada, sendo traçado o perfil

cromatográfico registrando-se a absorbância a 280 nm. Os picos cromatográficos referentes às frações separadas foram submetidos a análise eletroforética.

b-)Sephacryl S-300

A fração de globulina total isolada foi ressuspensa em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,5), contendo 0,01% de azida sódica, sendo, então, aplicada em coluna contendo resina Sephacryl S-300 HR (80 x 2,0 cm) previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 5,0 mM (pH 7,5), contendo 0,5 M de NaCl e 0,01% de azida sódica. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão. Para a elaboração da curva de calibração da coluna, utilizou-se mistura de proteínas de PM conhecidos, a saber: citocromo C (12,4 kDa), albumina de ovo (45 kDa), lactato desidrogenase (130 kDa), ferritina (480 kDa) e tireoglobulina (669 kDa). Foram coletadas frações de aproximadamente 4,5 ml cada. Os volumes de eluição das proteínas (V_e) foram determinados registrando-se a absorbância a 280 nm (à exceção do citocromo C, realizado em 550 nm). O volume de exclusão da coluna (V_o) foi determinado com a eluição de azul de dextrana 2000. Os picos cromatográficos referentes às frações separadas foram submetidos a análise eletroforética.

c-) Sephadex G-200

A fração globulina total isolada foi ressuspensa em tampão de eluição fosfato de potássio 10 mM (pH 7,5), contendo 0,5 M de NaCl e 0,01% de azida sódica, e, após decantação, o sobrenadante foi eluído em coluna Sephadex G-200 (50 x 2,5 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. Para a elaboração da curva de calibração da coluna, utilizou-se mistura de proteínas de PM conhecidos, a saber:

citocromo C (12,4 kDa), albumina de ovo (45 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), galactosidase (116 kDa), miosina (240 kDa) e ferritina (480 kDa). Foram coletadas frações de aproximadamente 3,5ml cada. Os volumes de eluição das proteínas (V_e) foram determinados registrando-se a absorbância a 280 nm (à exceção do citocromo C, realizado em 550 nm). O volume de exclusão da coluna (V_o) foi determinado com a eluição de azul de dextrana 2000. Os picos cromatográficos referentes às frações separadas foram submetidos a análise eletroforética.

4.2.7.2. Cromatografia de troca iônica

A amostra da fração de globulina total ressuspensa em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,5) contendo 0,01% de azida sódica foi adsorvida à coluna de Dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose; 18 x 1,5cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão, que também foi utilizado para a lavagem da coluna para remoção de proteínas não retidas. As proteínas adsorvidas foram eluídas com o mesmo tampão contendo gradiente linear de NaCl de 0 a 0,6 M. Foram coletadas frações de aproximadamente 4,5 ml e o perfil da eluição foi acompanhado registrando-se absorbância a 280 nm e os picos submetidos à análises eletroforética.

4.2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese das proteínas nativas em gel de poliacrilamida em condições não-dissociantes foi realizada de acordo com o método descrito por Davis (1964), em tubos verticais de 0,6 x 10 cm. Quantidades apropriadas de amostras foram depositadas nos géis de concentração, normalmente de 10 a 15 µg. O gel de separação, com altura de 7 cm, continha 7% de acrilamida e o gel de concentração,

com altura de 0,3 cm, continha 3% de acrilamida. Foi utilizado o tampão Tris/glicina (pH 8,3) e a corrida realizada a uma corrente de 4 mA por tubo.

A determinação de número e de pesos moleculares das subunidades protéicas foi realizada pelo procedimento descrito por Laemmli (1970). Quantidades apropriadas de amostras foram depositadas nos géis de concentração, normalmente de 10 a 15 µg. Os géis foram preparados na concentração de 12% em massa de acrilamida com espessura de 0,75mm. As amostras e o padrão de PM foram preparadas em tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) ou SDS e β-mercaptoetanol, aquecidas por 3 minutos à fervura. As seguintes proteínas com pesos moleculares conhecidos foram utilizadas como padrão: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa). A corrida eletroforética foi realizada em tampão Tris/glicina (pH 8,9) contendo 0,1% de SDS, com voltagem de 150V.

O procedimento de coloração foi realizado com Coomassie brilliant blue e de descoloração com solução de ácido acético, metanol e água (proporção 1,5:1:17,5, respectivamente).

Os géis foram reproduzidos em scanner (HP® Scanjet 3500c), e as respectivas imagens analisadas por densitometria com software Alpha Ease®FC, versão 6.0, para identificação e quantificação das subunidades.

4.2.9. Determinação de carboidratos

Foi feita a determinação do teor de carboidratos presente na fração globulínica total e na globulina majoritária, purificada pela passagem da globulina total em coluna Sephadex G-200, conforme procedimentos descritos anteriormente, através da reação com fenol-ácido sulfúrico, conforme o método descrito por Dubois

et al. (1956), usando glicose como padrão para construção de curva de referência (0 a 70 μg). O teor de carboidratos foi expresso como percentual de glícides na massa total de proteína.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA AMÊNDOA DE BARU

Os resultados obtidos para a composição química da amêndoa de baru, tanto para a farinha integral quanto para a farinha desengordurada, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Composição centesimal das farinhas de amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vog.) integral e desengordurada

Componente*	Farinha Integral (%)	Farinha Desengordurada (%)
Proteína (%N.6,25)	24,40±0,35	46,79±0,93
Lipídeos	43,29±0,22	4,09±0,10
Cinzas	3,01±0,03	5,28±0,08
Carboidratos totais**	29,30±0,56	43,84±1,02

*Base Seca; **Calculado por Diferença. Valores representam Médias±desvio padrão de três determinações

O teor médio de proteína presente na farinha integral de amêndoas utilizada nesse estudo foi de 24,4% e encontra-se próximo aos valores relatados na literatura, que variam entre 24,5% (MARTINS, 2006) a 29,6% (TOGASHI; SGARBIERI, 1994). Vera *et al.* (2009) relataram uma composição média de proteínas para a amêndoa de baru, coletada em 12 diferentes regiões do estado de Goiás, entre 25,2 e 27,8%. Esse teor de proteínas, considerando o destino que vem se revelando para o uso dessa semente, mostra-se superior a outras “amêndoas” tais como: castanha do Brasil (14-16%), pinhões (13%), noz pecan (9%), castanha de caju (17,5%), avelãs (14,5%), e próximos a pistache (20%) e amêndoas (21%) (YANG, 2009).

A farinha integral apresentou 43,3% de lipídeos, valor pouco superior aos encontrados por Vera *et al.* (2009), de 33,28%, e Togashi e Sgarbieri (1994), de 40,3%. O teor de cinzas encontrado de 3,01% também foi semelhante aos relatados na literatura, que se encontram em torno de 2,8% (TOGASHI; SGARBIERI, 1994; TAKEMOTO *et al.*, 2001; MARTINS, 2006).

O teor de carboidratos totais na farinha integral da semente, calculado por diferença, encontra-se próximo aos valores encontrados por Takemoto *et al.* (2001), que foi 31% (considerando a soma dos teores de fibras e carboidratos totais) e por Togashi e Sgarbieri (1994), que foi 27,3% (considerando a soma dos teores de fibras totais, açúcares totais e amido).

Observa-se que o procedimento utilizado para a obtenção da farinha desengordurada foi efetivo, visto que houve uma redução de 90,45% do teor de lipídeos em relação à farinha integral. É esperado que, proporcionalmente, os teores de proteínas, cinzas e carboidratos aumentem na farinha desengordurada em relação à integral devido a remoção dessa grande quantidade de lipídeos.

5.2. ESTUDO DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA DA FARINHA

Os valores obtidos nos ensaios para o estabelecimento das melhores condições de extração da proteína da farinha desengordurada de baru estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Observa-se pela tabela 3 que o percentual de proteínas solubilizadas em solução de NaCl (0,5 M, pH 6,98) foi significativamente maior quando empregada a proporção massa de farinha:volume de extrator de 1:30 em relação às outras proporções que não mostram diferença estatisticamente significativa entre si ao nível de $p < 0,05$.

Tabela 3: Efeito da proporção massa:volume (M:V) na solubilidade das proteínas da farinha de amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vog.) desengordurada

Proporção M:V ^{1,2}	Proteína Solubilizada (%) ^{3,4}
1:10	74,13±1,44 ^b
1:30	81,56±1,15 ^a
1:50	76,50±1,27 ^b

¹NaCl (0,5M, pH 6,98) como solvente; ²60 min de extração; ³Cálculos com base na proteína total da farinha desengordurada (%N.6,25). ⁴Resultados representam Médias±desvio padrão de três determinações. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Nos resultados do efeito do tempo de extração observa-se que o tempo de 60 minutos se mostrou o mais eficiente na solubilização das proteínas (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito do tempo de extração na solubilidade das proteínas da farinha de amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vog.) desengordurada

Tempo de extração (min) ^{1,3}	Proteína Solubilizada (%) ^{3,4}
30	78,59±0,49 ^b
60	80,45±0,16 ^a
90	73,74±0,74 ^c

¹NaCl (0,5M, pH 6,98) como solvente; ²Relação M:V de 1:30; ³Cálculos com base na proteína total da farinha desengordurada (%N.6,25). ⁴Resultados representam Média±desvio padrão de três determinações. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

O perfil de solubilidade de uma proteína é uma importante característica e está relacionado a outras propriedades importantes, afetando textura, cor e propriedades sensoriais de produtos nos quais serão empregadas (MENG; MA, 2002). Essa solubilidade protéica é resultado, entre outros fatores, da interação polar com o solvente, interações iônicas com sal presente na solução e de forças eletrostáticas de repulsão. O pH afeta a natureza e a distribuição de cargas da proteína, por isso as proteínas apresentam diferenças de solubilidade em função do pH do solvente e, de um modo geral, esta é maior em pH alcalino, mínima na faixa

de pH 4,0 a 5,0 (ponto isoelétrico), com algumas proteínas apresentando alta solubilidade em extremos de pH ácido (LOURENÇO, 2000; NEVES *et al.*, 2003).

O efeito combinado de pH e concentração salina na solubilidade da proteína total da amêndoa de baru é demonstrado na Figura 3. Nota-se pela análise da figura que a solubilidade das proteínas tem um comportamento típico de solubilidade de globulinas, com valores máximos nos pHs 2,0 e pHs acima de 8,0. Pode-se observar que, na ausência de sal, a menor solubilidade das proteínas é verificada entre os pHs 3,5 e 5,0. Verifica-se também que o aumento das concentrações de NaCl provocou alterações nos perfis das curvas de solubilidade, ocorrendo a redução na solubilidade em valores de pHs abaixo de 3,5 e, aumento com a concentração salina a partir do pH 4,0, sendo substancial à concentração de 1 M de NaCl.

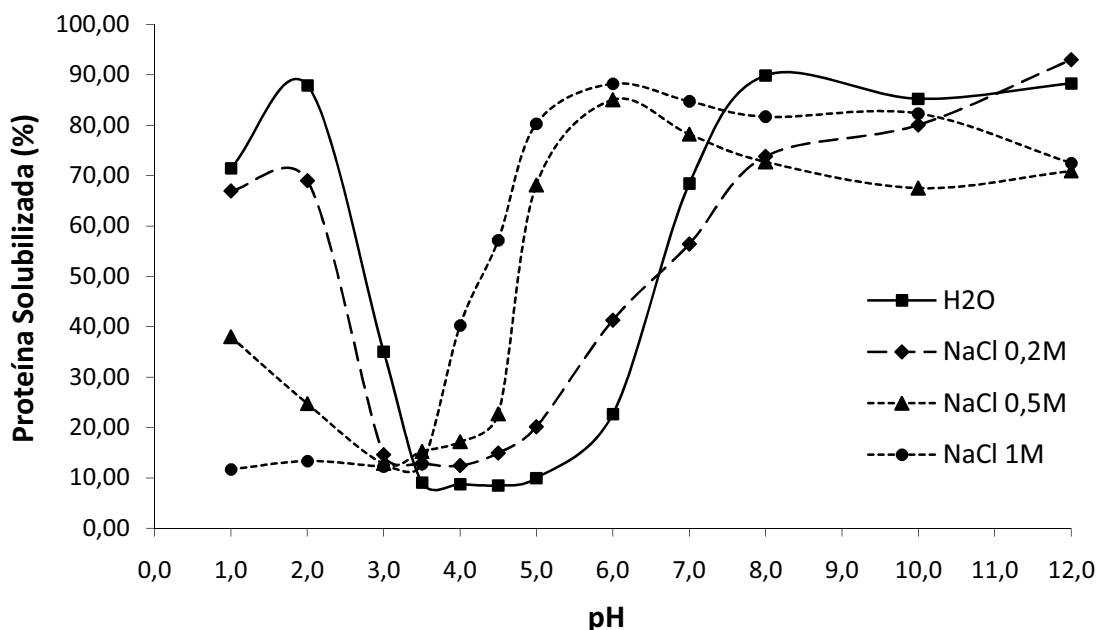


Figura 3: Efeito do pH e Concentração de NaCl na solubilidade das proteínas da farinha de amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vog.) desengordurada. Relação m:V de 1:30; pHs ajustados com NaOH ou HCl; Quantificação de proteína solúvel pelo método de Lowry *et al.* (1951). Cálculos com base na proteína total da farinha desengordurada (%N x 6,25).

A possível explicação para esse comportamento é que em pHs abaixo de 4,0-4,5 e em baixa força iônica (concentração salina), o número de cargas positivas da molécula tende a aumentar, e essa protonação exerce um efeito de expansão da molécula por repulsão, o que favorece sua solubilidade. A presença do sal em concentrações crescentes acarretaria no rompimento dessas forças, redução de interações por pontes de hidrogênio, aumento na hidrofobicidade de superfície e formação de agregados moleculares por interação hidrofóbica, com reflexos na solubilidade (NEVES *et al.*, 2003).

Estas observações estão de acordo com as reportadas por diferentes autores estudando a solubilidade de proteínas de outras leguminosas e também outras fontes. Em um trabalho de caracterização da fração globulina de feijão adzuki (*Phaseolus angularis*), Meng e Ma (2002) compararam o perfil de solubilidade dessa proteína com o de um produto comercial de proteínas de soja. Os autores observaram mínima solubilidade em pH 5,0 para a globulina e em pH 4,0-5,0 para as proteínas de soja, bem como altos valores de solubilidade em valores extremos de pH para ambas, sendo que a solubilidade da globulina do feijão foi mais alta que as proteínas do produto de soja em algumas faixas de pH, especialmente em pHs ácidos. Kaur e Singh (2007), caracterizando as proteínas de isolados protéicos de diferentes cultivares indianas de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) observaram que a solubilidade dos materiais em estudo foi mínima nos pHs 4,0 e 5,0 e máxima em pH 2,5 e 7,0, sendo que, acima do pH 6,5 todas as proteínas apresentaram solubilidade maior que 70%. A solubilidade das proteínas de um tipo de cereal, o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench), estudada por Tang e Wang (2010), apresentou esse mesmo perfil. Nesse estudo, os autores compararam a solubilidade em função do pH da albumina, globulina e do isolado protéico desse cereal, e observaram que

a solubilidade da globulina e do isolado protéico foi mínima em torno do pH 4,8 (10%) e aumentou gradualmente abaixo do pH 4,0 e acima do pH 6,4. Em contraste, a solubilidade da albumina foi muito menos dependente de pH, com solubilidade entre 68 e 84% mesmo em torno do pH 4,8. Ogunwolu *et al.* (2009) avaliaram, dentre outras propriedades funcionais, a solubilidade de proteínas da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) em função de pH, sem adição de qualquer sal. As proteínas da farinha desengordurada, concentrado protéico e isolado protéico apresentaram solubilidade mínima (8%; 10% e 30%, respectivamente) na faixa de pH 4,0-4,5 e solubilidade máxima (85%; 98% e 96%, respectivamente) em pH 12,0.

5.3. SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS

Os valores obtidos na extração e isolamento sequencial das frações protéicas da amêndoa de baru estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Composição das frações protéicas da farinha de amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vog.) desengordurada

Frações ¹	Proporções de Proteína ²	
	mg/g de farinha ³	(%)
Farinha desengordurada	436,1±0,87	100
Globulina	269,26±3,8	61,74±0,87
Albumina	60,94±2,45	13,97±0,56
Glutelina	14,19±1,09	3,25±0,25
Prolamina	2,09±0,45	0,48±0,10
Proteína insolúvel	20,12±1,81	4,61±0,42

¹Fracionamento de Osborne. ²%N.6,25, Determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995).

³Resultados representam Média±desvio padrão de três determinações.

Observa-se pelos resultados apresentados na tabela que a fração globulina do Baru é predominante, em comparação às outras, correspondendo a 61,74% da proteína total da semente, seguida das frações albumina (13,97%), glutelina (3,25%) e prolamina (0,48%). No resíduo final permaneceram insolúveis 4,61% das proteínas totais. Portanto, do total das proteínas presentes na amêndoa, 84% foram solubilizadas e recuperadas durante o fracionamento protéico empregado.

É fato que diferentes espécies de leguminosas apresentam teores variáveis de albuminas (8-14%) e de globulinas (30,5-42%) (BHATTY, 1982); no entanto, essas diferenças, mesmo entre cultivares de uma mesma espécie, podem ser consequência também de possíveis aspectos metodológicos do processo de obtenção das frações; e nesse caso são nos teores de globulinas onde se observam as maiores diferenças (DE-SHPANDE; NIELSEN, 1987; CARBONARO *et al.*, 1997). A água solubiliza não apenas albuminas, mas também uma porção de globulinas devido a sais presentes naturalmente nas sementes, os quais podem fornecer força iônica suficiente para afetar parcialmente a solubilidade das globulinas (VENKATACHALAM; SATHE, 2007). Por isso, após a extração protéica em água, foi feita a diálise do material contra água destilada a fim de precipitar a porção de globulinas, posteriormente acrescida de parte da fração globulina extraída com NaCl.

A predominância da fração globulina na semente de baru é esperada e consistente com o que é observado em várias outras sementes, no entanto, as proporções entre as frações protéicas apresentam-se distintas para diferentes espécies, variedades e cultivar botânica (LOURENÇO, 2000).

No fracionamento das proteínas de feijão caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) a fração globulina também foi predominante em comparação às outras, correspondendo a 41,99% da proteína total da semente, seguida das frações

albumina (10,1%) e glutelina (7,8%) (NEVES *et al.*, 2003). Valores próximos foram observados no tremçoço doce, com as frações globulina, albumina e glutelina correspondendo, respectivamente, a 43,4%, 10% e 16,3% do total (NEVES; SILVA JR; SILVA, 2006).

Na caracterização de proteínas de um tipo de feijão tropical (*Lablab purpureus* L.), foram encontrados 45,1% de globulinas, 30,3% de glutelinas, 22,8% de albuminas e 1,8% de prolaminas no total das proteínas solubilizadas na semente (VENKATACHALAM; SATHE, 2007). No fracionamento protéico do feijão *moth* (*Vigna aconitifolia* L.), em relação ao total protéico, observou-se 63,93% de globulinas, 27,83% de glutelinas, 5,06% de albuminas e 3,17% de prolaminas (SATHE; VENKATACHALAM, 2007).

Na semente de sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.), fruta brasileira encontrada na região amazônica, globulinas perfizeram a fração protéica principal, representando 58,7% das proteínas totais, seguidas de glutelinas (20,2%), albuminas (20,1%) e prolaminas (1,0%) (DENADAI *et al.*, 2007).

Em contraste, nas sementes de um tipo de melão azedo (*Momordica charantia*) Horax *et al.* (2010) observaram que a albumina correspondeu a 42,9% das proteínas totais, a globulina a 29,4% e a glutelina a 3,1%, enquanto a prolamina não foi detectada.

Pelos resultados observados nos estudos de solubilidade e do predomínio quantitativo da fração globulina podemos concluir, no caso da amêndoa de baru, tratar-se de proteína típica de semente de leguminosas e cujas propriedades da fração majoritária determinam em grande parte a sua aplicação em diferentes sistemas alimentares.

5.4. PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS

A eletroforese das proteínas nativas revela que o procedimento foi eficaz, visto que as frações albumina e globulina não apresentaram bandas protéicas contaminantes como observado na Figura 4.

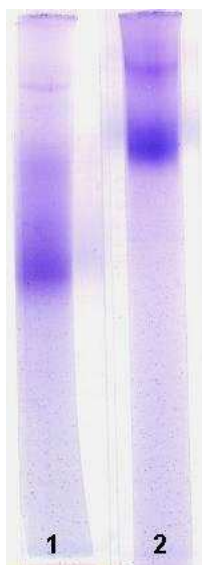


Figura 4: Eletroforese das proteínas nativas em gel de poliacrilamida em condições não-dissociantes. 1: Albuminas (30 µg); 2: Globulina Total (15 µg).

Considerando que a PAGE não-desnaturante e não-dissociante separa proteínas com base em sua carga negativa, observa-se que as albuminas apresentaram maior carga líquida negativa e, por isso, migraram mais rapidamente do que as globulinas.

O perfil eletroforético na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) das frações protéicas da farinha desengordurada de baru com e sem agente redutor (β -mercaptoetanol) está apresentado na Figura 5.

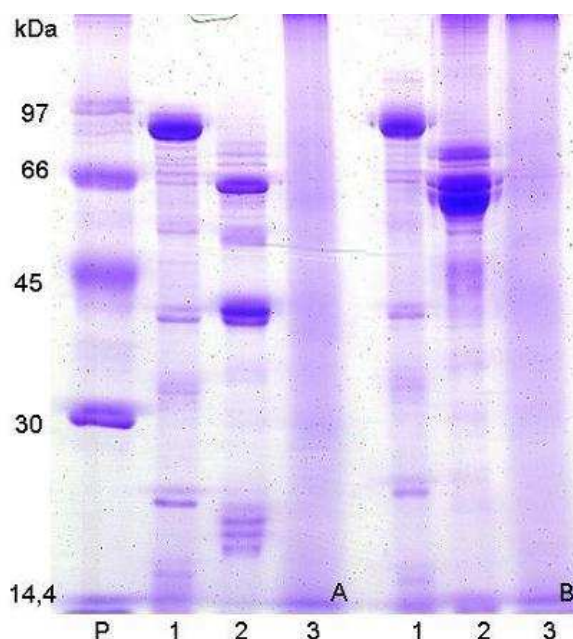


Figura 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol (A) e com SDS (B) das proteínas da farinha de amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vog.) desengordurada. P: padrão de pesos moleculares. 1: Fração Albumina; 2: Fração Globulina; 3: Fração Glutelina.

Observando a figura e baseando-se na intensidade de coloração das bandas, nota-se na cavidade 1 (gel B), que revela o perfil da fração albumina, 1 banda principal na faixa de 84 a 85 kDa (42%) e outras várias bandas difusas de menor intensidade e menores pesos moleculares. Quando submetidas ao tratamento com β -mercaptoetanol, as subunidades não apresentaram grandes alterações (cavidade 1, gel A).

Na cavidade 2 (gel B), que revela o perfil da fração globulina, nota-se bandas protéicas com pesos moleculares entre 30 e 76 kDa. Entretanto, como principais subunidades aquelas de pesos moleculares 62-64 (47%), 66 (17%) e 73-76 (10%) kDa. Quando submetidas ao tratamento com β -mercaptoetano (cavidade 2, gel A) originaram 2 bandas protéicas de PM 42 e 44 kDa (16% cada), 1 banda de 56 kDa (12%) e 3 bandas na faixa entre 20 e 22 kDa (8% cada). O polipeptídeo de 66 kDa permaneceu evidente (22%). Observa-se a presença de 2 bandas protéicas pouco

intensas (3% cada) em 73 e 76 kDa. O aparecimento de novas bandas indica a provável presença de ligações de dissulfeto unindo subunidades básicas e ácidas, ligações que foram reduzidas na condição da corrida.

Na cavidade 3, onde foi aplicada a fração glutelina, não foram percebidas bandas definidas.

5.5. DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*: PROTEÍNAS TOTAIS E GLOBULINAS

Os percentuais de hidrólise das proteínas totais da farinha desengordurada e da fração globulina total da amêndoa de Baru obtidos após o tratamento pela sequência enzimática pepsina-pancreatina, bem como a digestibilidade *in vitro* em relação à proteína padrão (caseína) estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Digestibilidade *in vitro* da farinha desengordurada e da fração globulina total da amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vog.)

Proteína	% de hidrólise ¹	Digestibilidade (%) ²
Caseína (Padrão)	97,38±0,47 ^a	100
Farinha desengordurada	83,34±1,93 ^c	85,59±1,98
Globulina total	88,17±1,33 ^b	90,54±1,36

¹Frente às proteases pepsina e pancreatina. ²Em relação à caseína. Valores representam Médias±desvio padrão de ensaios em triplicata. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

As digestibilidades *in vitro* da proteína total e da globulina total da amêndoa de baru sem qualquer tratamento foram inferiores à da caseína (p<0,05). Entretanto, nota-se que em relação a digestibilidade *in vitro* normalmente apresentada por proteínas de leguminosas, tais como feijão de fava (*Vicia faba* L.), lentilha (*Lens culinaris* Medikus), grão de bico (*Cicer arietinum* L.) e feijão branco (*Phaseolus vulgaris* L.), com valores entre 73 e 83% (CARBONARO *et al.*, 1997), esses valores

foram pouco superiores, tanto para farinha quanto para a fração globulina total. A maior digestibilidade da fração globulina em relação à farinha ($p < 0,05$), sugere a presença de outros componentes naturais da semente que podem interagir com as proteínas ou com as proteases, com reflexos negativos na hidrólise, em especial a fração albumina que reúne inibidores de proteases da semente (NEVES; SILVA JR; SILVA, 2006).

Na literatura existem alguns trabalhos que avaliaram a digestibilidade *in vitro* das proteínas empregando-se o mesmo procedimento do presente estudo. A exemplo, o estudo de Neves, Silva Jr e Silva (2006), que avaliaram a digestibilidade *in vitro* da proteína total e globulina total de temço-doce e encontraram 68,7% e 83,0%, respectivamente. Do mesmo modo, Portari *et al.* (2005), que determinaram a digestibilidade *in vitro* da proteína da farinha de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) e das suas frações isoladas, antes e após 6 dias de germinação da semente, encontrando antes do processo de germinação teores de 72,3%, 51,2%, 76,9% e 87,5% para a proteína total da farinha, albuminas, globulinas totais e globulina majoritária (11S), respectivamente. No estudo, a germinação não melhorou a digestibilidade das proteínas avaliadas, com exceção da globulina principal, que apresentou valores aumentados e próximos ao da caseína (97,5%), e a fração albumina foi a que aparentemente influenciou a digestibilidade da proteína da farinha de grão de bico.

Monsoor e Yusuf (2002) avaliando a digestibilidade *in vitro* de concentrados protéicos de um tipo de ervilha (*Lathyrus sativus*), de lentilha (*Lens culinaris*) e de grão de bico (*Cicer arietinum*) observaram altos percentuais de hidrólise pelas enzimas pepsina-pancreatina. Antes do tratamento térmico dos concentrados protéicos de ervilha, lentilha e grão de bico os percentuais de hidrólise foram 93,4%,

95,2% e 89,0%, respectivamente; após aquecimento a 100°C por 5 minutos, esses aumentaram para 97,6%, 97,9% e 96,9%, respectivamente.

No estudo de Khattab, Arntfield e Nyachoti (2009), a digestibilidade *in vitro* de proteínas nativas de 2 variedades de feijão caupí (*Vigna sinensis* L.), 2 variedades de ervilha (*Pisum sativum* L.) e 2 variedades de feijão branco (*Phaseolus vulgaris* L.), avaliada por outro método, variaram de 70,5% a 82,3%, apresentando o feijão caupí valores mais baixos e o feijão branco valores mais altos.

A digestibilidade *in vitro* de isolados protéicos de 6 variedades de um tipo de leguminosa (*Mucuna*) foi avaliada por Adebowale *et al.* (2007), empregando-se procedimentos e enzimas diferentes dos aqui apresentados. No estudo, a digestibilidade dos isolados protéicos foi de 90,6% a 94,5%. O autor descreve que é esperada uma digestibilidade maior nos isolados protéicos devido à parcial desnaturação das proteínas e remoção de fatores antinutricionais em seu preparo.

Sabe-se que a digestibilidade de globulinas nativas varia com o gênero, espécie, variedade e cultivar das sementes das quais são extraídas (LOURENÇO, 2000). A exemplo, Montoya *et al.* (2008) avaliaram o grau de hidrólise pela sequência enzimática pepsina-pancreatina de faseolinas (7S) provenientes de 43 variedades de feijões (*Phaseolus vulgaris*). Para as faseolinas nativas e após tratamento térmico foram encontrados teores de hidrólise entre 11% a 27,4% e 56,9% a 95,7%, respectivamente. Já Tang, Chen e Ma (2009) compararam a digestibilidade *in vitro* pela sequência de enzimas pepsina-tripsina de isolados protéicos ricos em globulinas do tipo vicilinas (7S) provenientes de feijões adzuki (*Phaseolus angularis*), comum (*Phaseolus vulgaris*) e mungo (*Phaseolus aureus*). Os valores de digestibilidade observados nos isolados protéicos sem tratamento térmico

foram 64% para o feijão comum, 57% para o feijão mungo e 53% para o feijão adzuki.

5.6. CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO GLOBULINA

5.6.1. Ponto Isoelétrico (pI)

Na figura 6, observa-se o comportamento da fração globulica total, solúvel em 0,2 M de NaCl, em função de variações na faixa de pH 2 e 12. Observa-se maior turbidez (absorbância a 320 nm) e menor solubilidade (22,1%) em pH 4,8.

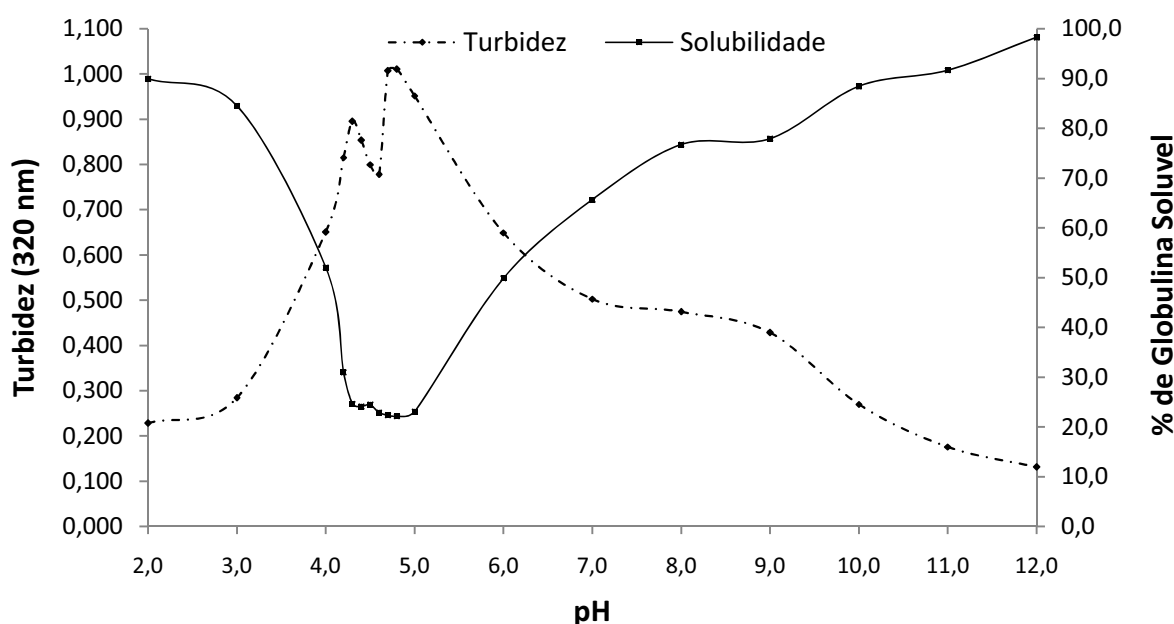


Figura 6: Determinação de Ponto Isoelétrico da fração globulina da amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vog.), extraída, isolada e solubilizada em solução de NaCl 0,2 M: turbidez (320 nm) e Percentual de globulina solúvel em diferentes pHs.

Devido ao perfil apresentado de elevada turbidez em pH 4,3, seguida de progressiva queda entre os pHs 4,4 e 4,7, e leve aumento em pH 4,8, buscou-se averiguar, através de análise eletroforética (figura 7), a existência e/ou predominância de diferentes bandas de proteínas precipitadas nessa faixa de pH, indicando dessa forma a existência possível de 2 valores de pI.

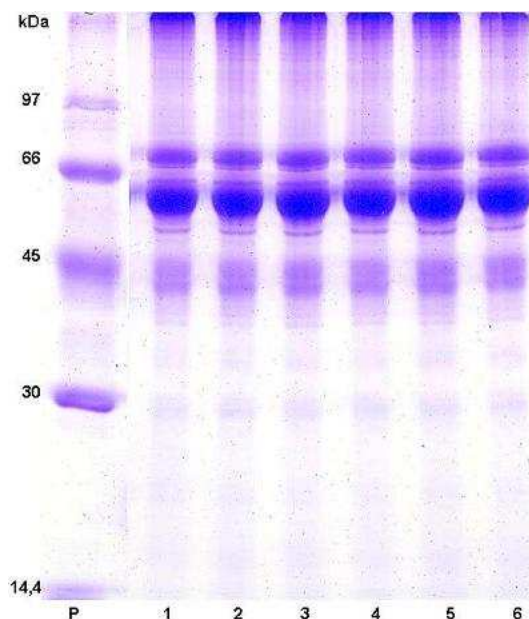


Figura 7: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS das globulinas precipitadas em diferentes pHs. P: padrão de pesos moleculares; 1: pH 4,3; 2: pH 4,4; 3: pH 4,5; 4: 4,6; 5: 4,7; 6: 4,8.

Como podemos notar na figura, não houve diferenças nas características das bandas protéicas das amostras precipitadas nesses pHs, indicando, portanto, que a proteína é melhor caracterizada em seu *pI* pela solubilidade do que pela turbidez e que nesse caso o *pI* da globulina se deu em pH 4,8.

5.6.2. Perfil Cromatográfico da fração globulina

a-) Sepharose CL-6B

A figura 8 mostra o perfil de eluição da fração globulina total em coluna de Sepharose CL-6B. Observa-se a presença de dois picos cromatográficos correspondentes às frações 41 e 76. O primeiro pico teve volume de eluição (*Ve*) próximo e anterior ao *Vo* (void) da coluna, apresentou certa turbidez e, embora tenha registrado alta absorvidade a 280 nm, não continha correspondente material protéico quando determinado pelo método de LOWRY *et al.* (1951). Nota-se que o segundo pico foi majoritário.

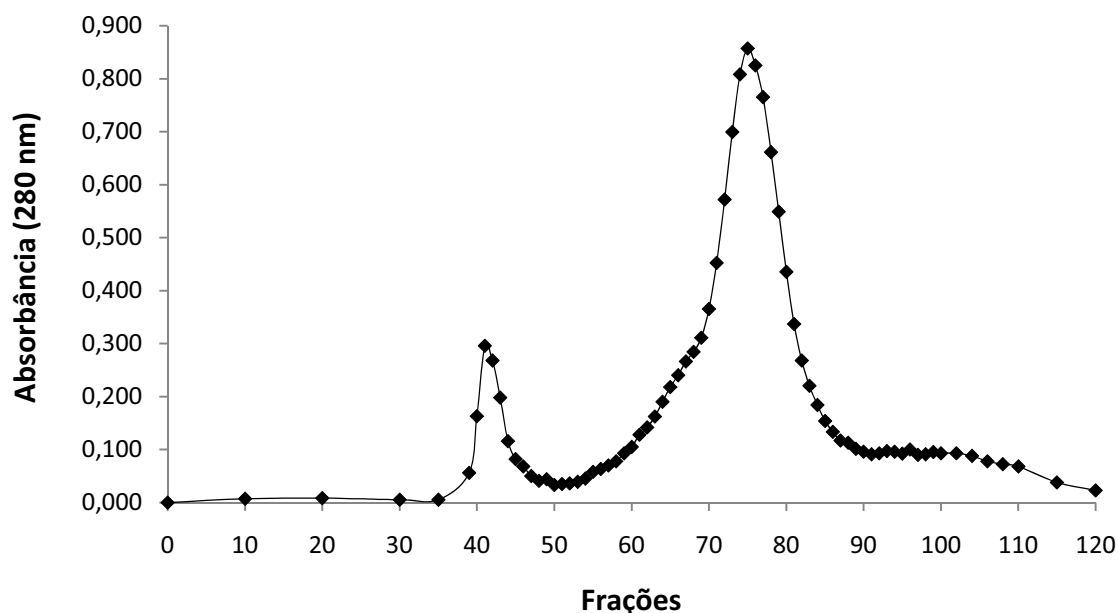


Figura 8: Perfil cromatográfico da fração globulina total da amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vog.), em coluna de Sepharose CL-6B (100 x 2,5 cm). A proteína foi eluída com auxílio de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,5), contendo 0,3 M de NaCl e 0,01% de azida sódica. Volumes de ~4,6 mL foram coletados por fração.

O perfil eletroforético do segundo pico dessa corrida cromatográfica é apresentado na figura 9. Nota-se que o pico cromatográfico majoritário apresentou as mesmas subunidades protéicas que a globulina total (linhas 1 e 2, respectivamente). Em condições não redutoras (lado B), as bandas protéicas principais foram aquelas de pesos moleculares 62-64 e 66 kD, e uma banda de menor intensidade a 73-76 kDa. Quando submetidas ao tratamento com β -mercaptoetanol (lado A), observou-se 2 bandas protéicas de PM 42 e 44 kDa, 3 bandas na faixa entre 20 e 22 kDa e 1 banda de menor intensidade a 56 kDa, além da permanência do polipeptídeo de 66 kDa.

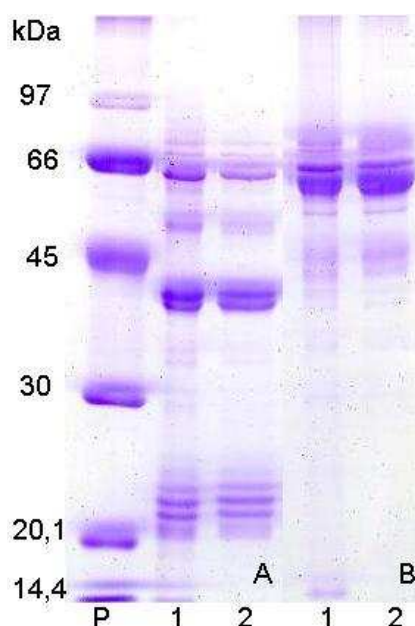


Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol (A) e com SDS (B) do pico majoritário eluído em coluna de Sepharose CL-6B. P: padrão de pesos moleculares. 1: Globulina total; 2: Pico cromatográfico.

Essa semelhança entre o pico cromatográfico e a globulina total poderia indicar a ineficiência desse gel na separação de possíveis formas protéicas ou, ainda, a existência de apenas uma forma majoritária na fração globulina total.

b-) Sephacryl S-300 HR

O perfil de eluição da fração globulina total em coluna de Sephacryl S300 está representado na Figura 10. Observa-se a presença de um primeiro pico com menor absorção a 280 nm (fração 21), um segundo pico com alta absorção (frações 25 a 27) e um terceiro pico com baixa absorção (fração 42). Semelhante ao observado na coluna de Sepharose CL-6B, o primeiro pico, eluído imediatamente após o void da coluna, apesar de absorção a 280 nm e um aspecto turvo, apresentou baixo teor de proteína na determinação pelo método de Lowry *et al.* (1951).

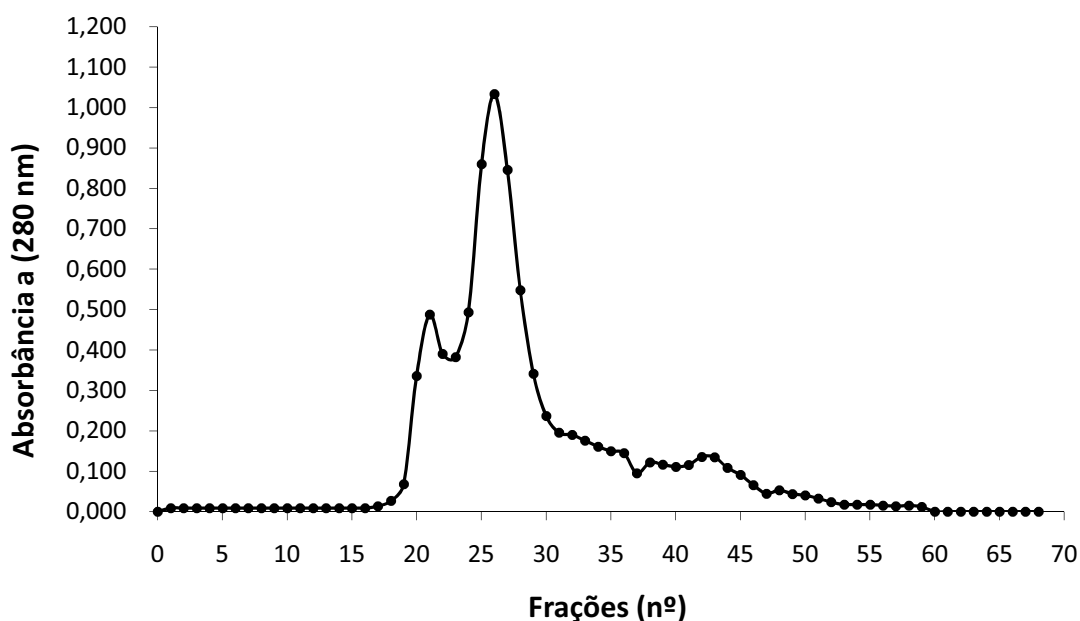


Figura 10: Perfil cromatográfico da fração globulina total da amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vog.), em coluna de Sephacryl S-300 HR (80 x 2,0 cm). A proteína foi eluída com auxílio de tampão fosfato de potássio 5,0 mM (pH 7,5), contendo 0,5 M de NaCl e 0,01% de azida sódica. Volumes de ~4,5 mL foram coletados por fração.

Na Figura 11 encontra-se o a eletroforese das proteínas nativas e em condições não-dissociantes dos picos eluídos na coluna Sephacryl S300 comparado à globulina total antes da passagem pela coluna.

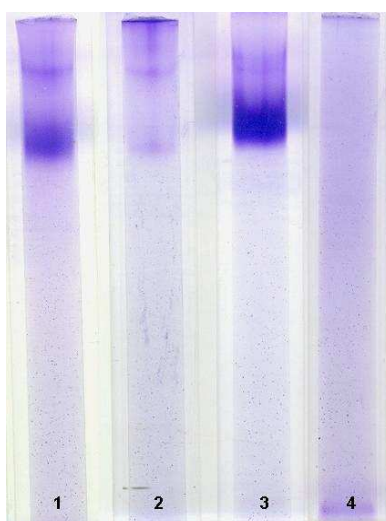


Figura 11: Eletroforese das proteínas nativas em gel de poliacrilamida em condições não-dissociantes. 1: Globulina Total (15 µg); 2: Pico - Fração 21 (10 µg); 3: Pico - Fração 26 (15 µg); 4: Pico - Fração 42 (15 µg).

Nota-se pela figura que o primeiro pico cromatográfico apresentou bandas na mesma posição que o segundo, entretanto, com coloração pouco intensa, indicando a presença das mesmas bandas de proteína presentes na fração 26 (pico majoritário), o qual mostra bandas com coloração mais intensa que as da globulina total, possivelmente por ter ocorrido sua concentração no processo cromatográfico. O terceiro pico, além de ter apresentado baixíssimo teor de proteína, não apresentou bandas no gel, portanto, é provável que a absorbância à 280 nm deve-se à presença de material que absorve a 280 nm.

A Figura 12 representando a relação V_e/V_o contra logaritmo de PM permitiu estimar um peso molecular de 405 kDa para a globulina eluída no pico da coluna de Sephacryl.

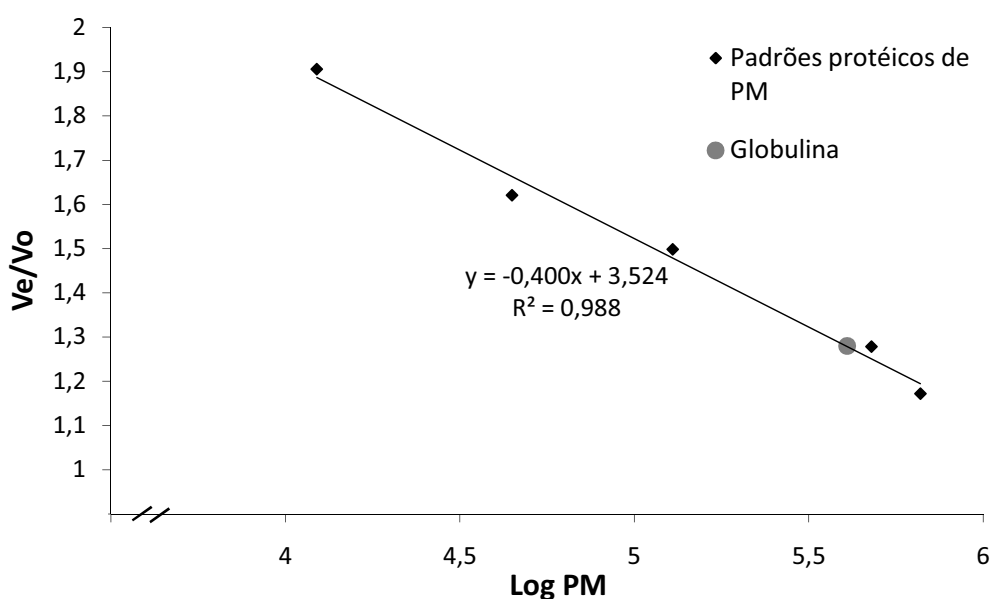


Figura 12: Estimativa de Peso Molecular (PM) da globulina de amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vog.) em coluna de Sephacryl S-300 HR (80 x 2,0 cm). Padrões de PM utilizados: tireoglobulina (669 kDa); ferritina (480 kDa); lactato desidrogenase (130 kDa); albumina de ovo (45 kDa); citocromo C (12,4 kDa).

O segundo pico cromatográfico da coluna Sephacryl S300 foi submetido à SDS-PAGE com e sem agente redutor β -mercaptoetanol, em comparação à fração globulina total, representada na Figura 13.

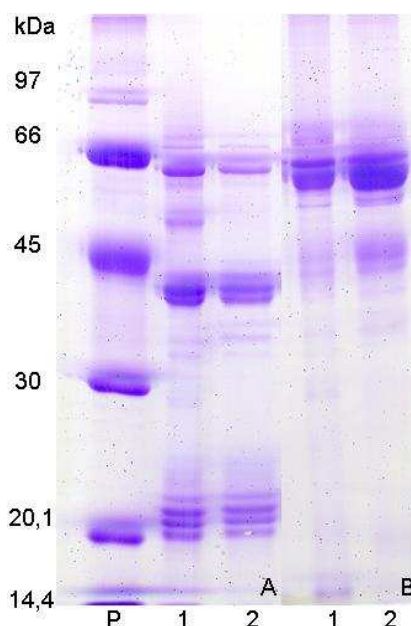


Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol (A) e com SDS (B) do pico majoritário eluído em coluna de Sephacryl S-300 HR. P: padrão de pesos moleculares. 1: Globulina total; 2: 2º pico cromatográfico.

A globulina total (linha 1), semelhante ao que foi observado nas figuras 5 e 9, apresentou em condições não redutoras (B) as bandas principais de PM 62-64 e 66 kDa. No pico cromatográfico (linha 2) observou-se esse mesmo perfil eletroforético, entretanto, com uma pequena concentração das bandas protéicas julgada pela intensidade de cor. Em condições redutoras (A), nota-se a presença de uma banda protéica a mais na globulina total em relação à cromatografada, a qual tem PM de 56 kDa. As demais cadeias polipeptídicas de PM 66, 42, 44 e de 20 a 22 kDa foram iguais.

c-) Sephadex G-200

O perfil de eluição da globulina total em coluna de Sephadex G-200 está representado na Figura 14.

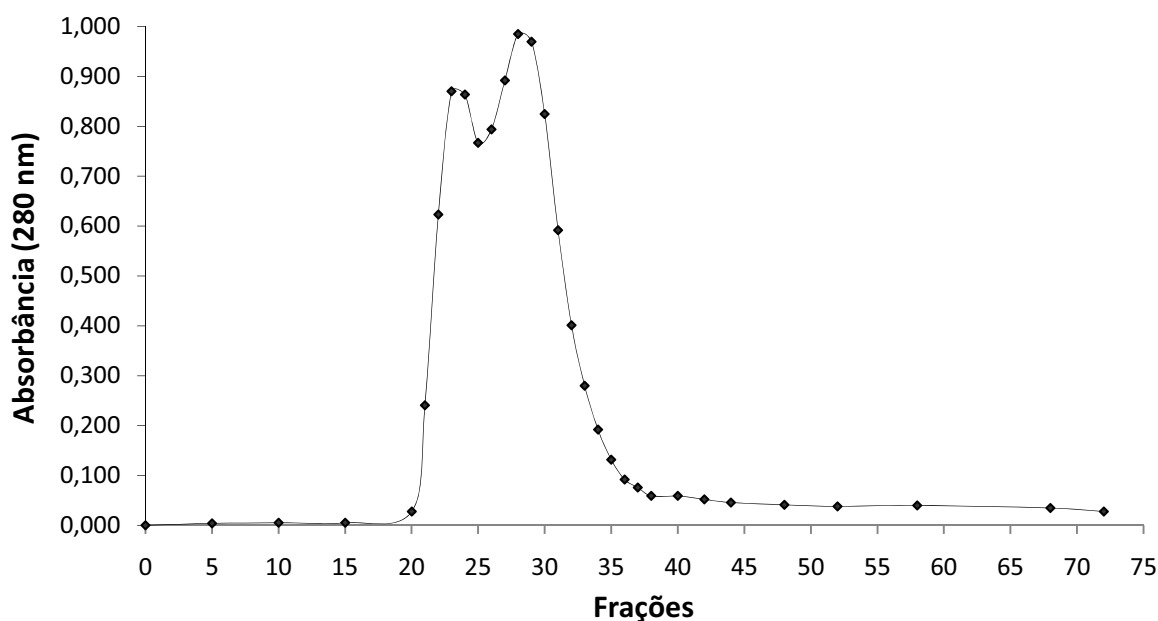


Figura 14: Perfil cromatográfico da fração globulina total da amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vog.), em coluna de Sephadex G-200 (50 x 2,5 cm). A proteína foi eluída com auxílio de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,5), contendo 0,5 M de NaCl e 0,01% de azida sódica. Volumes de ~3,5 mL foram coletados por fração.

Semelhante ao observado anteriormente nas outras colunas de filtração em gel, aqui também se verifica a presença de 2 picos com alta absorção a 280 nm (frações 23 e 28), sendo o primeiro pico eluído imediatamente após o void da coluna e, apesar de sua elevada absorção a 280 nm, apresentou menor teor proteína que o segundo na determinação pelo método de Lowry *et al.* (1951) e, também, um aspecto turvo.

A Figura 15 representa a SDS-PAGE em condições não redutoras (A) e redutoras (B) das frações referentes aos picos cromatográficos em comparação à fração globulina total.

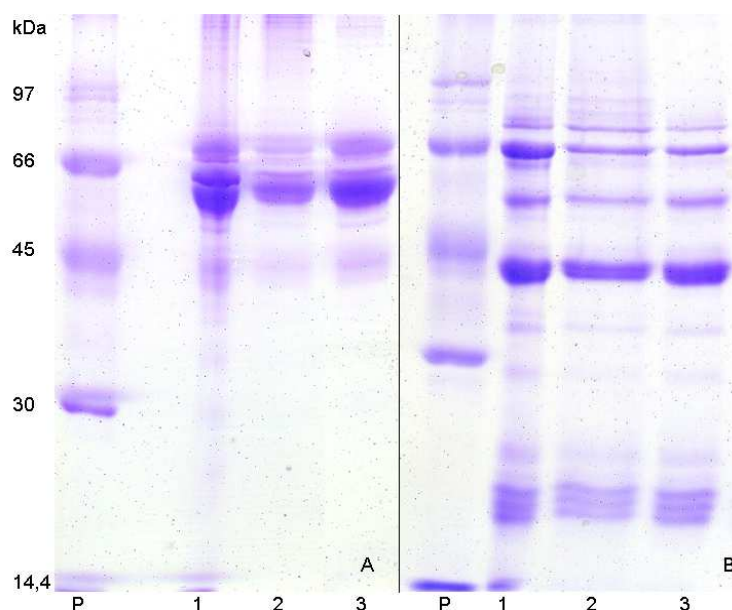


Figura 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (A) e com SDS e β -mercaptoetanol (B) dos picos eluídos em coluna de Sephadex G-200. P: padrão de pesos moleculares. 1: Globulina total; 2: 1º pico cromatográfico; 3: 2º pico cromatográfico.

Nota-se que os picos cromatográficos apresentaram as mesmas subunidades protéicas que a globulina total (linhas 1, 2 e 3). O primeiro pico cromatográfico apresentou menor intensidade na coloração das bandas, mas com o mesmo perfil eletroforético, indicando tratar-se, portanto, da mesma forma protéica contida no segundo pico.

A presença de pico túrbido junto ao void em cromatografia de filtração em gel tem sido relatado para preparações brutas de globulinas de diferentes sementes como: soja, linhaça, mostarda, trigo, amaranto e ervilha (MARCONE; KAKUDA; YADA, 1998); e grão-de-bico (PORTARI *et al.*, 2005; NEVES; LOURENÇO, 2001; KUMAR; VENKATARAMAN, 1980), correspondendo provavelmente a compostos de alto peso molecular que absorvem a 280 nm e que não penetraram no gel. Sathe *et al.* (1997) na purificação de globulinas de castanhas de caju, após a passagem do material em coluna Sephacryl S300, obtiveram no primeiro pico frações com o aspecto turvo, o que atribuíram à possível presença de grandes espécies

moleculares e agregados diferentes da globulina do estudo. Segundo Marcone, Kakuda e Yada (1998) a existência desse pico com alta turbidez parece ser uma característica comum em todos os estudos envolvendo preparações brutas de globulinas de sementes, e pode servir como uma identificação dessas preparações.

Através da curva de calibração da coluna Sephadex G-200, estimou-se PM de 436 kDa para a globulina majoritária, PM próximo ao encontrado anteriormente na coluna Sephacryl S-300 de 405 kDa.

O PM das proteínas em diversas espécies de leguminosas pode apresentar variações dos valores estimados na dependência de diversos fatores, tais como: espécie, variedade, cultivar, métodos de determinação entre outros. Segundo Derbyshire, Wright e Boulter (1976), as globulinas do tipo 7S (tipo vicilina) apresentam pesos moleculares no intervalo 120-200 kDa, enquanto as do tipo 11S (tipo legumina) na faixa de 300 a 400 kDa. No trabalho de Marcone, Kakuda e Yada (1998) a caracterização de globulinas 11S derivadas de 21 espécies monocotiledóneas e dicotiledóneas indicou que o PM dessas globulinas permanecem numa faixa entre 300 a 370 kDa.

O PM da fração 11S no grão de bico (*Cicer arietinum*) foi estimado em 325 kDa (NEVES; SILVA; LOURENÇO, 2004); em um tipo de feijão chinês (*Vigna radiata* L. Wilczek), em 360 kDa (MENDOZA *et al.*, 2001); na lentilha (*Lens culinaris* medik), 375 kDa (NEVES; LOURENÇO, 1995); e no feijão de lima (*Phaseolus lunatus*), 336 kDa (CHEL-GUERRERO *et al.*, 2007). Citando exemplos de 11S de outras famílias, na semente de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) o PM foi estimado em 400 kDa (CHEN; PAREDES-LOPEZ, 1997) e no endosperma de coco (*Cocos nucifera*) maduro, em 326 kDa (GARCIA *et al.*, 2005). Dessa forma, o PM estimado para a

globulina do presente estudo de 405-436 kDa indica tratar-se, possivelmente, de uma globulina do tipo legumina.

d-) Cromatografia de troca iônica

Essa similaridade entre a globulina total e a eluída em cromatografias de filtração em gel, revelada nas eletroforeses, levou-nos a verificação de possível separação em cromatografia de troca-iônica para constatar se realmente uma única forma majoritária de globulina seria detectada. O perfil de eluição da globulina total em coluna de troca iônica (DEAE-celulose) é apresentado na Figura 16.

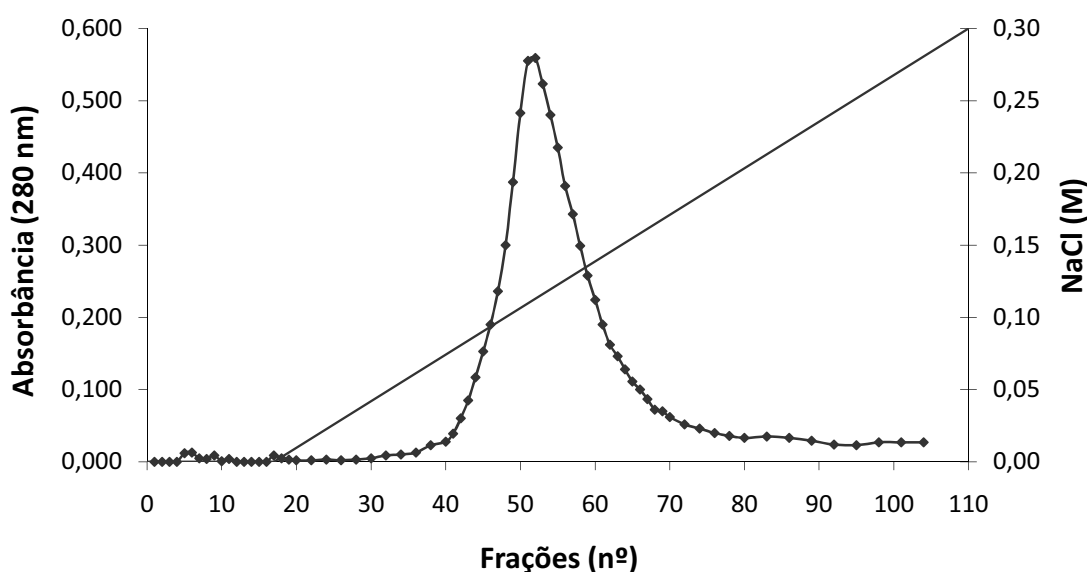


Figura 16: Perfil cromatográfico da fração globulina total da amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vog.), em coluna de Dietilaminoetil-celulose (18x1,5cm). As proteínas foram eluídas com tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,5), contendo gradiente linear de NaCl de 0 a 0,6 M. Volumes de ~4,5 mL foram coletados por fração.

Observa-se que a fração foi eluída em concentração próxima a 0,12 M de NaCl, apresentando um único pico. Marcone, Kakuda e Yada (1998) observaram que globulinas 11S isoladas de diferentes sementes de monocotiledóneas e dicotiledóneas, após serem cromatografadas em coluna de filtração em gel, exibiram

em cromatografia de troca aniônica ao menos um pico principal eluído em concentração próxima a 0,15 M de NaCl.

A SDS-PAGE desse pico cromatográfico, em comparação à globulina total, está apresentada na Figura 17. Em condições não redutoras (A), a globulina cromatografada (linha 2) apresentou como banda majoritária a de PM 62-64 kDa, sendo que outras bandas protéicas não foram tão aparentes quanto na globulina total; e, após o tratamento com β -mercaptoetanol (B), evidenciam-se bandas ácidas (42 e 44 kDa) e básicas (20, 21 e 22 kDa), e apenas uma banda protéica de leve intensidade a 66 kDa.

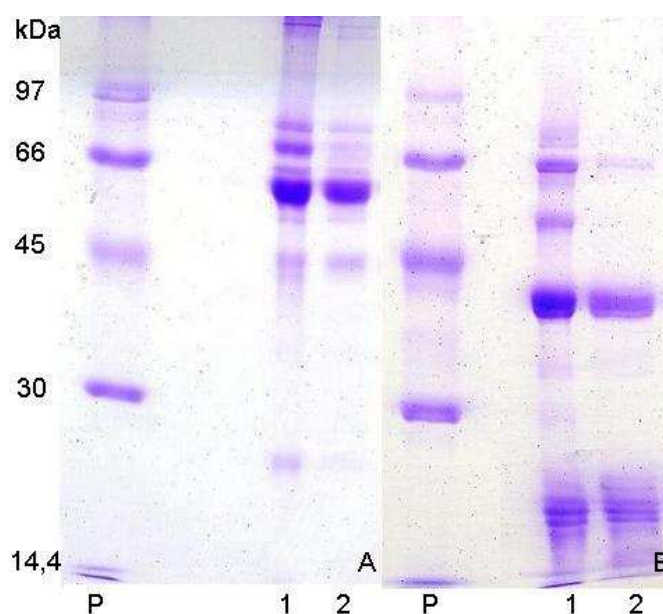


Figura 17: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (A) e com SDS e β -mercaptoetanol (B) do pico eluído em coluna de DEAE-celulose. P: padrão de pesos moleculares. 1: Globulina total; 2: Pico cromatográfico.

O perfil eletroforético mostra semelhança com o observado na globulina separada no pico da coluna de Sephacryl S-300, e demonstra que se trata de uma forma de legumina (11S) pelo fato de apresentar, sob condição redutora, as subunidades ácidas e básicas características dessa proteína em leguminosas e

unidas por ligações dissulfeto. Muitos estudos disponíveis na literatura de caracterização de globulinas 11S, provenientes de leguminosas ou não, observam, em SDS-PAGE, esse perfil apresentado pela globulina do Baru. A exemplo, a maioria das subunidades que compunham as 11S de sementes de mono e dicotilédoneas permaneceram em 2 faixas de PM: 20-27 e 30-39 kDa (MARCONE; KAKUDA; YADA, 1998).

Mendoza *et al.* (2001) na caracterização das globulinas de um tipo de feijão chinês (*Vigna radiata* L. Wilczek) observaram que a 11S em condições redutoras apresentou 2 bandas em 40 e 24 kDa, as quais ligadas por ligações dissulfídicas formavam 1 banda de 60 kDa. No estudo de Neves, Silva e Lourenço (2004), a globulina principal do grão de bico (*Cicer arietinum* L) apresentou 2 subunidades principais de 55 e 52 kDa e outras de menor intensidade de 40, 38 e 35 kDa e, na presença de agente redutor, polipeptídios de 41, 37, 35 e entre 18 e 20 kDa. Dessa forma, observaram que as subunidades de 55 e 52 kDa eram constituídas de dois ou mais peptídios unidos por meio de ligações de dissulfeto. No feijão de lima (*Phaseolus lunatus*), a 11S apresentou bandas protéicas de PM 54 e 40 kDa, cujas subunidades unidas por pontes dissulfídicas apresentaram aproximadamente 30 e 20 kDa (CHEL-GUERRERO *et al.*, 2007). A legumina da ervilhaca comum (*Vicia sativa* L.), denominada α -vicinina e caracterizada por Ribeiro, Teixeira e Ferreira (2004), em condições não redutoras apresentou subunidades de PM entre 50 e 78 kDa, as quais em condições redutoras originaram cadeias polipeptídicas de PM entre 34 e 66 e entre 21 e 23 kDa. A 11S da semente de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), caracterizada por Chen e Paredes-Lopez (1997), mostrou em condições redutoras ser composta por polipeptídeos principais em 32-34 e 22-24

kDa e uma banda minoritária em 50-52 kDa, a qual era maioritária em condições não redutoras.

5.6.3. Determinação de Carboidratos

A fração globulina mostrou ser composta por glicoproteínas, sendo o teor de carboidratos encontrado de 2,92%. Na globulina majoritária, isolada em cromatografia de filtração em gel Sephadex G200, a quantidade de açúcar encontrada foi de aproximadamente 0,32%. Segundo Derbyshire, Wright e Boulter (1976), as globulinas do tipo 11S entre as leguminosas *Glycine max*, *Arachis hypogaea*, *Phaseolus aureus*, *Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris* e *Brassica ssp* apresentam baixo teor de carboidratos, ou seja, menor que 1,0 %. Por outro lado, o teor de açúcares das do tipo 7S apresenta grandes variações situando-se entre 2-5%, com algumas espécies atingindo até 10%.

5.8. PERFIL DE HIDRÓLISE: GLOBULINA MAJORITÁRIA

Na figura 18 são apresentados os progressos de hidrólise da proteína padrão (caseína) e da Globulina Majoritária da amêndoa de Baru, obtida pela passagem em coluna de Sephadex G-200, conforme descrito anteriormente. Na figura, são demonstrados os teores de hidrólise provenientes dos ensaios com enzimas Tripsina (A), Quimotripsina (B) e Pepsina (C) em relação ao tempo de incubação e nas condições de ensaio estabelecidas na metodologia.

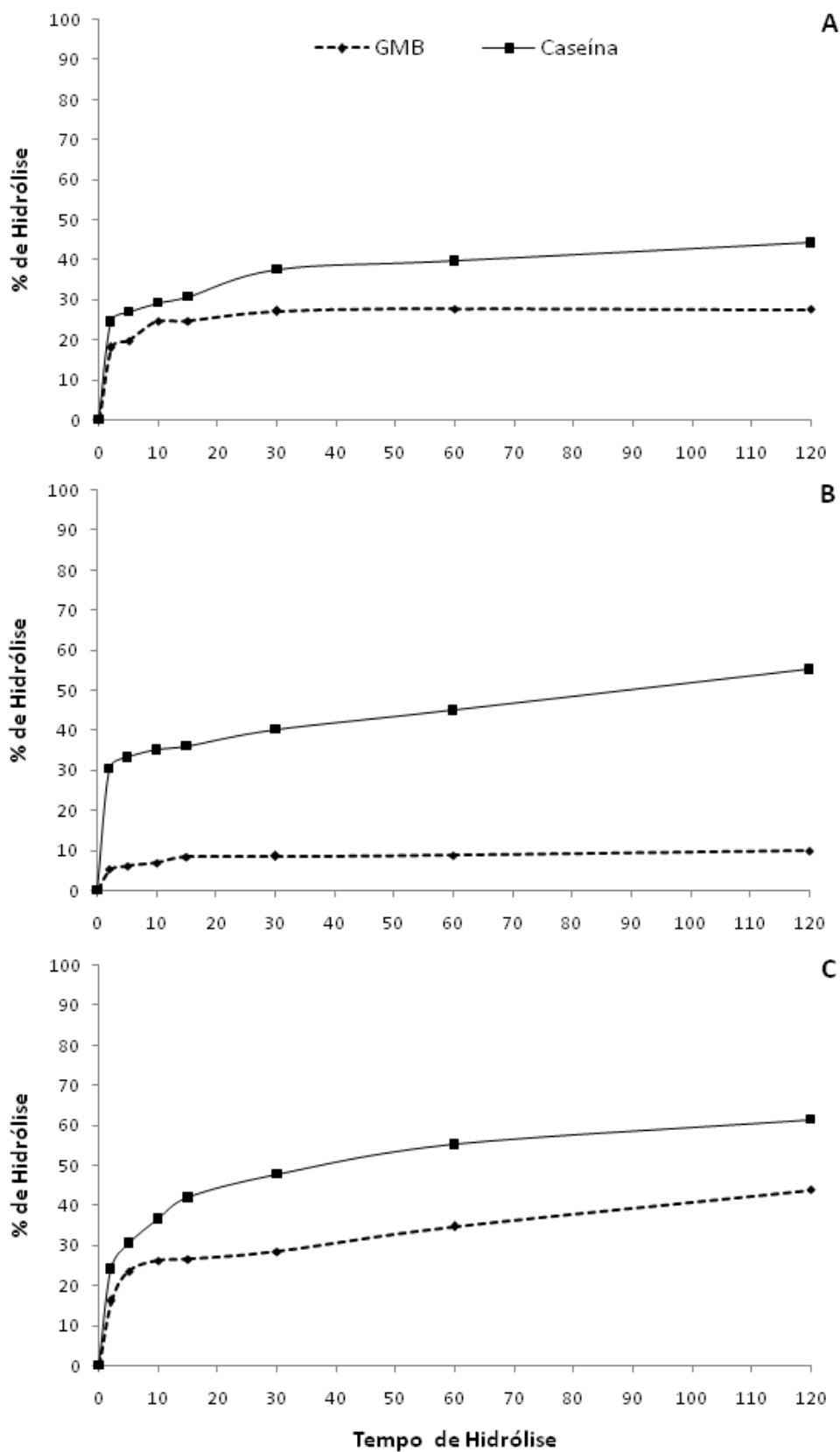


Figura 18: Percentual de hidrólise da Globulina Majoritária da amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vog., GMB) e Caseína, frente a ação das enzimas Tripsina (A), Quimotripsina (B) e Pepsina (C) em diferentes tempos de hidrólise. Valores em cada ponto representam a Média dos valores obtidos de ensaios realizados em triplicata

É possível notar que já nos primeiros 2 minutos de incubação as proteínas foram degradadas pela ação das enzimas tripsina (Figura 18, A) e pepsina (Figura 18, C), observando-se percentuais de hidrólise aproximados de 18% e 16% para a globulina majoritária, e 24% para a caseína. O percentual de hidrólise da caseína aumentou progressivamente até os 120 minutos (~44%) e o da globulina manteve-se estável à partir dos 30 minutos (~27%) de hidrólise triptica. Com a ação da pepsina, os percentuais de hidrólise também aumentaram progressivamente até os 120 minutos, observando-se valores aproximados de 44% e 61% para a globulina e caseína, respectivamente.

No caso da quimotripsina (Figura 6, B), cerca de 30% da caseína foi hidrolisada já nos 2 primeiros minutos e também progressivamente alterada até 120 minutos (~55%), enquanto a globulina apresentou percentuais constantemente baixos (de ~5 até ~10%).

Na Tabela 7 são apresentados dados referentes ao teor de hidrólise da globulina majoritária em relação à caseína no tempo máximo (120 minutos) do ensaio.

Tabela 7: Percentual de hidrólise da Globulina Majoritária de Baru (*Dipteryx alata* Vog.) e Proteína Padrão frente à diferentes enzimas após 120 minutos de hidrólise*

	Tripsina		Quimotripsina		Pepsina	
	VH ^a	% ^b	VH ^a	% ^b	VH ^a	% ^b
Caseína	44,28±1,29	100,00	55,23±0,07	100,00	61,57±1,34	100,00
Globulina Majoritária	27,62±0,07	62,38	9,90±1,58	17,92	43,95±1,12	71,38

*Valores representam Médias±desvio padrão de ensaios realizados em triplicata. ^aVH= valor de hidrólise, determinado pela reação com ácido 2,4,6-Trinitrobenzenossulfônico (TNBS); ^b%= Percentual de hidrólise em relação à Caseína.

Em relação à caseína, os percentuais encontrados para a globulina majoritária da amendoa de Baru nativa mostram maior resistência à ação da

quimotripsina (17,92%), seguida da tripsina (62,38%), e uma alta susceptibilidade da proteína à ação da pepsina (71,38%).

Avaliando a proteólise da globulina 11S de lentilha (*Lens culinaris*) nativa após 60 minutos de ação das enzimas tripsina e quimotripsina separadamente, Neves e Lourenço (1995) encontraram percentuais de hidrólise, em relação caseína, de 78% e 73%, respectivamente, sendo observada melhora na susceptibilidade à hidrólise dessa globulina quando aquecida. No trabalho de Neves, Silva e Lourenço (2004), foram observados percentuais de hidrólises da globulina principal de grão de bico nativa semelhantes: após 120 minutos de incubação 73,3 e 80% da globulina foi hidrolisado pelas enzimas tripsina e quimotripsina, respectivamente. A presença de NaCl 0,3 M nesse ensaio reduziu substancialmente os percentuais de hidrólise para ambas enzimas (48,7% e 52,8%, respectivamente).

O progresso da hidrólise da Globulina Majoritária da amêndoa de Baru também foi acompanhado em SDS-PAGE em condições redutoras, e estão apresentadas na Figura 19. Nota-se as diferenças das enzimas Tripsina (A), Quimotripsina (B) e Pepsina (C) nos seus respectivos perfis de hidrólise com o tempo de incubação.

Anteriormente à hidrólise (tempo 0) observa-se que a globulina majoritária apresenta 8 bandas com PM 20, 21, 22, 42, 44, 56, 66 e 72 kDa (Figura 19, linhas 1).

À partir dos 2 minutos de hidrólise triptica (Figura 19, A) as subunidades de PM acima de 42 kDa (ácidas), presentes na globulina majoritária nativa, foram hidrolisadas. Consequentemente, resultaram polipeptídeos de 26 e 27 kDa, os quais permaneceram resistentes mesmo após 120 minutos de incubação; um polipeptídeos de 23 kDa, que apresentou menor intensidade após 15 minutos de

hidrólise; e ainda outros 2 polipeptídeos de baixo PM, próximos à 14 e 15 kDa. Nota-se que as subunidades básicas, entre 20 e 22 kDa, não sofreram modificações na hidrólise com tripsina.

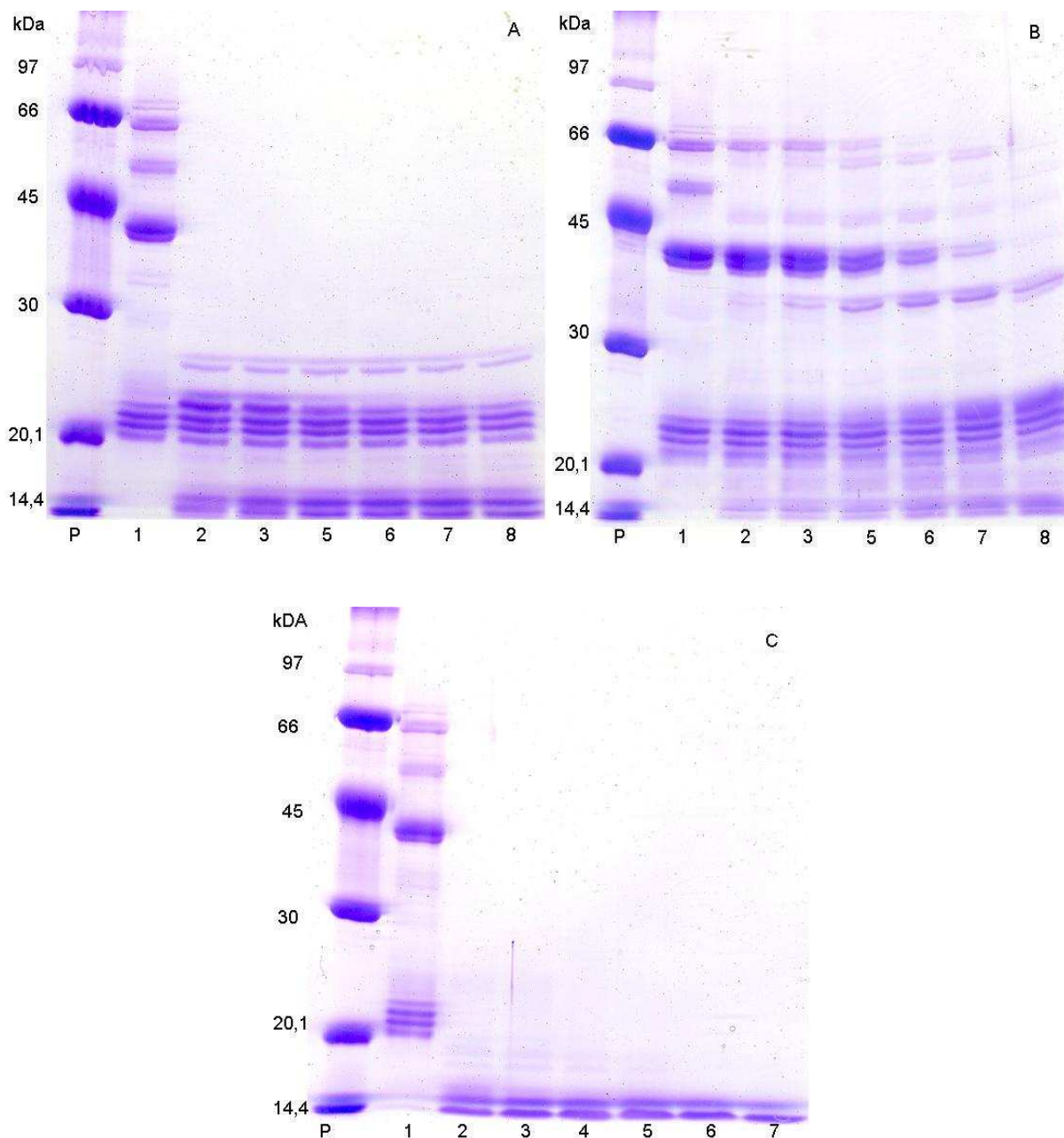


Figura 19: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol dos produtos de diferentes tempos de hidrólise da globulina majoritária da amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vog.) com a Tripsina (A), Quimotripsina (B) e Pepsina (C). Relação enzima:substrato, 1:10. P: padrão de pesos moleculares; 1 a 8 correspondendo aos tempos de hidrólise 0; 2; 5; 10; 15; 30; 60 e 120 minutos, respectivamente.

No caso da quimotripsina (Figura 19, B), após 2 minutos de incubação as subunidades de 72 e 56 kDa foram hidrolisadas e observou-se uma nova subunidade em 46 kDa, que praticamente desaparece após 120 minutos. A subunidade de 66 kDa foi progressivamente hidrolisada, não sendo mais encontrada após 15 minutos, tempo no qual surgiu um novo polipeptídeo de 62 kDa, que também desaparece após 120 minutos. As subunidades de 42 e 44 kDa também foram hidrolisadas progressivamente, não sendo encontradas aos 120 minutos. Um novo peptídeo em 35 kDa foi liberado após 2 minutos de hidrólise, permanecendo resistente até 120 minutos. Pelo perfil de hidrólise, esse peptídeo parece surgir da hidrólise daquele de 66 kDa, já que se nota também o surgimento de novas e difusas bandas entre 14,4 e 20,1 kDa a partir do mesmo tempo de 2 minutos. Observa-se também com a quimotripsina uma resistência à hidrólise das subunidades básicas, entre 20 e 22 kDa.

Quanto à ação da pepsina (Figura 19, C), nota-se hidrólise de todas as subunidades já aos 2 minutos de incubação. Dessa forma, considerando a intensidade das bandas observadas em SDS-PAGE, dentre as 3 proteases testadas, a pepsina foi a mais eficaz na hidrólise da globulina majoritária do Barú. Sathe e Venkatachalam (2007) analisaram o perfil eletroforético da fração globulina do feijão *moth* (*Vigna aconitifolia*) após a hidrólise das enzimas pepsina, tripsina e quimotripsina, separadamente, e observaram também que a pepsina foi a mais eficaz. Os autores afirmam que a maior eficiência da pepsina seria consequência de sua especificidade mais ampla. Além disso, o pH ácido (pH 1,0 a 2,0) normalmente utilizado nos experimentos ajuda a melhorar a susceptibilidade dos substratos à proteólise por uma possível desnaturação protéica.

No caso da 7S de grão de bico (*Cicer arietinum*) nativa, estudada por Tavano

e Neves (2008), o perfil eletroforético de produtos hidrolisados pelas mesmas enzimas aqui empregadas mostraram que esta globulina foi resistente à ação da pepsina pois, após 60 minutos de incubação, apenas uma cadeia polipeptídica entre 45 e 67 kDa e outra em torno de 30 kDa foram susceptíveis à hidrólise. Em contraste, a tripsina e a quimotripsina hidrolisaram rapidamente polipeptídeos de PM entre 30 e 67 kDa à polipeptídeos entre 21,5-29 kDa, que permaneceram resistentes aos 120 minutos de incubação, e próximos a 20 kDa, que foram degradados após 30 minutos de incubação. O tratamento térmico dessa 7S melhorou a susceptibilidade à hidrólise, principalmente pela pepsina. A hidrólise reduzida da forma nativa parece estar relacionada às limitações conformacionais e estruturais, ou seja, interações responsáveis pela estabilização da proteína restringe o acesso das proteases à ligações peptídicas do interior da globulina susceptíveis a ação específica de cada enzima (TAVANO; NEVES, 2008).

Acompanhando o progresso de hidrólise triptica da globulina principal de grão de bico em SDS-PAGE em condições redutoras, Neves, Silva e Lourenço (2004) observaram que polipeptídeos na faixa de 21,5 a 35 kDa foram resistentes à hidrólise até 60 minutos, sendo que na presença de 0,3 M de NaCl, esses peptídeos foram resistentes mesmo após 24 horas de incubação. No acompanhamento da hidrólise pela quimotripsina os autores observaram que a globulina foi progressivamente hidrolisada após 3 horas e até 24 horas de incubação, mas na presença do sal, o surgimento de frações de maior PM após 60 minutos de reação sugeriu a ocorrência agregação entre produtos de hidrólise. No entanto, no caso da globulina majoritária da amêndoa de Baru, os perfis de hidrólise observados nas condições experimentais do presente trabalho não revelaram reações de agregação nos produtos das hidrólises, como apontado pelos autores.

A hidrólise triptica da 11S da ervilha foi acompanhada por Plumb *et al.* (1989) em baixa e em alta força iônica (presença de 0,5 M de NaCl). Os autores observaram que em baixa força iônica, após 1 minuto de incubação o polipeptídeo ácido principal (43 kDa) foi hidrolisado, resultando polipeptídeos menores de 33-35 kDa, os quais foram progressivamente hidrolisados até 120 minutos de incubação, e os polipeptídeos básicos (21-23 kDa) principais foram hidrolisados após 120 minutos. Em alta força iônica, a tripsinólise foi menos acentuada com o tempo, sendo os polipeptídeos intermediários de 33-35 kDa, assim como os polipeptídeos básicos, mais resistentes à ação enzimática. Os autores sugerem que essa resistência de polipeptídeos básicos é explicada por sua posição no interior do complexo hexamérico, com cadeias de polipeptídeos ácidos no exterior. A diferença entre alta e baixa força iônica foi que, na primeira condição, o polipeptídeo intermediário apresentou uma estrutura comum com grande homogeneidade e resistência à hidrólise, enquanto que em baixa força iônica a tripsina pode hidrolisar essa cadeia intermediária, tornando as cadeias de polipeptídeos básicos acessíveis à ação hidrolítica.

No caso do presente estudo, a resistência à tripsinólise dos polipeptídeos básicos poderia estar relacionada à presença desse tipo de polipeptídeo intermediário de 26 e 27 kDa, no entanto, seria necessário, além de outros métodos para avaliação, a comparação do perfil de hidrólise dessa proteína sem a presença de NaCl, uma vez que as proteínas se encontravam em tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,5), contendo 0,5 M de NaCl e 0,01% de azida sódica.

Neves e Lourenço (1995) acompanhando em SDS-PAGE o perfil de hidrólise da 11S de lentilha (*Lens culinaris*) pela ação da tripsina em diferentes tempos observaram que bandas protéicas na faixa de 42 a 61 kDa foram prontamente

hidrolizadas à fragmentos menores (20 a 30 kDa). Os polipeptídeos de PM 26 e 20 a 22 kDa existentes no tempo 0 aumentaram em intensidade e não foram degradados mesmo após 24 horas de incubação. Os autores também acompanharam o perfil de hidrólise dessa proteína após a ação da quimotripsina e observaram que polipeptídeos entre 34 e 61 kDa foram menos susceptíveis à hidrólise até 60 minutos, os de 32 a 34 kDa não foram hidrolisados até 120 minutos e os próximos à 26 kDa tiveram progressiva diminuição na intensidade da banda com o tempo de incubação.

O acompanhamento do perfil de hidrólise da globulina majoritária (13S) da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) nativa, feito por Sathe *et al.* (1997), revelou que esta proteína foi facilmente hidrolisada pela pepsina à polipeptídeos de PM menor que 14 kDa após 30 minutos de hidrólise. Já a hidrólise pela tripsina e quimotripsina, no mesmo tempo, mostrou ser limitada, resultando em polipeptídeos de PM entre 10 e 32 kDa, sendo observada melhora dessa resistência à hidrólise após o aquecimento da globulina.

Observa-se que os valores obtidos pela reação com o TNBS estão coerentes com o que foi observado nos perfis eletroforéticos das hidrólises *in vitro* e na sequência pepsina-pancreatina descrita anteriormente. É importante salientar que o acompanhamento do perfil de hidrólise das globulinas 11S através de hidrólise limitada é uma ferramenta útil, em conjunto com outras técnicas, para a identificação de grupos de superfície, estudar a estrutura quaternária, conformação e interações de associação-dissociação, e obter informações sobre seu valor nutricional.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, observa-se que a proteína da amêndoa de Baru apresentou características de solubilidade típicas de proteínas de leguminosas onde predomina a fração globulina. No fracionamento protéico, esta fração representou 61,7% das proteínas totais da semente.

Nos ensaios de hidrólise *in vitro*, tanto a proteína total quanto a fração globulina da amêndoa nativas apresentaram elevada digestibilidade em comparação à caseína, o que pode indicar um bom aproveitamento biológico dessa proteína.

Os perfis cromatográficos observados sugerem que a fração globulina total da amêndoa de baru seria constituída majoritariamente de uma proteína do tipo legumina (11S), a qual foi eluída em coluna de troca-iônica em concentração próxima a 0,12 M de NaCl e apresentou peso molecular (PM) nativo estimado em 405-436 kDa.

Em SDS-PAGE, a globulina majoritária apresentou 3 bandas protéicas principais de PM 62-64, 66 e 73-76 kDa, as quais em condições redutoras mostraram ser formadas por subunidades ácidas (42-44 kDa) e básicas (20-22 kDa) unidas por ligações dissulfídicas.

A proteólise da globulina majoritária, isolada em Sephadex G-200, pela ação das enzimas tripisina, quimotripsina e pepsina, separadamente, demonstra que o perfil dos produtos de hidrólise de cada protease, após 120 minutos, indica comportamento similar ao observado com outras globulinas do tipo 11S de outras espécies de leguminosas.

REFERÊNCIAS

- ADEBOWALE, Y. A.; ADEYEMI, I. A.; OSHODI, A. A. NIRANJAN, K. Isolation, fractionation and characterisation of proteins from *Mucuna* bean. **Food Chemistry**, v. 104, p. 287–299, 2007.
- AKESON, W. R.; STAHPMAN, M. A. A pepsin-pancreatin digest index of protein quality evaluation. **Journal of Nutrition**, v. 83, p. 257-261, 1964.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 16. ed., v. 2. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- BHATTY, R.S. Albumin protein of eight edible grain legume species: electrophoretic patterns and aminoacid composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 620-622, 1982.
- BLIGH, E.C.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- CARBONARO, M.; CAPPELLONI, M.; NICOLI, S.; LUCARINI, M.; CARNOVALE, E. Solubility-digestibility relationship of legume proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3387-3394, 1997.
- CARBONARO, M.; GRANT, G.; CAPPELLONI, M. Heat-induced denaturation impairs digestibility of legume (*Phaseolus vulgaris* L and *Vicia faba* L) 7S and 11S globulins in the small intestine of rat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 65–72, 2005.
- CARBONARO, M.; GRANT, G.; CAPPELLONI, M.; PUSZTAI, A. Perspectives into Factors Limiting *in vivo* Digestion of Legume Proteins: Antinutritional Compounds or Storage Proteins? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 742-749, 2000.
- CHAVAN, U. D.; MCKENZIE, D. B.; SHAHIDI, F. Protein classification of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). **Food Chemistry**, v. 75, p. 145–153, 2001.
- CHEL-GUERRERO, L.; SCILINGO, A. A.; TINTORÉ, S. G.; DÁVILA, G.; AÑÓN, M. Physicochemical and structural characterization of Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) globulins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 1537–1544, 2007.
- CHEN, S.; PAREDES-LOPEZ, O. Isolation and characterization of the 11S globulin from Amaranth seeds. **Journal of Food Biochemistry**, v. 21, p. 53-65, 1997.
- COSTA, G. E. A.; QUEIROZ-MONICI, K. S.; REIS, S. M. P. M.; OLIVEIRA, A. C. Chemical composition, dietary fiber and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. **Food Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 327-330, 2006.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis II – Method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 121, p. 404-427, 1964.

DENADAI, S. M. S.; HIANE, P. A.; MARANGONI, S.; BALDASSO, P. A.; MIGUEL, A. M. R. O.; MACEDO, M. L. R. In vitro digestibility of globulins from sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.) nuts by mammalian digestive proteinases. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 535-543, 2007.

DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D., J.; BOULTER, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. **Phytochemistry**, v. 15, n. 1, p. 3-24, 1976.

DE-SHPANDE, S.S.; NIELSEN, S.S. Nitrogenous constituents of selected grain legumes. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 1321-1325, 1987.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 1350–1356, 1956.

DURANTI, M.; Consonni, A.; MAGNI, C.; SESSA, F.; SCARAFONI, A. The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 624-633, 2008.

DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, v. 77, n. 2, p. 67-82, 2006.

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

FIELDS, R. The Measurement of Amino Groups in Proteins and Peptides. **Biochemistry Journal**, v. 124, p. 581-590, 1971.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 6-29, 1996.

GARCIA, R. N.; AROCENA, R. V.; LAURENA, A. C.; TECSON-MENDOZA, E. M. 11S and 7S Globulins of Coconut (*Cocos nucifera* L.): Purification and Characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1734-1739, 2005.

GUIMARÃES, R. C. A.; VIANNA, A.C.; MACHADO, A. A.; FAVARO, S. P. Caracterização química da farinha desengordurada e obtenção do concentrado protéico de amêndoas de baru (*Dipteryx alata* Vog.). In: IX Simpósio Nacional de Cerrados e II Simpósio Internacional de Savanas Tropicais, 2008, Brasília. **Anais do IX Simpósio Nacional de Cerrados e II Simpósio Internacional de Savanas Tropicais**, 2008.

HORAX, R.; HETTIARACHCHY, N.; OVER, K.; CHEN, P.; GBUR, E. Extraction, Fractionation and Characterization of Bitter Melon Seed Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1892-1897, 2010.

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

KHATTAB, R. Y.; ARNTFIELD, S. D.; NYACHOTI, C. M. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments, Part 1: Protein quality evaluation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1107–1112, 2009.

KUMAR, K.G.; VENKATARAMAN, L.V. Chickpea seed proteins: Isolation and characterization of 10.3S protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 524-529, 1980.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-684, 1970.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal: Funep, 2000. 344 p.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARCONI, M. F.; KAKUDA, Y.; YADA, R. Y. Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants – I. Isolation/purification and characterization. **Food Chemistry**, v. 62, p. 27-47, 1998.

MARCONI, M. F. Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. **Food Research International**, v. 32, p. 79-92, 1999.

MARTINS, B. A. **Avaliação físico-química de frutos do cerrado in natura e processados para a elaboração de multimisturas**. 2006. 61f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável. Universidade Católica de Goiás, 2006.

MARTINS, J. M.; BENTO, O. P. As leguminosas como alimentos funcionais: o caso das dislipidémias e das doenças cardiovasculares. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 385-399, 2007.

MATUDA, T. G.; NETTO, F. M. Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 353-357, 2005.

MENDOZA, E. M. T.; ADACHI, M.; BERNARDO, A. E. N.; UTSUMI, S. Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] Globulins: Purification and Characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1552-1558, 2001.

MENG, G.; MA, C.-Y. Characterization of globulin from *Phaseolus angularis* (red bean). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 687–695, 2002.

MONSOOR, M.A.; YUSUF, H.K.M. *In vitro* protein digestibility of lathyrus pea (*Lathrus sativus*), lentil (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 97-99, 2002.

MONTOYA, C. A.; LETERME, P.; VICTORIA, N. F.; TORO, O.; SOUFFRANT, W. B.; BEEBE, S.; LALLÈS, J.-P. Susceptibility of Phaseolin to *in vitro* proteolysis is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 56, p. 2183–2191, 2008.

NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J. Changes in protein fractions, trypsin inhibitor and proteolytic activity in cotyledons of germinating chickpea. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, p. 269-275, 2001.

NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J. Isolation and *in vitro* hydrolysis of globulin G1 from lentils (*Lens culinaris*, medik). **Journal of Food Biochemistry**, v. 19, p. 109-120, 1995.

NEVES, V. A.; PEREIRA, D. D.; SHOSHIMA, A. H. R.; TAVANO, O. L. Características da solubilidade protéica e isolamento da globulina principal de Caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Cultivar BR 14-mulato. **Alimentos e Nutrição**, v.14, n.1, p. 47-55, 2003.

NEVES, V. A.; SILVA, M. A.; LOURENÇO, E. J. Caracterização e hidrólise *in vitro* da globulina principal de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), var. IAC-Marrocos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 139-145, 2004.

NEVES, V. A.; SILVA Jr, S. I.; SILVA, M. A. Isolamento da globulina majoritária, digestibilidade *in vivo* e *in vitro* das proteínas do tremçoço-doce (*Lupinus albus* L.), var. Multolupa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 832-840, 2006.

NIELSEN, N. C. The Chemistry of Legume Storage Proteins. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 304, p. 287-296, 1984.

OGUNWOLU, S. O.; HENSHAW, F. O.; MOCK, H.-P.; SANTROS, A.; AWONORIN, S. O. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut. **Food Chemistry**, v. 115, p. 852–858, 2009.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; CRUZ, G. A. D. R.; MENDES, F. Q.; COSTA, N. M. B. Digestibilidade *in vitro* e *in vivo* de proteínas de alimentos: estudo comparativo. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 13-23, 2006.

PLUMB, G. W.; CARR, H. J.; NEWBY, V. K.; LAMBERT, N. A study of the trypsinolysis of pea 11S globulin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 999, p. 281-288, 1989.

PORTARI, G. V.; TAVANO, O. L.; SILVA, M. A.; NEVES, V. A. Effect of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germination on the major globulin content and *in vitro* digestibility. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 807-812, 2005.

RIBEIRO, A.C.; TEIXEIRA, A. R.; FERREIRA, R. B. Characterization of Globulins from Common Vetch (*Vicia sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4913-4920, 2004.

ROCHA, L. S. **Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de pães de forma elaborados com subprodutos de baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. 2007. 52f. Dissertação (mestrado) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. **Baru: biologia e uso**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. 52 p.

SATHE, S. K.; SZE-TAO, K. W. C.; WOLF, W. J.; HAMAKER, B. R. Biochemical characterization and *in vitro* digestibility of the major globulin in cashew nut (*Anacardium occidentale*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2854-2860, 1997.

SATHE, S. K.; VENKATACHALAM, M. Fractionation and biochemical characterization of moth bean (*Vigna aconitifolia* L.) proteins. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, p. 600-610, 2007.

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

SHARMA, G. M.; MUNDOMA, C.; SEAVY, M.; ROUX, K. H.; SATHE, S. K. Purification and Biochemical Characterization of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* L.) Seed Storage Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5714–5723, 2010.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 945-956, 1995.

SHOSHIMA, A.H.R.; TAVANO, O.L.; NEVES, V.A. Digestibilidade *in vitro* das proteínas do caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) var. “BR-14 Mulato”: Efeito dos fatores antinutricionais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, p. 299-304, 2005.

SPADARO, A. C. C.; DRAGHETTA, W.; DEL LAMA, S. N.; CAMARGO, A. C. M.; GREENE, L. J. A convenient manual trinitrobenzenesulfonic acid method for monitoring amino acids and peptides in chromatographic column effluents. **Analytical Biochemistry**, v. 96, p. 317-321, 1979.

SUCHKOV, V. V.; POPELLO, I. A.; GRINBERG, V. Y.; TOLSTOGUSOV, V. B. Isolation and Purification of 7S and 11S Globulins from Broad Beans and Peas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 92-95, 1990.

TAKEMOTO, E.; OKADA, I. A.; GARBELOTTI, M.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S. Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata*

Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p.113 -117, 2001.

TANG, C.-H.; CHEN, L.; MA, C.-Y. Thermal aggregation, amino acid composition and *in vitro* digestibility of vicilin-rich protein isolates from three *Phaseolus* legumes: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 113, p. 957–963, 2009.

TANG, C.-H.; WANG, X. Y. Physicochemical and structural characterisation of globulin and albumin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. **Food Chemistry**, v. 121, p. 119-126, 2010.

TAVANO, O. L.; NEVES, V. A. Isolation, solubility and *in vitro* hydrolysis of chickpea vicilin-like protein. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 1244–1251, 2008.

TOGASHI, M.; SGARBIERI, V. C. Caracterização química parcial do fruto do baru (*Dipteryx alata*, Vog.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 14, n. 1, p. 85-95, 1994.

TOGASHI, M.; SGARBIERI, V. C. Avaliação nutricional da proteína e do óleo de semente de baru (*Dipteryx alata* Vog). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n. 1, p. 66-69, 1995.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4705-4714, 2006.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Val bean (*Lablab purpureus* L.) proteins: composition and biochemical properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 1539–1549, 2007.

VERA, R.; SOARES JUNIOR, M. S.; NAVES, R. V.; SOUZA, E. R. B.; FERNANDES, E. P.; CALIARI, M.; LEANDRO, W. M. Características químicas de amêndoas de barueiros (*Dipteryx alata* Vog.) de ocorrência natural no Cerrado do estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 112-118, 2009.

VIANNA, A. C. A; FAVARO, S. P. **Propriedades funcionais de isolado protéico de amêndoas de baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. Plano de trabalho da Universidade Católica Dom Bosco. Campo Grande, 2008. Disponível em: <<http://www.gpec.ucdb.br/pistori/pibic/planos2007/Antonio%20Camilo%20Arguelho%20Vianna.pdf>>. Acesso: 05/01/2009.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1573-1580, 2009.

CAPÍTULO II:

Partial characterization of proteins from baru (*Dipteryx alata* Vog) seeds.*

*Artigo enviado para publicação no **Journal of the Science of Food and Agriculture**
(Online ISSN: 1097-0010)

**PARTIAL CHARACTERIZATION OF PROTEINS FROM BARU (*Dipteryx alata*
Vog) SEEDS.**

Kézia Soares da Cruz¹
Maraiza Aparecida da Silva¹
Osvaldo de Freitas²
Valdir Augusto Neves^{1*}

ABSTRACT

BACKGROUND: The baru (*Dipteryx alata* Vog.) is a fruit disseminated in the Brazilian Savanna that contains an almond with a high protein content, whose properties have been explored little. The purpose of this study was to characterize this protein, especially by isolation and quantifying its fractions and measuring some of its molecular properties.

RESULTS: The baru seeds contained 244 g kg⁻¹ protein on a dry weight basis. Solubility profiles showed a typical behavior of the predominance of globulins. This fraction dominated the seed composition, with 61.7 wt% of the total soluble proteins. Albumins and glutelins accounted for 14 and 3.3 wt%, respectively. SDS-PAGE resolution of albumin and globulin showed main bands with molecular weights of 84 kDa and 64, 66 and 73 kDa, respectively. The total protein of the flour and the globulin showed values of *in vitro* digestibility of 85.59% and 90.54%, relative to casein. Total globulin produced only one chromatographic peak, both on Sepharose CL-6B gel filtration and on DEAE-cellulose ion-exchange columns, eluted at the concentration of 0.12 M NaCl.

CONCLUSION: The baru seed had high protein content with larger quantities of storage proteins. The chromatographic and solubility profiles indicate the predominance of a fraction with characteristics of a legumin-type protein.

Keys words: *Dipteryx alata* Vog; baru; proteins; fractionation; *in vitro* digestibility

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences. Food and Nutrition Department. São Paulo State University.

² Faculty of Pharmaceutical Sciences. Pharmaceutical Sciences Department. São Paulo University (USP).

*corresponding author: Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil. Telephone: 055 (16) 3301-6935; FAX: 055 (16) 3301-6920. E-mail: nevesva@fcar.unesp.br

1. INTRODUCTION

The Brazilian cerrado is a savannah-like bioma of great biodiversity, with a rich fauna and flora, which deserves to be preserved and the valued for its great potential. One of the native species found there is the "barueiro" (*Dipteryx alata* Vog.), a tree of the family Leguminosae, abundant in the states of Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás and Minas Gerais, whose fruit has a thin pale brown shell and a yellow pulp (mesocarp) with a sweet taste that envelopes a hard and edible "almond".^{1,2,3} Official data on the production and marketing of baru are scant however, much of this production and trade is based on extraction, which, if done in excess, is detrimental to the preservation of the species.^{2,3} Therefore, broadly speaking a detailed study of this fruit is necessary, to accrue data on the properties of one of the seed fruits from the cerrado, essential to its sustainable use and development.⁴

The baru seed, besides its high contents of oil and fiber, has a higher protein content than pea (*Pisum sativum* L.), common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), chickpea (*Cicer arietinum* L.) and lentil (*Lens culinaris* Med), whose reported values around 22%, 21%, 18% and 21%, respectively.⁵ Considering its potential use, its protein content is also higher than that of other nuts, such as almond (*Prunus dulcis*), Brazil nut (*Bertholletia excelssa*), cashew (*Anacardium occidentale*), hazelnut (*Corylus avellana*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), pecan (*Carya illinoensis*), pine nut (*Pinus pinea*), pistachio (*Pistacia vera*), walnut (*Juglans regia*) and peanut (*Arachis hypogaea*), whose values are between 7 and 22%.⁶ It is precisely this high protein content that has attracted interest in the possible development of protein products from this seed. Nevertheless, very little is recorded about its nutritional and functional characteristics.

The total protein fraction of legume seeds is a complex mixture of albumin, globulin, prolamin and glutelin, and as the largest fraction, the globulin is often responsible for the physical and nutritional properties of derived protein products.⁷ Thus, the isolation and characterization of these fractions are important, as a contribution to the basic and applied studies on seed proteins in general.

Studies in the literature on the human and animal nutritional potential of baru have focused on its general composition and minerals; characterization of lipids; nutritional quality and functional properties of seed total protein.^{1,4,8,9,10,11} However, there is a lack of detailed information about the characteristics of the seed protein, especially with regard to protein fractions, including characterization of their molecular properties, and the role of these fractions in the digestibility and quality of the total protein. This study was carried out to determine the chemical composition of baru seed and study the characteristics of its protein, especially the isolation, fractionation and quantification of the different fractions, their *in vitro* hydrolysis profiles, and the characterization of some molecular properties.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Material

The fruits were collected from trees (*Dipteryx alata* Vog.) in the Jussara district (Goiás State, Brazil). After being extracted from the pulp, the almonds (seeds) were peeled and crushed in a manual grain grinder, resulting in a whole meal, which was defatted with cold *n*-hexane (1:5, w:V), dried in a forced draft oven at 35 ° C and passed through a 60 mesh sieve, to obtaining a uniform defatted flour that was used in the studies.

2.2. Methods

2.2.1. Analysis of the chemical composition

Moisture content (drying at 105 °C to constant weight), protein (total nitrogen), lipids¹² ash (calcination of the sample in oven at 550 °C)¹³ and total carbohydrate (by difference) were determined in the whole meal and defatted flour from baru seeds.

2.2.2. Protein determinations

Total nitrogen (TN) was measured by the micro-Kjeldhal method¹³ and the protein content calculated by multiplying by the conversion factor of 6.25. Soluble proteins were determined by the LOWRY et al.¹⁴ method, with bovine serum albumin (BSA) as standard. Absorbance was measured at 280 nm to monitor the protein concentration in eluates from chromatographic columns.

2.2.3. Solubility tests on protein flour

2.2.3.1 – Effects of flour-to-solvent ratio (w:V) and time of extraction. In order to assess protein solubility, the sample (defatted flour) and solvent (0.5 M NaCl, pH 6.9) were mixed in ratios 1:10, 1:30 and 1:50 (w:v); then the extracts were subjected to mechanical stirring for 1 hour and centrifuged at 10,000 rpm for 30 min, after which soluble proteins were determined in the supernatant. The effect of time on the extraction was assessed by mechanical stirring of the extracts in 0.5 M NaCl (pH 6.9) solution for 30, 60 and 90 min., at the ratio 1:30 (w:v), followed by centrifugation at 10,000rpm/30 min and determination of soluble proteins in the supernatant. All determinations were done in triplicate. Data were treated by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test at a 5% significance level, for comparison between means, using BioStat ® 2007 software.

2.2.3.2 – Effect of pH and NaCl concentration. The protein solubility of the seed flour was measured over a range of pH (1.0 to 12.0) and NaCl concentrations

(0, 0.2, 0.5 and 1.0 M) at a flour to solvent ratio of 1:30 (w:v) and after 30 min of mechanical stirring. After centrifugation of the extracts at 10,000rpm for 30min, the concentration of soluble proteins was determined as previously described.

2.2.4. Protein fractionation

The sequential extraction of seed proteins was carried by the Osborne procedure with some modifications. The defatted flour was dispersed in H₂O (pH 7.0, ratio 1:30, w:v), subjected to mechanical stirring (60 min) and centrifuged (15,000 rpm for 40 min). The supernatant, after extensive dialysis against distilled water in appropriate membranes (pore size of about 10 kDa) for 24-36 hours, was again centrifuged, resulting in albumins (supernatant) and part of the globulins (precipitated). The residue was extracted with 0.5 M NaCl (pH 7.0, ratio 1:30, w:v) and, after centrifugation, the supernatant was dialyzed as described above, again centrifuged, resulting in another portion of globulins (precipitate), which was added to the first. The residue from NaCl extraction was successively extracted with 70% ethanol and 0.1 N NaOH to separate prolamins and glutelin fractions, respectively, and the final residue. The percentages of protein extracted at each stage were calculated with respect to the total protein content in defatted flour and quantified by nitrogen determination.

2.2.5. *In vitro* digestibility

The *in vitro* digestibility of the flour and total globulin from baru seed was determined by the Akeson and Stahman¹⁵ procedure using pepsin (Sigma P-7012) and pancreatin (Sigma P-7545) in sequence, incubated at 37°C for 3 and 24 h, respectively. The reaction was stopped by adding 10% trichloroacetic acid (TCA), followed by centrifugation (7,000rpm for 15min) and nitrogen was determined in the supernatant.

The percentage of hydrolysis (% H) was calculated by the formula 1:

$$(1) \quad \%H = \frac{Na - (Nba + Nbe)}{NT} \times 100,$$

Where: Na= soluble nitrogen in aliquot; Nba= soluble nitrogen in protein blank; Nbe= soluble nitrogen in enzyme blank; NT= total nitrogen in the aliquot.

The *in vitro* digestibility was calculated by comparing the percent hydrolysis (%H) of each sample with that of a standard protein, casein (Sigma C-8654), under the same conditions. All *in vitro* protein assays were performed in triplicate and data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). All values were presented as mean±standard. A difference was considered statistically significant when $P < 0.05$ (Tukey test) for comparison between means. The program BioStat® 2007 was used for all statistical tests.

2.2.6. Characterization of the globulin fraction

2.2.6.1 – Isoelectric point (IP) determination. Aliquots of the isolated globulin were dissolved in 0.2 M NaCl and pH was adjusted to 2.0 to 12.0, by adding NaOH or HCl solution, in intervals of 1 pH unit, and also 0.1 units between pH 4.2 and 5.0. After mild shaking for 10 min., the turbidity of these solutions was observed by measuring absorbance at 320nm, after which the aliquot was centrifuged (16,000 rpm for 15 min) and content of soluble proteins measured in the supernatants. The IP was taken as the pH at which the maximum turbidity and/or minimal solubility was observed.

2.2.6.2 – Gel filtration chromatography. The isolated globulin fraction was solubilized in 10 mM potassium phosphate (pH 7.5) buffer containing 0.3 M NaCl and 0.01% sodium azide, and then loaded on a column containing Sepharose CL-6B (100 x 2.5 cm) resin, previously equilibrated with the same buffer. Fractions of 4.5 mL each were collected with a FRAC-100 fraction collector and the protein was

monitored by UV absorbance at 280 nm. The void volume (V_0) of the column was determined by observing blue dextran 2000 elution.

2.2.6.3 – Ion-exchange chromatography. The isolated globulin fraction was solubilized in 50 mM potassium phosphate (pH 7.5) buffer containing 0.01% sodium azide and applied to a column containing diethylaminoethyl-(DEAE)-cellulose (18 x 1.5 cm), previously equilibrated with the same buffer. After protein adsorption, a linear gradient of NaCl (0 to 0.6 M) was applied, and fractions of 4.5 mL were collected and monitored at 280 nm.

2.2.6.4 – PAGE and SDS-PAGE. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was carried out by the method of Davis¹⁶ in vertical tubes containing 3% stacking and 7% separation acrylamide gels and SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-PAGE), as described by Laemmli¹⁶ with 12% acrylamide. The molecular weight markers employed were: milk lactalbumin (14.4 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa), bovine carbonic anhydrase (29 kDa), hen egg white albumin (45 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), and rabbit muscle phosphorylase (97 kDa). The electrophoresis was performed in Tris/glycine (pH 8.9) buffer containing 0.1% SDS, with a voltage drop of 150V. The relative mobility was determined by bromophenol blue marker dye migration. Coomassie brilliant blue was used for staining and acetic acid:methanol:water (1.5:1:17.5) for destaining of the gels, which were scanned (HP Scanjet 3500c ®) and, for identification and quantification of subunits, their images analyzed by densitometry with Alpha Ease ® FC (version 6.0) software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemical composition of baru seeds

The chemical composition of the baru seed flour is shown in Table 1 where an efficient reduction in the lipid content of the whole flour can be observed. The average protein content of the flour was 244 g kg⁻¹ which is close to values found by other authors, ranging from 245 g kg⁻¹ to 296 g kg⁻¹.¹ Vera *et al.*¹¹ reported an average protein content between 252 g kg⁻¹ and 278 g kg⁻¹ in baru almonds from 12 different regions in Goias State, Brazil.

Table 1: Chemical composition of the baru seed flour

Component*	Whole seed flour (%)	Defatted seed flour (%)
Protein (% N x 6.25)	24.40±0.35	46.79±0.93
Lipids	43.29±0.22	4.09±0.10
Ash	3.01±0.03	5.28±0.08
Total carbohydrates**	29.30±0.56	43.84±1.02

*Dry basis; **Calculated by difference. Values represent mean ± SD for three determinations

As baru seed is under consideration as a potential source of edible protein, it is of interest that its protein content is higher than that of other "nuts" such as Brazil nut (14-16%), pine nut (13%), pecan (9%), cashew (17.5%), hazelnut (14.5%) and close to that of pistachio (20%) and almonds (21%).¹⁸

3.2. Solubility of the proteins from baru seed

The solubility profile of a protein is an important characteristic, related to other relevant functional properties, so that it affects the texture, color and sensory properties of products in which it is employed.¹⁹ In the extraction of proteins from defatted baru flour, 81.6% solubilization in NaCl solution (0.5 M, pH 6.98) was observed at the flour:solvent ratio 1:30 (w:v), a percentage significantly higher than at 1:10 and 1:50, which solubilized 74.1 and 76.5%, respectively, which there was no statistically significant difference (p<0.05). It was observed that 60 min of extraction

was the most effective time tested, with 80.5% of the protein solubilized, while 30 and 90 min of stirring reached 78.6% and 73.7%, respectively.

The effect of pH on protein solubility of defatted baru flour in the absence and presence of NaCl is shown in Figure 1. This figure demonstrates that the solubility behavior is typical of proteins from leguminous seeds^{7,20,21} with maximum solubility at pH 2.0 and up to 8.0, and a minimum between pHs 3.5 and 5.0 (around the IP values), in the absence of salt. This profile was significantly altered when the protein was dissolved in solutions with increasing NaCl concentrations. A possible explanation for this behavior is that at pH below 4.0 to 4.5 and low ionic strength, the number of positive charges on the molecule tends to be higher, leading to its expansion by repulsion, favoring its solubility. Increasing the salt concentration would result in disruption of these forces, owing to reduced hydrogen bonding interactions, increased protein surface hydrophobicity and the formation of molecular clusters, as a consequence of hydrophobic interactions, reflected in the solubility.²²

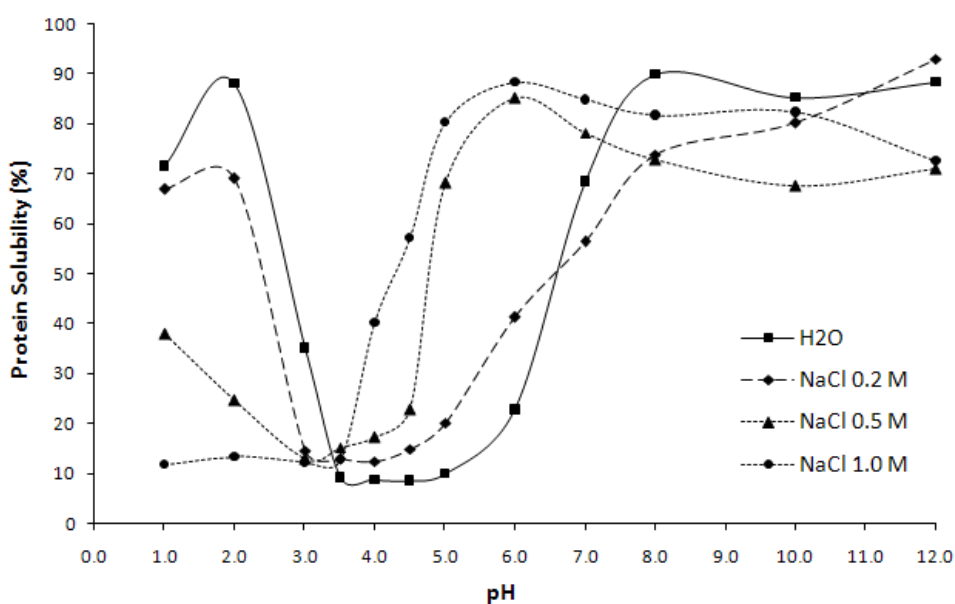


Figure 1: Effect of pH and NaCl concentration in the baru flour protein solubility. Mass to volume ratio 1:30; pH adjusted with NaOH or HCl. Quantification of soluble protein by LOWRY et al. (1951) method. Calculations based on total protein from defatted flour (% N x 6.25).

Similar results were obtained by Kaur and Singh²³ in the characterization of protein isolates from various Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars, in which the solubility was at a minimum in the pH range 4.0-5.0 and maximum at pH 2.5 and 7.0, while above pH 6.5 over 70% of all protein isolates were soluble. Meng and Ma¹⁹ observed minimum solubility at pH 5.0 for adzuki bean (*Phaseolus angularis*) globulin and in the pH range 4.0-5.0 for soy protein from a commercial product.

3.3. Protein fractionation

Table 2 shows that the globulin fraction was predominant, accounting for 61.74% of total seed protein, followed by albumin, glutelin and prolamin fractions. Only 4.61% of total proteins remained as insoluble residue and 84% of the total proteins present in the almond were solubilized and recovered by the fractionation technique used.

Table 2: Composition of the protein fractions of defatted baru seed flour

Fractions*	Protein**	
	mg/g of seed***	(wt %)
Defatted flour	436.1±0.87	100
Globulin	269.26±3.8	61.74±0.87
Albumin	60.94±2.45	13.97±0.56
Glutelin	14.19±1.09	3.25±0.25
Prolamin	2.09±0.45	0.48±0.10
Insoluble protein	20.12±1.81	4.61±0.42

*Osborne fractionation. **wt % N x 6.25; determined by Kjeldahl method (AOAC, 1995). ***Results represent mean ± SD for three determinations.

The contents of these fractions vary among different species and varieties of legume seeds. The globulin fraction from lupin seed accounted for 43.4% of the total proteins, and the albumins and glutelin for 10% and 16.3%, respectively;²¹ similar values were found in cowpea,²⁴ with levels of 42%, 10% and 7.8% of total protein,

respectively. It is a fact that different legume species have different levels of albumin (8-14%) and globulin (30.5 to 42%),²⁵ however, these differences, even between cultivars of the same species, may also be related to methodological aspects of the extraction process, and the greatest differences are observed in the globulin fractions.^{26,20} Pure water solubilizes part of the albumins and globulins, owing to salts naturally present in the seeds, which can provide sufficient ionic strength to partially affect the globulin solubility.⁶ Therefore, following the initial water extraction, the extract was dialyzed against distilled water to precipitate part of the globulins, later added to the globulin fraction extracted with NaCl. The analysis of these protein fractions by PAGE demonstrated that this procedure was effective, as the samples showed no contaminant protein bands (Fig. 2, part A).

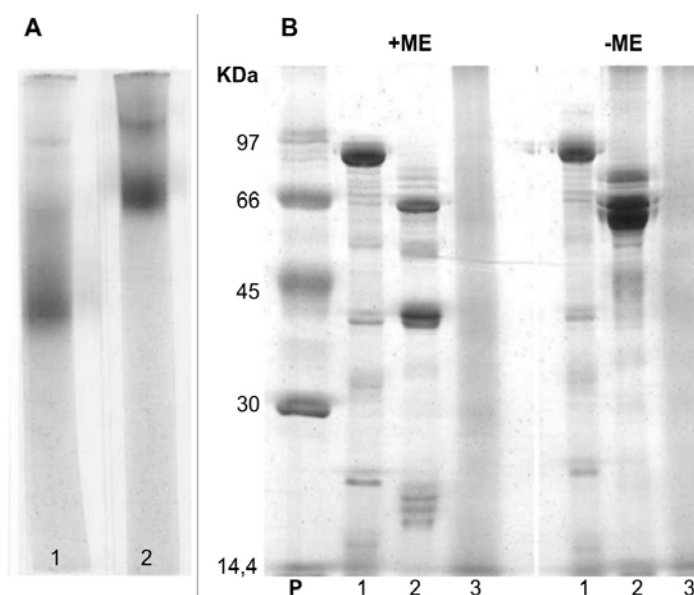


Figure 2: Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of the protein fractions from baru seed. No-dissociating conditions (A). SDS-PAGE (B) with (+ ME) and without (- ME) β -mercaptoethanol. P: molecular weight standards. 1: Albumin Fraction, 2: Globulin fraction; 3: Glutelin fraction.

3.3.1. SDS-PAGE

The electrophoretic profile of albumin, globulin and glutelin is shown in Figure 2 (part B). The albumin fraction (lane 1, part B) showed a main band in the range 84-85 kDa and several other weak, diffuse bands of lower molecular weight (MW), which is a characteristic pattern for this fraction; the presence or absence of a reducing agent (β -mercaptoethanol) caused no major changes. The globulin fraction (lane 2, part B) showed three main subunits of MW 62-64, 66 and 73 kDa and, when it was treated with β -mercaptoethanol (ME), two main bands appeared at 42 and 44 kDa and weaker bands close to 56 and 20 kDa, indicating the possible presence of disulfide bonds, alongside the original protein bands at 66 and 73 kDa. The presence in the total globulin fraction of major bands at 42-44 and 20 kDa indicates the probable dominance of an 11S globulin fraction as a component of the total globulin, characterized by acidic and basic fractions, respectively.^{27,28} No defined protein bands were apparent in the glutelin fraction (lane 3, part B).

3.4. *In vitro* digestibility

In vitro protein digestibility for the flour and globulin fraction from baru almond were lower than those found for casein ($p < 0.05$) (Table 3). However, the values of *in vitro* digestibility reported for the proteins of legumes such as broad bean (*Vicia faba* L.), lentil (*Lens culinaris* Medikus), chickpea (*Cicer arietinum* L.) and beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are between 73 and 83%.²⁰ The greater digestibility of the globulins relative to the flour protein ($p < 0.05$) suggests the presence of other natural components in the seed that interact with proteins or enzymes and hinder the hydrolysis, especially the albumin fraction, which may contain seed protease inhibitors.²¹

Table 3: *In vitro* digestibility of defatted flour and total globulin from baru seed.

Protein	% hydrolysis*	digestibility (%)**
Casein (Standard)	97.38±0.47 ^a	100
Defatted flour	83.34±1.93 ^c	85.59±1.98
Total globulin	88.17±1.33 ^b	90.54±1.36

*proteases pepsin and pancreatin. **relative to casein (100%). Values represent mean ± SD of triplicate assays. Different letters indicate differences between means by Tukey test (p<0.05).

Khattab *et al.*²⁹ reported that *in vitro* protein digestibility of native varieties of cowpea (*Vigna sinensis* L.), pea (*Pisum sativum* L.) and white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ranged from 70.5% to 82.3 %. Shoshima *et al.*²⁴ reported digestibility of 70.3% for the flour protein from cowpea var. BR-14 mulatto. Portari *et al.*³⁰ found *in vitro* digestibility values of 72.4% and 76.9% for chickpea meal and the total globulin, respectively, while Neves *et al.*²¹ found 68.7% and 83.0% for total protein and total globulins from sweet lupin, respectively. Monsoor and Yusuf³¹ using the pepsin-pancreatin sequence of digestion observed 93.4%, 95.2% and 89.0% digestibility for protein concentrates from pea (*Lathyrus sativus*), lentil (*Lens culinaris*) and chickpea (*Cicer arietinum*), respectively; these values were higher than those reported for legume proteins in general and for their native form. Employing different procedures and enzymes from those presented in this study, Adebowale *et al.*³² found digestibility values between 90.6 and 94.5% for protein isolates from six varieties of the legume *Mucuna*; however, higher values would be expected for protein isolates, due to partial denaturation of the proteins and the removal of antinutritional factors during their preparation.

3.5. Characterization of total globulins

3.5.1. Isoelectric point (IP)

Figure 3 (A) shows the variations of the total globulin solubility with pH, in the range between pH 2 and 12. The solubility curve, measured by turbidity and/or soluble protein content, revealed pH 4.8 as the IP of the globulin fraction.

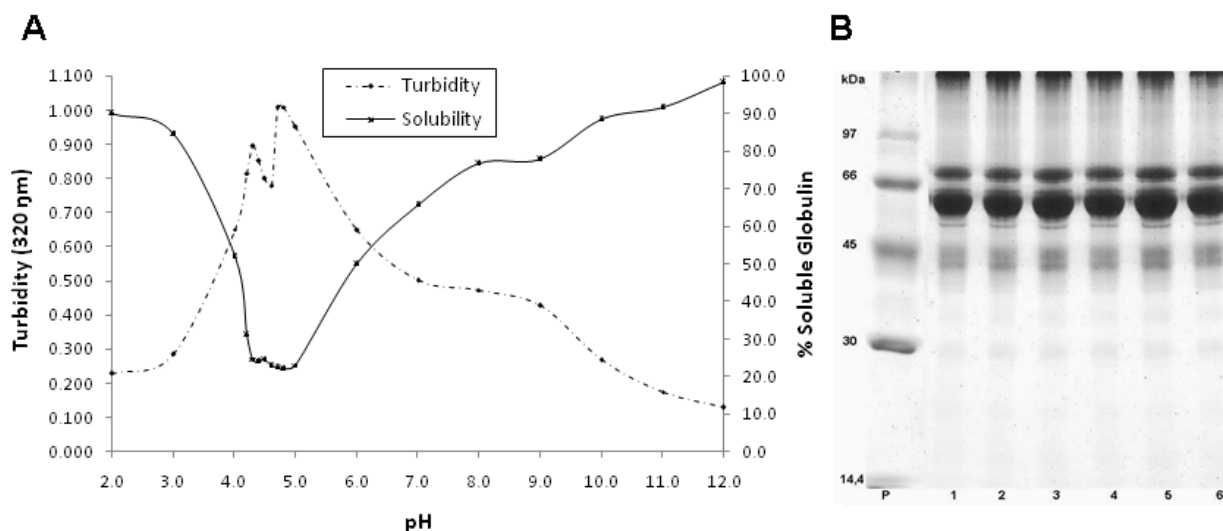


Figure 3: (A) Determination of Isoelectric Point (IP) of the baru total globulin solubilized in 0.2 M NaCl solution: Turbidity (320 nm) and solubilized protein (LOWRY et al., 1951). (B) SDS-PAGE of total globulins in the range of isoelectric pH. P: standard molecular weights. 1-6: total globulin precipitated at pH 4.3 to 4.8.

Owing to the peak in the turbidity curve at pH 4.3, the small decrease between pH 4.4 and 4.7 and slight increase at pH 4.8, we attempted to ascertain, by electrophoretic analysis, the existence and/or dominance of different protein bands precipitated in this pH range, which would indicate the possible existence of two IP values. However, SDS-PAGE (Fig. 3 B) showed no differences in the characteristics of the protein bands precipitated at these pHs, indicating that the protein IP is better characterized by solubility than by turbidity.

3.5.2. Chromatographic profile

The elution pattern of total globulin from a Sepharose CL-6B gel column (Fig. 4) revealed two protein peaks, corresponding to fractions 41 and 76; however, the first peak was eluted near the column void volume (V_0 = 203.4 mL). This first peak

was very turbid and, although showing high absorbance at 280 nm, it contained very little protein material when quantified by the Lowry et al.¹⁴ method. The occurrence of a turbid peak near the void volume in gel filtration chromatography has been recorded for crude preparations of globulins from various seeds, such as soybean, flaxseed, mustard, wheat, amaranth, peas and chickpeas.^{30,33,34,35} It probably corresponds to high molecular weight compounds that absorb strongly at 280 nm and do not penetrate the gel. Accordingly, Marconi et al.³³ conclude that the existence of this peak with high turbidity is a common feature in all studies of crude preparations of seed globulins and may serve as a means of identifying these preparations.

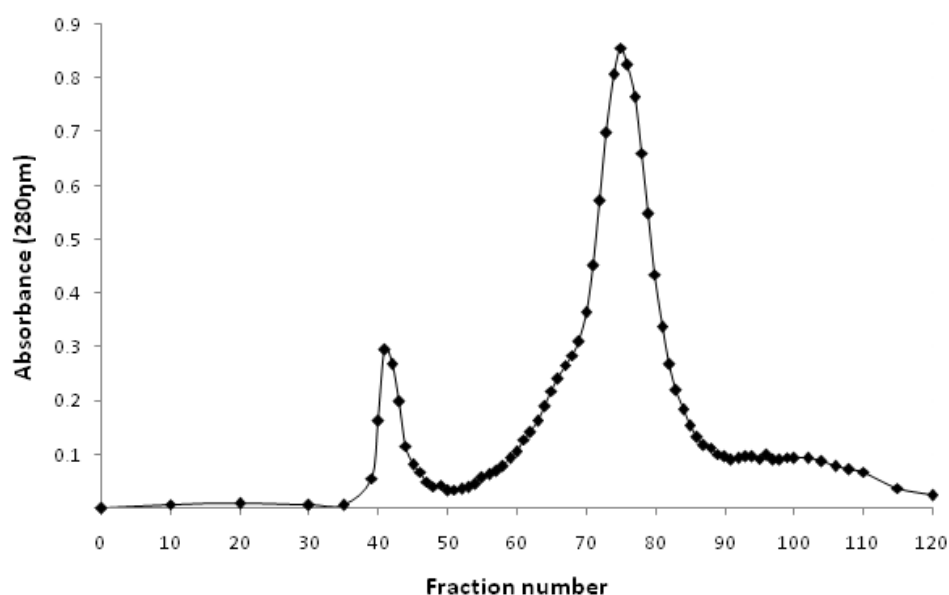


Figure 4: Chromatographic profile of the baru total globulin fraction on Sepharose CL-6B (100 x 2.5 cm). Elution buffer: 10 mM potassium phosphate (pH 7.5) containing 0.3 M NaCl and 0.01% sodium azide. ~4.6 mL collected per fraction. $V_o = 203.4$ ml.

The elution profile of total globulin from an ion exchange column (DEAE-cellulose) is shown in Figure 5 (A), in which it can be observed that the fraction was released at a NaCl concentration of approximately 0.12 M, showing a single peak at 280 nm. SDS-PAGE of these materials (Fig. 5 B) reveals that total globulin (lane 1)

showed the same characteristics as in Figure 2 (B) and that the globulin fraction eluted in the chromatographic peak (lane 2) had a main subunit of MW 62-64 kDa in non-reducing condition (-ME) and, in reducing conditions (+ME), had two major protein bands of 42 and 44 kDa, besides weaker protein bands near 20 kDa. Therefore, it is seen that by ion exchange chromatography, it was possible to concentrate most of the globulin fraction from baru seed.

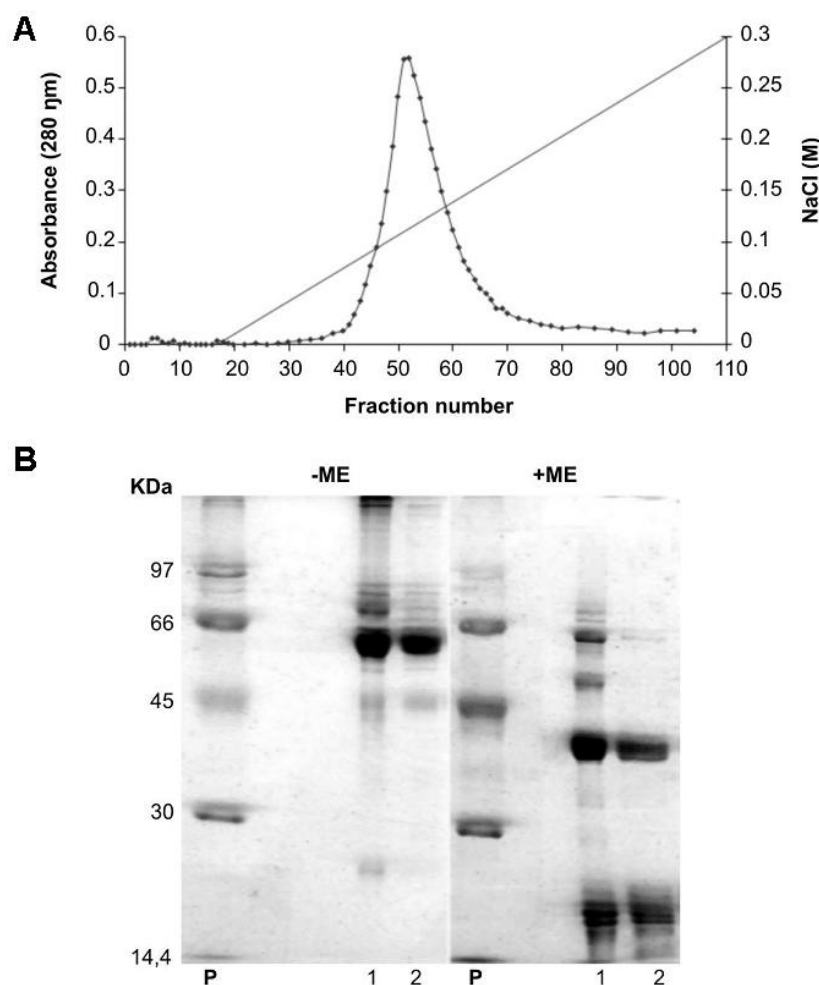


Figure 5: (A) Chromatographic profile of the baru total globulin fraction in a Diethylaminoethyl-cellulose column (18 x 1.5 cm). Elution buffer: 50 mM potassium phosphate (pH 7.5) with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.6 M. ~ 4.5 mL collected per fraction. (B) SDS-PAGE with (+ ME) and without (- ME) β -mercaptoethanol of the chromatographic peak. P: standard molecular weights. 1: total globulin, 2: chromatographic peak.

CONCLUSIONS

Results obtained by solubility studies, and the quantitative predominance of globulins (61.4%), indicate that the protein from baru seed is typical of that legume seeds, in which the properties found in the principal fraction largely determine their application to various food systems. The baru seed total protein, as well as the total globulin fraction, showed a high *in vitro* digestibility relative to casein. Total globulin fraction chromatographic profiles obtained by gel filtration and ion exchange indicate the predominance of one fraction with characteristics of a legumin-type protein. However, it is necessary to further separate this fraction into components, employing different chromatographic and electrophoretic procedures in order to characterize this protein more completely.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FUNDUNESP. The authors acknowledge the careful proofreading of the text by Timothy John C. Roberts.

REFERENCES

1. Togashi M, Sgarbieri VC. Caracterização química parcial do fruto do baru (*Dipteryx alata*, Vog.). *Ciênc Tecnol Alim* **14**: 85-95 (1994).
2. Sano SM, Ribeiro JF, Brito MA. Baru: biologia e uso. ed. by Embrapa Cerrados Press, Planaltina, DF, pp. 52 (2004).
3. Rocha LS ; Cardoso-Santiago RA . Implicações nutricionais e sensoriais da polpa e casca de baru (*Dipterix Alata* Vog.) na elaboração de pães. *Cienc Tecnol Alim* **29**: 820-825 (2009).
4. Carvalho FMV, Marco Junior P and Ferreira LG. The cerrado intopieces: habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. *Biol Conservat* **142**: 1392-1403 (2009).

5. Costa GEA, Queiroz-Monici KS, Reis SMPM, Oliveira AC. Chemical composition, dietary fiber and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem* **94**: 327-330 (2006).
6. Venkatachalam M, SATHE SK. Val bean (*Lablab purpureus* L.) proteins: composition and biochemical properties. *J. Sci Food Agric* **87**: 1539–1549 (2007).
7. Neves VA, Silva MA, Lourenço EJ. Caracterização e hidrólise *in vitro* da globulina principal de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), var. IAC-Marrocos. *Ciênc Tecnol Alim* **24**: 139-145 (2004).
8. Togashi M, Sgarbieri VC. Avaliação nutricional da proteína e do óleo de semente de baru (*Dipteryx alata* Vog). *Ciênc Tecnol Alim* **15**: 66-69 (1995).
9. Takemoto E, Okada IA, Garbelotti M, Tavares M and Aued-Pimentel S. Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. *Rev Inst Adolfo Lutz* **60**: 113 -117 (2001).
10. Fernandes, DC, Freitas JB, Czedler LP and Naves MMV. Nutritional composition and protein value of the baru (*Dipteryx alata* Vog.) almond from Brazilian Savanna. *J Sci Food Agric* **90**: 1650-1655 (2010).
11. Vera R, Soares-Junior MS, Naves RV, Souza ERB, Fernandes EP, Caliari M and Leandro WM. Características químicas de amêndoas de barueiros (*Dipteryx alata* Vog.) de ocorrência natural no estado de Goiás, Brasil. *Rev Brasil Frutic* **31**: 112-118 (2009).
12. Bligh EC, Dyer WJ. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917 (1959).
13. AOAC, *Official methods of analysis*(16th edn). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA (1995).
14. Lowry OH, Rosebrough N J, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275 (1951).
15. Akeson WR, Stahman MA. A pepsin-pancreatin digest index of protein quality evaluation. *J Nutrit* **83**: 257-261 (1964).
16. Davis BJ. Disc electrophoresis II – Method and application to human serum proteins. *Ann New York Acad Sci* **121**: 404-427 (1964).
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-684 (1970).
18. Yang J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT-Food Sci Technol* **42**: 1573-1580 (2009).

19. Meng G and Ma C-Y. Characterization of globulin from *Phaseolus angularis* (red bean). *Intern J Food Sci Technol* **37**: 687–695 (2002).
20. Carbonaro M, Cappelloni M, Nicoli S, Lucarini M, Carnovale E. Solubility-digestibility relationship of legume proteins. *J Agric Food Chem* **45**: 3387-3394 (1997).
21. Neves VA, Silva-Junior SI, Silva MA. Isolamento da globulina majoritária, digestibilidade *in vivo* e *in vitro* das proteínas do tremço-doce (*Lupinus albus* L.), var. Multolupa. *Ciênc Tecnol Alim* **26**: 832-840 (2006).
22. Neves VA, Pereira DD, Shoshima AHR, Tavano OL. Características da solubilidade protéica e isolamento da globulina principal de Caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Cultivar “BR 14-mulato”. *Alimentos e Nutrição* **14**: 47-55 (2003).
23. Kaur M, Singh N. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chem* **102**: 366–374 (2007).
24. Shoshima AHR, Tavano OL, Neves VA. Digestibilidade *in vitro* das proteínas do caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) var. “BR-14 Mulato”: Efeito dos fatores antinutricionais. *Braz J Food Technol* **8**: 299-304 (2005).
25. Bhatti RS. Albumin protein of eight edible grain legume species: electrophoretic patterns and aminoacid composition. *Journal of Agricultural and Food Chem* **30**: 620-622 (1982).
26. Deshpande SS, Nielsen SS. Nitrogenous constituents of selected grain legumes. *J Food Sci* **52**: 1321-1325 (1987).
27. Derbyshire E, Wright DJ, Boultera D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* **15**: 3-24 (1976).
28. Marcone MF. Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. *Food Res Internat* **32**: 79-92 (1999).
29. Khattab RY, Arntfield SD, Nyachoti CM. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments, Part 1: Protein quality evaluation. *LWT - Food Sci Technol* **42**: 1107–1112 (2009).
30. Portari GV, TAVANO OL, Silva MA, NEVES VA. Effect of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germination on the major globulin content and *in vitro* digestibility. *Ciênc Tecnol Alim* **25**: 807-812 (2005).
31. Monsoor MA, Yusuf HKM. *In vitro* protein digestibility of lathyrus pea (*Lathrus sativus*), lentil (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*). *Internat J Food Sci Technol* **37**: 97-99 (2002).

32. Adebawale YA, Adeyemi IA, Oshodi, AA Niranjan K. Isolation, fractionation and characterisation of proteins from *Mucuna* bean. *Food Chem* **104**: 287–299 (2007).
33. Marcone MF, Kakuda Y, Yada RY. Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants. I – Isolation/purification and characterization. *Food Chem* **62**: 27-47 (1998).
34. Neves VA, Lourenço EJ. Changes in protein fractions, trypsin inhibitor and proteolytic activity in cotyledons of germinating chickpea. *Arch Latinoamericana Nutr* **51**: 269-275 (2001).
35. Kumar KG, Venkataraman LV. Chickpea seed proteins: Isolation and characterization of 10.3S protein. *J Agric Food Chem* **28**: 524-529 (1980).