

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Coordenação de Engenharia Química/CCET

Trabalho de Conclusão de Curso - TCC



DRIELLE NAYARA NUNES SOARES

**ESTUDO DE PROCESSOS PARA OBTENÇÃO DE
PROTEÍNAS TERMOESTÁVEIS DE SEMENTES DE *Acacia
mangium*, *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Stylosanthes capitata***

DRIELLE NAYARA NUNES SOARES

**ESTUDO DE PROCESSOS PARA OBTENÇÃO DE
PROTEÍNAS TERMOESTÁVEIS DE SEMENTES DE *Acacia
mangium*, *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Stylosanthes capitata***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado de Curso da Engenharia Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do diploma de Graduação em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Martins dos Santos Soares.

Soares, Drielle Nayara Nunes.

Estudo de processos para obtenção de proteínas termoestáveis de sementes de Acacia mangium, Mimosa caesalpiniaefolia e Stylosanthes capitata / Drielle Nayara Nunes Soares. - 2018.

61 f.

Orientador(a): Alexandra Martins dos Santos Soares.

Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Maranhão, Auditório do Laboratório de Surfactantes, 2018.

1. Extração proteica. 2. Proteínas termoestáveis. 3. Rendimento proteico. 4. Sementes leguminosas. I. Soares, Alexandra Martins dos Santos. II. Título.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. ALEXANDRA MARTINS DOS SANTOS SOARES
Orientadora – COEQ/CCET/UFMA

Profa. Dra. TALITA DA SILVA ESPÓSITO
DEOLI/UFMA

Bacharela DANIELLA DE JESUS CASTRO BRITO
CCBS/UFMA

Aprovada em 10 de dezembro de 2018.

Dedico este trabalho à minha família, por todo amor, cuidado, apoio e dedicação que me proporcionaram desde o primeiro segundo de minha vida e que com certeza o farão para sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pelo seu amor e cuidado. Por me iluminar e conceder-me força todos os dias para vencer meus desafios. Faço minhas palavras as do salmista: “Louvai ao Senhor, porque Ele é bom, porque sua benignidade é para sempre” (Salmos 118:1).

Aos meus amados pais, Rosilene e Cláudio, que sempre se esforçaram para me proporcionar a melhor educação possível. Agradeço pelas suas orações e apoio incondicional nos momentos mais árduos da minha vida. Vocês foram minha grande motivação de cada dia para a finalização deste trabalho.

Ao meu tio James, pelo carinho e suporte. Ao meu irmão Maxwell, por quem tenho grande afeição pelo enorme coração que tem. A todos os meus familiares que, independentemente de onde eu esteja, sei que estarão sempre torcendo por mim. Amo vocês!

Ao amor de minha vida Jessé, pelo apoio, carinho e conselhos. Por estar comigo nessa caminhada, me dando forças e me incentivando a seguir. Agradeço por tornar mais agradável essa jornada. E que venham nossos mestrados e doutorados!

Às minhas amigas loucas e irmãs Jullyanne Silva, Maria Rakel e Camila Andrade pelo carinho, incentivo e por acreditarem que eu seria capaz. Pelos ótimos momentos juntas, conversas, brigas e tudo mais. Vocês são maravilhosas em minha vida!

Ao meu pastor Cícero, que sempre me motivou a crescer e estudar mais. Agradeço pelos maravilhosos conselhos, pelas valiosas conversas e correções sempre oportunas. Muito obrigada!

Agradeço à minha chefe de trabalho Maria José, pela sua ajuda e compreensão.

À minha orientadora Alexandra Soares, exemplo de ética e profissionalismo. Meu muito obrigada por ter me aceitado em seu laboratório no qual pude realizar esta pesquisa, pelos ensinamentos e pelo esforço realizado nessa reta final para que esta monografia fosse concluída.

À mestranda Daniella Brito, pelo apoio científico que me foi repassado, sendo de enorme contribuição para a realização dos experimentos. A toda equipe LBV pelo convívio superagradável, pelos sorrisos, conversas e momentos de descontração. Pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei. Como sempre digo, vocês são maravilhosos!

Aos meus amigos da UFMA e (em breve) engenheiros, pelas horas proveitosas de estudo e também pelos grandes momentos de descontração. Agradeço aos que compartilharam comigo dessa vida louca acadêmica, levarei comigo na lembrança.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa maravilhosa etapa da minha vida. Muito obrigada!

“As misericórdias do Senhor são a causa de não sermos consumidos, porque as suas misericórdias não têm fim. Novas são a cada manhã; grande é a Tua fidelidade.”

Lamentações de Jeremias 3:22-23

SOARES, D. N. N. **Estudo de processos para obtenção de proteínas termoestáveis de sementes de *Acacia mangium*, *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Stylosanthes capitata***. 2018. 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

RESUMO

Sementes de leguminosas são conhecidas na comunidade científica por apresentarem alto teor proteico. Têm recebido considerável atenção no meio industrial por conterem biomoléculas termicamente resistentes e possuírem características importantes para serem usadas em inúmeras aplicações biotecnológicas. O isolamento dessas proteínas é objeto de grande relevância principalmente para as bioindústrias emergentes. Assim, no presente trabalho, foram estabelecidas condições operacionais para obtenção de proteínas termoestáveis de sementes das espécies *A. mangium*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. capitata*. Os processos aplicados envolveram o uso de diferentes tampões, agentes precipitantes e tratamento térmico a fim de alcançar maiores rendimentos e recuperação proteica. Os resultados mostraram que ocorreu maior extração de proteínas termicamente resistentes em pH neutro para todas as sementes. A precipitação com sulfato de amônio (0-90%) foi o método de fracionamento mais eficiente com recuperação de 28%, 43,5% e 14% de proteínas dos extratos totais de *A. mangium*, *S. capitata* e *M. caesalpiniaefolia*, respectivamente. O tratamento térmico foi usado para eliminação de proteínas termolábeis e concentração de proteínas termoestáveis. Os resultados deste estudo deverão abrir caminho para o desenvolvimento de protocolos ainda mais eficientes de extração de proteínas. Fica evidente que o nível de conhecimento nessa área por engenheiros químicos ainda não é suficiente e muita pesquisa ainda é necessária para o desenvolvimento de uma tecnologia de engenharia de proteínas cujo objetivo seja a obtenção de formas mais termoestáveis, visando uma aplicação biotecnológica.

Palavras – chave: Proteínas Termoestáveis. Sementes Leguminosas. Extração Proteica. Rendimento Proteico.

SOARES, D. N. N. **Study of processes for obtainment thermostable proteins from seeds of *Acacia mangium*, *Mimosa caesalpiniaefolia* and *Stylosanthes capitata***. 2018. 61 f. Graduate Work (Graduate in Chemical Engineering) – Curso de Engenharia do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

ABSTRACT

Legume seeds are known in the scientific community because they have high protein content. They have received considerable attention in the industrial environment because they contain thermally resistant biomolecules and possess important characteristics to be used in numerous biotechnological applications. The isolation of these proteins is of great relevance mainly for emerging bio-industries. Thus, in the present work, operational conditions were established to obtain thermostable seed proteins of the species *A. mangium*, *M. caesalpiniaefolia* and *S. capitata*. The applied processes involved the use of different buffers, precipitating agents and heat treatment in order to achieve higher yields and protein recovery. The results showed that higher extraction of thermally resistant proteins at neutral pH occurred for all the seeds. Ammonium sulfate precipitation (0-90%) was the most efficient fractionation method with recovery of 28%, 43,5% and 14% of total extracts proteins of *A. mangium*, *S. capitata* and *M. caesalpiniaefolia*, respectively. The heat treatment was used to eliminate thermolabile proteins and the concentration of thermostable proteins. The results of this study should pave the way for the development of even more efficient protocols for protein extraction. It is evident that the level of knowledge in this area by chemical engineers is still not enough and much research is still needed for the development of a protein engineering technology whose aim is to obtain more thermostable forms for biotechnological application.

Keywords: Thermostable Proteins. Leguminous Seeds. Protein Extraction. Protein Yield.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação dos níveis de organização estrutural das proteínas	06
Figura 2 – Representação das demandas do mercado por proteínas	08
Figura 3 – Principais operações unitárias para preparar isolado de proteína vegetal.....	17
Figura 4 – Mecanismo de estabilização da estrutura da proteína	20
Figura 5 – Efeitos da alta temperatura sobre a estrutura da proteína	23
Figura 6 – Processo 1 de extração e purificação parcial.....	26
Figura 7 – Processo 2 de extração e purificação parcial.....	27
Figura 8 – Curva padrão	30
Figura 9 – Teores de PT das sementes nos extratos e frações do Processo 1.....	31
Figura 10 – Teores de PT das sementes nos extratos e frações do Processo 2.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proporções de classes solubilizadas de proteínas em leguminosas	12
Tabela 2 – Rendimentos médios e percentual da recuperação proteica do Processo 1	31
Tabela 3 – Rendimentos médios e percentual da recuperação proteica do Processo 2	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysis of Variance
BSA	Albumina Sérica Bovina
PT	Proteína Total
SA	Sulfato de Amônio
TCA	Ácido Tricloroacético
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO.....	ii
DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS	iv
EPIGRAFE.....	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
SUMÁRIO.....	xii
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	04
2.1 Objetivo Geral	04
2.2 Objetivos Específicos	04
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
3.1 Proteínas: Aspectos Gerais	05
3.2 Mercado mundial e importância industrial das proteínas.....	07
3.3 Proteínas obtidas de fontes vegetais	09
3.3.1 Reservas proteicas em sementes de leguminosas	11
3.3.2 Aplicações de proteínas vegetais.....	12
3.4 Principais métodos para obtenção de proteínas de sementes	13
3.5 Proteínas termoestáveis	18
3.5.1 Características estruturais relacionadas à termoestabilidade das proteínas.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Material.....	24
4.2 Equipamentos	24
4.3 Reagentes.....	24
4.4 Delipidação das sementes.....	25
4.5 Extração de proteínas.....	25
4.5.1 Processo 1	25
4.5.2 Processo 2.....	25
4.6 Recuperação de proteínas termoestáveis	25

4.6.1 Processo 1	25
4.6.2 Processo 2	27
4.7 Análise estatística	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Quantificação proteica.....	29
5.2 Avaliação do Processo 1 de extração e fracionamento proteico	30
5.3 Avaliação do Processo 2 de extração e fracionamento proteico	33
5.4 Influência do tratamento térmico na recuperação proteica.....	36
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são componentes primordiais a todas as células vivas e estão relacionadas praticamente a todas as funções fisiológicas. Caracterizam-se como compostos orgânicos de alto peso molecular formados pelo encadeamento de aminoácidos (STEPHANI et al., 2012).

Proteínas ocupam lugar de destaque no cenário mundial, pois além de serem responsáveis por reações cruciais ao metabolismo celular, apresentam propriedades biotecnológicas adequadas para uso em diferentes processos. Dessa forma, possuem alto valor comercial com múltiplas aplicações em diversos setores, como nas indústrias de alimentos, têxteis, farmacêuticas, detergentes, cosméticos, diagnósticos e química fina (SANTOS et al., 2017).

Na sua forma funcional, a cadeia de aminoácidos que constitui uma proteína está enovelada em uma estrutura tridimensional, que determina a função proteica e lhe garante estabilidade estrutural. Entretanto, a estabilidade das proteínas é afetada por diferentes fatores, como: pH, solventes orgânicos, concentração de agentes caotrópicos e temperatura. Dentre esses fatores, a temperatura é a que mais exerce influência na função dessas biomoléculas e na manutenção de suas estruturas biológicas. A conformação nativa de uma proteína é sustentada por meio de um balanço de forças não covalentes, como pontes de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e força de van der Waals. Entretanto, essas interações (principalmente as ligações de hidrogênio) são rompidas com o fornecimento de calor e a proteína se desdobra (GOMES et al., 2007).

Quando o aumento da temperatura ocorre lentamente, a conformação da maioria das proteínas permanece intacta até que, em uma faixa estreita de temperatura, ocorre uma perda abrupta e irreversível da estrutura e, conseqüentemente, da função. Essa mudança repentina suscita que o desdobramento é um processo cooperativo: a perda da estrutura em uma região da macromolécula desestabiliza as outras partes (NELSON; COX, 2014). Do contrário, proteínas termicamente estáveis mantêm suas atividades e são resistentes em altas temperaturas.

Claramente, elas são de grande interesse por várias razões: podem ser usadas para melhorar a eficiência de muitos processos industriais e fornecer informações sobre os mecanismos gerais de dobramento e estabilização de proteínas. Identificar e entender os fatores que contribuem para a sua estabilidade tem sido um problema de longa data e também o foco

de inúmeros estudos e teorias na tentativa de construir um completo entendimento da termoestabilidade intrínseca observada nessas moléculas (DELATORRE et al., 2010).

A pesquisa por proteínas termoestáveis tem se intensificado nos últimos anos e a sua descoberta vem inovando o mercado industrial com suas inúmeras aplicações biotecnológicas. O maior interesse está relacionado à otimização de bioprocessos sob condições de altas temperaturas, em particular, ao uso de proteínas que estão otimamente ativas entre 60 °C e 125 °C. Elas têm sido usadas como ferramenta para a Biologia Molecular (Taq polimerase), como aditivo de detergentes e sabões (como proteases e celulasas), indústrias de processamento de amido (por exemplo, α -amilase, glucose isomerase), indústria de polpa e papel (xilanase), além de serem adequadas para inúmeras aplicações adicionais que exigem alta estabilidade tais como: síntese orgânica (lipases, proteases, oxidorreduções), no setor de diagnóstico, tratamento de resíduos e produção de ração animal (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).

As aplicações industriais dessas biomoléculas oferecem os benefícios de maiores taxas de reação, maior solubilidade do substrato, diminuição da viscosidade do meio e maior vida útil da proteína a temperaturas normais de armazenamento (por exemplo, produtos farmacêuticos proteicos) (HAKI; RAKSHIT, 2003). Vários estudos têm lidado com propriedades dessas macromoléculas biológicas e um aumento no interesse tem sido mostrado na concepção de proteínas ou enzimas com maior estabilidade à temperatura, mantendo a eficiência catalítica. Isso é de grande importância em muitas áreas da biotecnologia e oferece percepções sobre a relação estrutura – função das proteínas (ALBERTI; CONSONNI; ZETTA, 2003).

Com o intuito de acentuar o uso de proteínas termofílicas em escala piloto e industrial, estudos de fontes vegetais como látex, caule, folhas e sementes têm aumentado com o passar dos anos. De acordo com Sasaki (2008), as sementes são excelentes fontes proteicas, pois armazenam proteínas sob forma concentrada em contraste com outros órgãos vegetais: folhas dispõem apenas de 3 a 5% de proteínas; os tubérculos possuem 5%; sementes de cereais têm de 8 a 15% de proteínas, enquanto sementes de leguminosas, de 20 a 30%, podendo alcançar 40% no caso da soja.

Além disso, a extração e purificação de proteínas obtidas de fontes vegetais são desenvolvidas com técnicas simples, obtidas de material economicamente barato e geralmente apresentam particular especificidade, além de serem tiposeletivas. Dentre essas leguminosas,

as mais estudadas são o amendoim (*Arachis hypogea*), soja (*Glycine max*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), ervilha (*Pisum sativum*) e lentilha (*Lens culinaris*) (VILLENEUVE, 2003).

Diante do exposto, o estudo de sementes de leguminosas como matéria prima na obtenção de proteínas termoestáveis torna-se relevante. Este estudo, buscou avaliar métodos de obtenção de proteínas das sementes de plantas *Acacia mangium*, *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Stylosanthes capitata*, pertencentes a família Fabaceae. Diversas espécies da família Fabaceae apresentam alto valor econômico madeirável, ocorrendo pouco ou nulo aproveitamento de suas potencialidades não madeiráveis, como as sementes. Ainda não há na literatura, até o momento, estudos que avaliem o potencial das leguminosas selecionadas neste trabalho na existência de proteínas com atividades relevantes que possam ter aplicação biotecnológica.

Investir na otimização de processos, no intuito de estabelecer a padronização de condições operacionais que maximizem rendimentos para obtenção de proteínas termoestáveis, usando como matéria prima sementes de leguminosas e avaliar suas potencialidades como ferramentas biotecnológicas, torna-se objeto de grande relevância para a comunidade científica e industrial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho foi conduzido com o intuito de avaliar processos para obtenção de proteínas termoestáveis de sementes de *Acacia mangium*, *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Stylosanthes capitata*.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer condições operacionais para a extração de proteínas das sementes de *A. mangium*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. capitata*;
- Avaliar a recuperação de proteínas termoestáveis de frações das sementes de *A. mangium*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. capitata*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Proteínas: Aspectos Gerais

A busca pela compreensão dos mecanismos biomoleculares tem promovido um grande desafio para os cientistas de diferentes áreas do conhecimento. Uma das classes de macromoléculas biológicas de grande importância para os seres vivos são as proteínas. A proteína, literalmente, detém o papel fundamental nos processos biológicos, sendo a principal força motriz nos organismos vivos (CONTESSOTO et al., 2018).

Proteínas executam uma incrível variedade de funções diferentes em todos os organismos vivos como: suporte estrutural, armazenamento, transporte, defesa, catálise em reações e etc. Sua estrutura contém informações que lhes permitem convocar o auxílio de coenzimas, íons metálicos, grupos heme e outras moléculas de baixo peso molecular em catálise para que tarefas sejam realizadas. Dada essa diversidade de funções proteicas na natureza, é de se esperar que as suas aplicações também sejam diversas (WONG et al., 2008).

O comportamento proteico, como a dinâmica e as interações, depende das propriedades físico-químicas da proteína. Uma compreensão de como a estrutura dita a atividade proteica conduz a elaboração de projetos racionais de “moduladores de proteína”, que podem atuar como novos fármacos e pesticidas, por exemplo, e de novas proteínas com funções adequadas às demandas do homem (HOL, 1987).

Segundo Nelson e Cox (2014, p. 76):

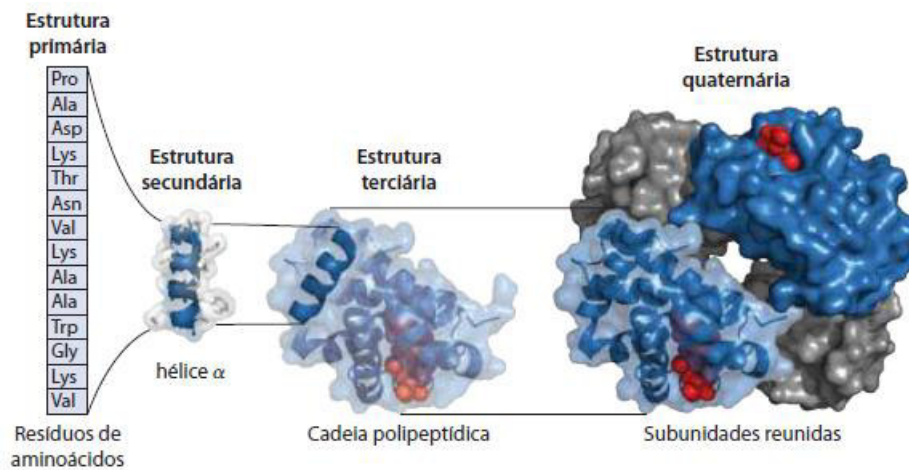
Proteínas são polímeros de aminoácidos, com cada resíduo de aminoácido unido ao seu vizinho por um tipo específico de ligação covalente (o termo “resíduo” reflete a perda de elementos de água quando um aminoácido é unido a outro).

Assim, subunidades monoméricas relativamente simples propiciam a base da estrutura de milhares de proteínas diferenciadas. As proteínas de cada ser vivo, da mais simples das bactérias aos seres humanos, são formadas por intermédio do mesmo conjunto de 20 aminoácidos. Cada tipo de aminoácido possui propriedades únicas que afetam a estrutura e função das proteínas, a depender de suas cadeias laterais (CARUGO, 2008).

A Figura 1 ilustra os quatro níveis de estrutura proteica. A estrutura primária consiste em uma sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas; o polipeptídeo resultante pode ser disposto em unidades de estrutura secundária, como em uma α -hélice; a hélice é uma

parte da estrutura terciária do polipeptídeo dobrado, que é ele mesmo uma das subunidades que compõem a estrutura quaternária da proteína (NELSON; COX, 2014).

Figura 1 – Representação dos níveis de organização estrutural das proteínas



Fonte: Nelson e Cox, 2014.

A partir desses blocos de construção, organismos distintos conseguem gerar produtos tão diversificados como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, fibras musculares, antibióticos e uma infinidade de outras substâncias com atividades biológicas distintas (NELSON; COX, 2014).

Dentre essa variedade, as proteínas de ação enzimática são as mais variadas, especializadas e muito úteis em processos industriais. Proteínas não enzimáticas também demonstram atividade por meio de sua interação com pequenas moléculas ou outras proteínas (JANEWAY et al., 2008).

A maioria das pesquisas voltadas pra área biotecnológica tem como foco o estudo de proteínas e sua funcionalidade, sendo direcionadas para todos os aspectos do bem-estar dos organismos vivos, cobrindo a proteção e renovação do meio ambiente, a sustentabilidade da energia, a melhoria da saúde, medicina, alimentação, etc. (KENTARO, 2018).

Portanto, entender a função e propriedades de uma proteína permite sua utilização e manipulação plausível para satisfação das necessidades humanas, como melhor saúde, melhor alimentação, ambiente mais limpo e mais verde, prevenção de doenças e processos biotecnológicos mais eficazes e seguros. Todos estes fatores tornam esta classe de macromoléculas um alvo interessante de estudo (KENTARO, 2018).

3.2 Mercado mundial e importância industrial das proteínas

O mercado de proteínas está em fase de crescimento e requer desenvolvimentos adicionais para registrar sua presença centralizada e crescimento estável globalmente. A biotecnologia, durante as últimas décadas, emergiu como uma revolução tecnológica em todo o mundo como consequência do alargamento da gama de setores de aplicação de proteínas que continuam a aumentar (ILLANES, 2008).

De acordo com pesquisa de mercado e condições de desenvolvimento de negócios, a demanda global por proteínas deve crescer 6,9% de US\$ 5,8 bilhões para US\$ 11,3 bilhões ao longo de 2010 – 2020. Os segmentos industriais (proteínas para indústrias de alimentos e ração animal) e de especialidades de proteínas (proteínas terapêuticas, proteínas para diagnóstico, proteínas para química quiral e proteínas para pesquisa) devem crescer nos próximos anos. É provável que as proteínas apresentem uma taxa de crescimento de 7,5% superior à previsão de 6,5% para as proteínas industriais. A demanda por proteínas usadas na indústria deverá ser apoiada pelo segmento de alimentos e biocombustíveis (CRISIL Research, 2013).

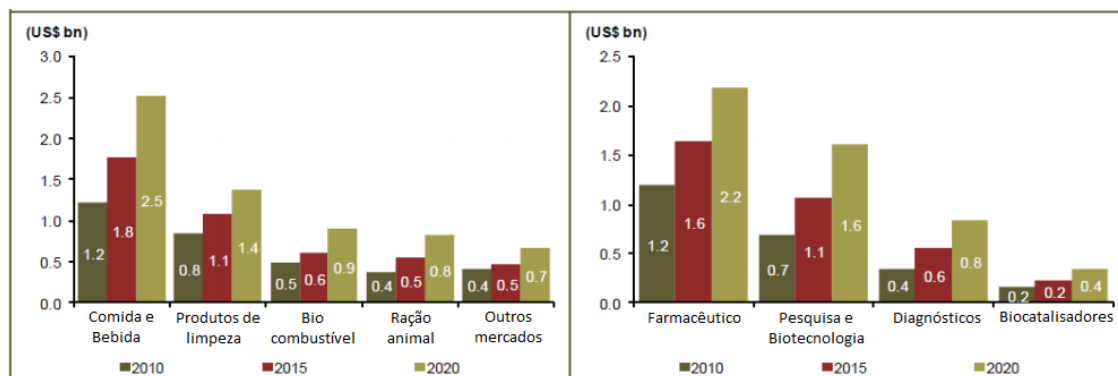
Estima-se que o mercado global de proteínas aumente de 6% a 7% ao ano. A demanda será incentivada por causa do aumento na produção de alimentos e bebidas, produtos de limpeza, farmacêuticos e ração animal (FREEDONIA, 2014).

Proteínas usadas no processamento de alimentos são responsáveis pela maior parte (mais de 20%) das proteínas industriais em geral e sua demanda junto com o setor farmacêutico provavelmente impulsionará a demanda do mercado por proteínas nos próximos anos. Com uma taxa de crescimento de 7,5% entre 2010 e 2020, estima-se que o segmento de alimentos (comida e bebida) é mais crescente entre todos os segmentos dentro da indústria de proteínas (CRISIL Research, 2013). A Figura 2 mostra a demanda de segmentos-chave por proteínas.

Na indústria alimentícia, as proteínas lácteas são essenciais para a nutrição humana e promovem uma ampla variedade de propriedades dinâmicas funcionais. São largamente exploradas pelo setor alimentício com o intuito de proporcionar melhorias de textura, rendimento e palatabilidade aos produtos processados. Os derivados proteicos lácteos, por exemplo, têm como finalidade a incrementação de produtos como carnes, bebidas, panificação, alimentação animal, suplemento alimentar, formulações infantis, suplementação esportiva, queijos e iogurtes, preparados aromatizados para café. Além de servir como suplementação nutricional, os derivados proteicos lácteos concedem propriedades funcionais como

solubilidade, viscosidade, retenção/ligação com água, emulsificação, capacidade espumante, aeração, gelificação e estabilidade ao calor (PASSOTTO, 2012).

Figura 2 – Representação das demandas do mercado por proteínas



Fonte: CRISIL Research, 2013.

No setor farmacêutico, proteínas e peptídeos podem ser considerados fármacos ideais porque intervêm, essencialmente, em todos os processos biológicos e reações, caracterizando-se por alta eficiência e potência, isto é, atuam de maneira específica e em baixas concentrações. Os progressos mais recentes na biotecnologia tornaram possível produção em larga escala de grande variedade de proteínas (SILVA et al., 2002).

Encontram-se, atualmente, comercializadas ou em ensaios clínicos, centenas de proteínas com ação terapêutica, incluindo anticorpos monoclonais, agentes antimicrobianos, inibidores enzimáticos, vacinas, agentes imunomoduladores, fatores de crescimento, citocinas e hormônios. Como exemplo, tem-se a insulina para tratamento de diabetes e administração de hormônio de crescimento em casos de nanismo corrigível. Assim, estudos sobre a regulação de proteínas no ser humano contribuem para lidar com várias doenças e a geração de vacinas melhora a resistência humana contra infecções e, dessa forma, aumenta a capacidade de sobrevivência da humanidade (SILVA et al., 2002).

Os processos industriais que abrangem reações químicas estão inseridos na maioria das manufaturas de produtos ou bens consumidos pelo homem. Grande parte dessas reações são catalisadas por proteínas com ação enzimática. Enzimas formam os maiores grupos em qualquer esquema de classificação de proteínas (MONTEIRO; SILVA, 2009). A enzima traz a reação catalisada ao seu equilíbrio mais rapidamente do que ocorreria de outra forma, o que significa que elas aceleram a reação diminuindo a energia de ativação (ORLANDELLI et al., 2012).

Devido à sua especificidade, propriedade enzimática que permite reconhecer um determinado composto químico ou substrato que proteínas são projetadas para atingir, elas são muito úteis para processos químicos que apresentam misturas com muitos componentes (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011). A tecnologia de enzimas oferece às indústrias e aos consumidores uma oportunidade de substituir os processos que usam produtos químicos agressivos por processos enzimáticos amistosos e ecologicamente corretos (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011).

Proteínas também são usadas na produção de biocombustível, fonte alternativa de energia sustentável para combustíveis fósseis. Inibidor da atividade enzimática previne a deterioração dos produtos agrícolas e é usado em cosméticos. Eletrodo à base de proteína é empregado para detecção de poluentes em águas residuárias. Todas essas aplicabilidades mencionadas são baseadas em informações prévias de proteínas, ou seja, seu funcionamento, suas características e suas interações (ISMAYA, 2011).

3.3 Proteínas obtidas de fontes vegetais

A demanda mundial por proteínas está aumentando e como consequência, há a necessidade de novas fontes proteicas. As proteínas obtidas de fontes vegetais têm chamado a atenção de muitos pesquisadores nos últimos anos (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

Muitos trabalhos na literatura vêm propondo a exploração e uso dos resíduos agroindustriais, por exemplo, como potenciais fontes de proteínas vegetais com alto valor agregado e nutricional, que podem ser extraídas, isoladas e aproveitadas em diversos setores industriais na área de alimentos, fármacos, cosméticos e química, tornando a cadeia agroindustrial sustentável (GRANDE; CREN, 2016).

Somado a isso, no setor industrial alimentício, as proteínas vegetais são alternativas econômicas e versáteis frente às proteínas animais como ingredientes funcionais nas formulações de alimentos. No entanto, uma substituição efetiva de proteínas animais requer inovações tecnológicas. Para alcançar essas inovações de forma eficaz e eficiente, a compreensão da relação entre a estrutura da proteína vegetal e suas propriedades funcionais é de primordial importância (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

O isolamento e purificação das proteínas vegetais, antigamente, apresentavam tantas dificuldades que, por um longo tempo, os métodos disponíveis eram demasiados grosseiros para

permitir que aqueles que empreenderam esse trabalho tivessem êxito em sua tarefa. O desenvolvimento dos métodos utilizados pelos químicos fisiológicos em suas investigações, o grande desenvolvimento da química orgânica e o conhecimento, não menos importante, de antissépticos e da ação das enzimas possibilitaram a realização de um estudo de proteínas vegetais com uma perspectiva razoável de sucesso (OSBORNE, 1924).

As principais fontes de proteínas vegetais atualmente em estudo científico e tecnológico e/ou no mercado são as seguintes (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009):

- Grãos de leguminosas como ervilhas (*Pisum sativum*), soja (*Glycine max*), tremoços (*Lupinus spp*), grão de bico (*Cicer arietinum*) ou amendoim (*Arachis hypogaea*);
- Cerais como trigo (*Triticum spp*), milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), cevada (*Hordeum vulgare*), centeio (*Secale cereale*), aveia (*Avena sativa*) ou sorgo (*Sorghum spp*);
- Sementes oleaginosas como o girassol (*Helianthus annuus*), a colza (*Brassica napus*), o gergelim (*Sesamum indicum*), o caroço de algodão (*Gossypium spp*) ou o cártamo (*Carthamus tinctorius*);
- Vegetais de raiz como batata (*Solanum tuberosum*), mandioca (*Manihot esculenta*) ou batata doce (*Ipomoea batatas*);
- Folhas de alfafa (*Medicago sativa*), mandioca, amaranto (*Amaranthus spp*) ou plantas aquáticas;
- Frutos como semente de uva (*Vitis vinífera*), sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) ou semente de mamão (*Carica papaya*).

Quanto ao conteúdo proteico, as sementes de leguminosas são caracterizadas por um teor de proteínas relativamente alto (de 17 a 40%) e os grãos de cereais possuem de 7 a 13% de proteínas. Aproximadamente 16 a 40% do peso das sementes oleaginosas são proteínas; tubérculos como a batata apresentam conteúdo proteico variando de 0,7 a 4,6%; a composição das folhas verdes pode variar significativamente dependendo do cultivar e da origem, a matéria seca compreende cerca de 10 a 20%, dos quais 1 a 5% são proteínas (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

A composição dos frutos é fortemente afetada pela variedade e maturação, em termos gerais, o teor de matéria seca varia entre 10 a 20%, sendo os açúcares, polissacarídeos e os ácidos orgânicos os principais constituintes e as proteínas estão presentes em quantidades muito

menores. No entanto, os dados fornecidos devem ser usados apenas como um guia, devido às grandes diferenças relatadas na composição (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

3.3.1 Reservas proteicas em sementes de leguminosas

Leguminosas são amplamente exploradas para obtenção de macronutrientes, tais como proteínas, carboidratos e lipídeos, devido às várias possibilidades de usos industriais e também ao seu valor nutricional. Entretanto, pouco se tem avançado na exploração de seus compostos funcionais e suas aplicações para diversos fins (RIBEIRO, 2013).

As sementes de leguminosas apresentam um teor, tipicamente, elevado em proteínas. De acordo com Mossé e Pernollet (1983), este teor proteico varia entre as diversas espécies de leguminosas, de 22 a 55%, sendo, no entanto, mais comum encontrar valores de 20 a 40%.

As proteínas encontradas nas sementes de leguminosas com maior representatividade são as denominadas proteínas de reserva. Além das proteínas de reserva, existem ainda muitas outras proteínas menores, incluindo proteases, inibidores, lectinas, lipoxigenases e proteínas de defesa, que por várias razões são relevantes na qualidade nutricional e funcional da planta (MOSSÉ; PERNOLLET, 1983).

Beccari em 1745 foi o iniciador dos trabalhos publicados sobre proteínas de sementes, entretanto, foi o trabalho realizado por Osborne em 1891 que inseriu os estudos de proteínas de sementes em uma base bioquímica consistente. Osborne e outros estudiosos diferenciaram as proteínas vegetais de acordo com a solubilidade em diversos solventes e as classificaram em frações extraídas em água pura (albuminas), soluções salinas diluídas (globulinas), soluções alcoólicas (prolaminas) e soluções alcalinas ou ácidas diluídas (glutelinas) (HELDT, 2005).

Na literatura, atualmente, ainda não há um sistema de classificação universalmente aceito, porém Shewry (2000) considera mais válido dividir as proteínas, primeiramente, em relação à sua função e, para as proteínas de reserva, fazer uso da classificação de Osborne modificada, que divide as proteínas de reserva em sementes em quatro grupos, estabelecidos pelas frações de Osborne e por seus coeficientes de sedimentação, que representam a medida de seu tamanho molecular. Dessa forma, os quatro grupos são as prolaminas, as albuminas 2S e as globulinas 7S e 11S (SHEWRY, 2000).

A maioria das sementes acumulam dois ou mais tipos de proteínas de reserva, embora um tipo seja geralmente o mais abundante. As albuminas e as globulinas, constituem as duas

classes proteicas mais representativas das leguminosas. As globulinas 7S são particularmente características de sementes de leguminosas e junto com as 11S formam a maior parte das proteínas de reserva. Essas globulinas também podem ser chamadas de leguminas devido serem muito características de sementes de leguminosas (MILLERD, 1975).

Balanços completos das proporções das classes de solubilidade de Osborne são comparativamente raros na literatura, entretanto, evidências indiretas sugerem que a maioria das leguminosas contém cerca de 70% de globulina, 10 a 20% de albumina e 10 a 20% de glutelina (NORTON, 1976). A Tabela 1 fornece as proporções de classes solubilizadas de proteínas em algumas leguminosas.

Tabela 1 – Proporções de classes solubilizadas de proteínas em leguminosas

Leguminosas	Albuminas (g/100 g proteína)	Globulinas (g/100 g proteína)	Glutelinas (g/100 g proteína)
Feijão	4	67	29
Favas	20	60	15
Ervilha	21	66	12
Amendoim	15	70	10
Soja	10	90	0

Fonte: Norton, 1976.

3.3.2 Aplicações de proteínas vegetais

As proteínas obtidas de fontes vegetais são usadas em sistemas de entrega de drogas e genes como nanocarregadores baseados em proteínas. As aplicações estendidas incluem o uso de entrega controlada como um revestimento de película, como hidrogéis, nanopartículas à base de albumina, micropartículas e como esferas. Alguns exemplos são (NEHETE et al., 2013):

- Proteínas de soro usadas como hidrogéis, sistemas de nanopartículas para encapsulação e entrega controlada de compostos bioativos (YUKO et al., 2008);
- Como uso anti-hipertensivo, como sementes de soja geneticamente modificadas (ESMAILI et al., 2011);
- Como potenciador da solubilidade da curcumina na indústria alimentar devido à estrutura proteína-micela (β -caseína), agindo como veículo nano (SILVA; MALCATA, 2005);
- Como veículos para bioativos, proteínas do leite (NEHETE et al., 2013);

- Como fonte de peptídeos bioativos, por exemplo, quatro peptídeos bioativos principais derivados da caseína atuam no sistema cardiovascular, sistema nervoso, sistema imunológico e sistema nutricional (SILVA; MALCATA, 2005);
- Como um novo antifúngico, por exemplo, proteínas de Pisumin obtidas a partir de *Pisum sativum* (YE; NG, 2003);
- Em microencapsulação (YUKO et al., 2008);
- Como controle de pragas: inibidor proteinase cisteína, uma proteína inseticida encontrada para controlar a atividade proteolítica da proteinase cisteína digestiva endógena no intestino médio de alguns insetos (NEHETE et al., 2013).

3.4 Principais métodos para obtenção de proteínas de sementes

Geralmente, os processos industriais empregados para extração, isolamento ou fracionamento de biomoléculas de valor agregado baseiam-se nos princípios da química analítica. Dessa forma, industrialmente são feitas modificações e adaptações às metodologias analíticas tradicionais, no intuito de viabilizar o processo em grande escala e alcançar objetivos industriais como máximo rendimento de extração, alta pureza, manutenção de funcionalidades, etc. (GALANAKIS, 2012).

A literatura reporta diferentes técnicas para determinação e extração de proteínas, dentre estas, as técnicas mais usuais para a extração de proteínas de matrizes vegetais compreendem a extração em meio aquoso alcalino, ácido, salino e com solventes orgânicos. O processo de extração é o mais comumente usado ao nível industrial devido à versatilidade, facilidade e ao custo operacional. Diferentes produtos podem ser obtidos com diversificados teores de pureza e aplicações a depender da técnica empregada e dos tratamentos dados aos extratos obtidos (GRANDE; CREN, 2016).

Com a finalidade de projetar um processo para a obtenção de conteúdo proteico, algumas considerações devem ser levadas em conta. É importante ter o conhecimento da quantidade de proteína necessária, o grau de pureza final, se a perda de atividade é aceitável e o tempo e custo da purificação. Outros fatores a serem considerados são o material de origem, ou seja, espécies, variação sazonal e estágio de desenvolvimento da cultura e estrutura da matéria prima (sementes, cascas, folhas, etc.) (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

Os principais produtos proteicos obtidos a partir dos processos de extração são: a farinha proteica, com teor de proteínas de até 65%; o concentrado proteico, com teor de

proteínas entre 65 e 80%; o isolado proteico, com teor de proteínas acima de 90%; além da proteína texturizada (produzida mediante o uso de um extrusor a partir da farinha proteica e apresenta um teor proteico de no mínimo 50%) e do hidrolisado proteico (produto com alto grau de pureza constituído principalmente por peptídeos e aminoácidos obtidos a partir da hidrólise de proteínas) (BOYE; BARBARA, 2012).

Os diferentes produtos apresentam propriedades e aplicações diferentes do ponto de vista industrial. As farinhas proteicas, por exemplo, são usadas como base para a produção de concentrados, isolados e hidrolisados proteicos. Entretanto, podem ser utilizadas industrialmente na forma pura ou adicionadas à farinha de trigo, com o objetivo de aumentar a estabilidade e a absorção de água dos produtos processados, aumentando a vida de prateleira dos mesmos. Geralmente, as farinhas proteicas possuem um custo que representa apenas 10% do custo total para a produção de isolado proteico, sendo uma opção proteica barata (REGITANO-D'ARCE, 2006).

Os concentrados proteicos, por causa da composição rica em proteínas e polissacarídeos, possuem propriedades funcionais tecnológicas de emulsificante, absorção de água, coesão e adesão, e por isso são muito úteis na indústria de processamento de carnes. Também podem ser utilizados na indústria de alimentos como fortificantes proteicos, principalmente em formulações de produtos livres de proteína animal. Na indústria de panificação, são adicionados como ingrediente para facilitar a formação de gel e melhorar a elasticidade da massa (REGITANO-D'ARCE, 2006).

O isolado proteico é aplicado como emulsificante na indústria de processamento de carne, aumentando o rendimento do processo, e também como agente gelificante para melhorar a textura de produtos substitutos de carne. Devido ao seu alto teor em proteínas e pureza, é usado na suplementação alimentar, também servindo de matéria prima para a indústria de fármacos e cosméticos, além de servir como base para hidrolisados proteicos (REGITANO-D'ARCE, 2006).

O hidrolisado proteico, por ser constituído por peptídeos e aminoácidos livres, é utilizado com suplemento proteico, empregado diretamente em dietas especiais ou como ingrediente em formulações de alimentos para fins especiais como alimentos para a terceira idade, alimentos infantis, alimentos para desportistas, para o combate de má nutrição, doenças metabólicas, entre outras aplicações (REGITANO-D'ARCE, 2006).

O primeiro passo no isolamento de proteínas requer a interrupção dos tecidos nos quais as proteínas são compartimentalizadas, pois as proteínas não são os principais componentes das sementes e geralmente aparecem ligadas a outros componentes, como material da parede celular. Cascas de sementes, geralmente, são removidos antes da extração, pois eles geralmente contêm compostos indesejáveis, como pigmentos, compostos fenólicos ou fibras (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

As sementes também são usualmente moídas antes da extração líquida. Este é um passo importante, pois uma fragmentação grosseira da semente pode prejudicar a capacidade de extração da proteína. A granulometria regular das sementes trituradas ou moídas influencia a reprodutibilidade da extração proteica. O teor de água da semente também influencia a granulometria e todo o material deve ser mantido em umidade constante antes da moagem (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

O próximo passo é a preparação de um extrato contendo a proteína em uma forma solúvel. A eficiência do método depende em grande parte da solubilidade diferencial dos vários componentes (proteína, carboidratos, pigmentos, fibras, etc.) em função da temperatura, pH e força iônica (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

O processo que faz uso da extração em meio alcalino ou ácido tem por finalidade extrair as proteínas de uma matriz sólida por solubilização das mesmas em meio aquoso, alterando o pH da solução extratora fora do ponto isoelétrico (pI) das proteínas, isto é, em pH onde apresentam maior solubilidade. O pI é a região de pH onde a solubilidade da proteína é mínima em decorrência da neutralização da carga superficial global da mesma. Isso significa que a proteína, em determinado $\text{pH} = \text{pI}$, mostra-se com cargas positivas e negativas iguais, associadas a molécula (BOYE; BARBARA, 2012).

Grande parte das proteínas de sementes apresentam maior solubilidade na faixa de pH alcalino, devido ao maior teor de aminoácidos do tipo ácido aspártico e ácido glutâmico, que compõem as proteínas de origem vegetal (GRANDE; CREN, 2016). Somado a isso, soluções salinas também são usadas para maximizar o rendimento de extração em meio alcalino, em decorrência do fenômeno de “*salting-in*”, que provoca a solubilização das proteínas em meio salino neutro de baixa concentração. O fenômeno oposto, de “*salting-out*” ou precipitação proteica, acontece na presença de soluções salinas neutras e sais bivalentes em altas

concentrações. Os principais solventes utilizados nesse processo são NaCl, NaOH, Na₂SO₄, Na₂CO₃, (NH₄)₂SO₄, além de MgCl₂ e CaCl₂ (BOYE; BARBARA, 2012).

Os fenômenos descritos anteriormente, da mesma forma que o ponto isoelétrico, modifica o equilíbrio iônico das proteínas contribuindo ou não a solvatação das moléculas com consequência sobre a solubilidade da mesma no meio aquoso de extração (CHIESA; GUANANSOUNOU, 2011).

A literatura reporta a importância do controle de alguns parâmetros de processo que influenciam na extração das proteínas como: razão sólido/solução extratora (faixa entre 1:5 a 1:20 m/v); pH (faixa entre 8 a 11 – extração alcalina e pH inferior a 4 – extração ácida); tempo de extração (30 a 180 minutos); agitação do sistema e temperaturas de extração de até 65 °C (DAMODARAN et al., 2010).

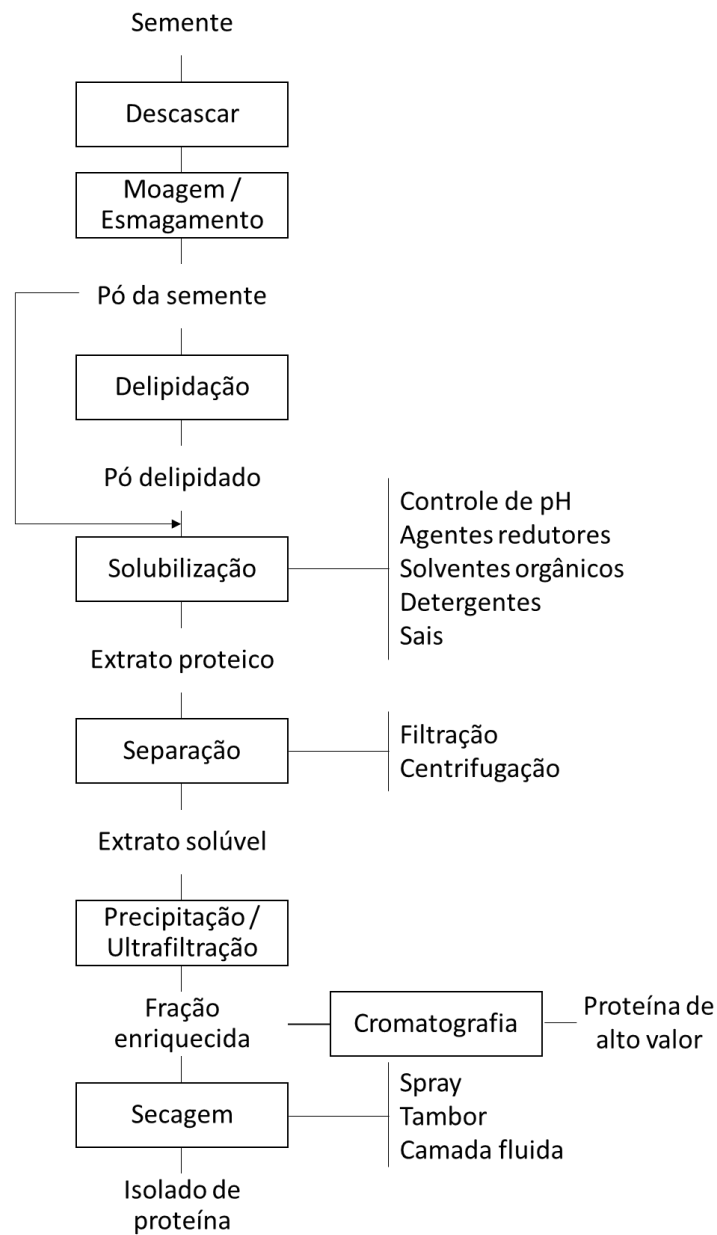
Todavia, dependendo do produto proteico que se deseja obter, o objetivo do processo de extração pode ser a solubilização das proteínas da matriz sólida na solução extratora (isolado proteico) ou a insolubilização das proteínas e a extração de outros constituintes da matriz solúveis em meio aquoso (concentrado proteico). Independente de qual seja o objetivo, os extratos obtidos podem passar por processos posteriores de separação e purificação que envolve centrifugação, filtração, secagem, precipitação por solventes orgânicos ou no ponto isoelétrico, etc. (GRANDE; CREN, 2016). A Figura 3 apresenta o fluxograma dos diferentes processos de extração de proteínas e seus produtos.

Uma vez que a proteína tenha sido extraída, é necessário separá-la de outros componentes indesejados. Processos de centrifugação, filtração e membranas (diálise) são as técnicas mais comuns de separação. Atualmente, a microfiltração tangencial ou de fluxo cruzado está recebendo maior atenção, principalmente para aplicações em grande escala (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

Após o passo de separação, a proteína está em solução, mas sua concentração pode ser muito diluída. Dessa forma, a próxima etapa consiste em concentrar rapidamente a solução proteica separada, mantendo-a em estado estável, geralmente por ultrafiltração ou precipitação. A precipitação, além de ser realizada com o uso de solventes orgânicos e adição de sais, pode ser feita com o uso do aquecimento ou polímeros de exclusão (GUÉGUEN, 1983).

A precipitação isoelétrica é o método mais comumente usado, pois conduz a uma extensa agregação de proteínas e modificação da sua solubilidade, causada principalmente por interações não covalentes. A exclusão de proteínas do meio por meios de agentes de aglomeração consiste na adição de polímeros neutros (dextroses, PEG, etc.) a dispersões proteicas, resultando na separação de uma fase rica em proteínas (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

Figura 3 – Principais operações unitárias para preparar isolado de proteína vegetal



Fonte: Adaptado de González-Pérez e Arellano, 2009.

A precipitação por ação do calor também pode ser usada como um passo de concentração, no entanto, ocorre a desnaturação proteica das proteínas termolábeis e o seu uso funcional subsequente são limitados. A precipitação térmica pode também ser utilizada para o fracionamento de proteínas, aproveitando as diferentes temperaturas de desnaturação das diversas proteínas presentes na matéria prima, embora esta técnica seja, atualmente, utilizada comercialmente para o isolamento proteico de proteínas termoestáveis (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

Seguindo os passos apresentados, é possível conseguir uma preparação proteica parcialmente purificada. A purificação adicional por técnicas cromatográficas produz uma preparação de proteínas de elevada pureza e principalmente utilizadas para proteínas de alto valor requeridas em quantidades relativamente pequenas, utilizadas preferencialmente pela indústria biofarmacêutica (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

Finalmente, o isolado proteico é seco. Este é um passo crítico em que a temperatura deve ser controlada para contornar a desnaturação da proteína. Temperaturas mais altas são, geralmente, aceitáveis para leguminas e proteínas de cereais. Os métodos de secagem mais utilizados são a secagem em tambor e a secagem por pulverização (geralmente em linha com um secador de leito fluidizado) (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

A liofilização é de interesse apenas para alguns produtos especiais. Na secagem em tambor, a solução da proteína é aplicada em um revestimento fino a uma superfície quente, fazendo com que uma grande quantidade de água evapore dentro de alguns segundos. Na secagem por pulverização, a solução proteica é atomizada e seca com ar quente. A secagem por pulverização é o processo industrial mais comum para produzir preparações proteicas termicamente não danificadas, embora possa ocorrer alguma agregação irreversível (GONZÁLEZ-PÉREZ; ARELLANO, 2009).

3.5 Proteínas termoestáveis

Dentre os fatores que afetam a estabilidade e cinética das proteínas, a temperatura é o que mais exige modificações das proteínas dentro do contexto biológico. Essas adaptações têm sido foco de inúmeras pesquisas, visando a compreensão dos mecanismos envolvidos. Proteínas estáveis em temperaturas elevadas são denominadas termofílicas, contra a terminologia equivalente – mesofílicas – para as mais termolábeis (GOMES et al., 2007).

Apesar de uma série de intensos estudos sobre os mecanismos moleculares da termoestabilidade de proteínas em muitos esforços de pesquisa teórica e experimental, este assunto ainda não é totalmente compreendido. Por conseguinte, investigações adicionais dos mecanismos de termoestabilidade não são apenas essenciais para a descrição teórica do enrolamento e estabilidade das proteínas, mas também são importantes para conceber biomoléculas eficientes que são funcionais a alta temperatura (SADEGHI et al., 2006).

As proteínas termoestáveis, de modo geral, possuem vantagens para a aplicação industrial, visto que processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm o risco de contaminação por microrganismos mesófilos, que são a maioria em um ambiente industrial, significativamente reduzido (PALMA-FERNANDEZ; GOMES; SILVA, 2002). Por outro lado, as temperaturas mais elevadas contribuem para a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos (McCARTHY et al., 2005).

Outra característica também das proteínas termoestáveis é a sua maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a estrutura molecular, menos expõe seu sítio de proteólise (ASGHARI et al., 2004). A maior resistência à desnaturação por alguns solventes orgânicos também tem sido relatada como uma propriedade das proteínas termoestáveis (GOMES et al., 2007).

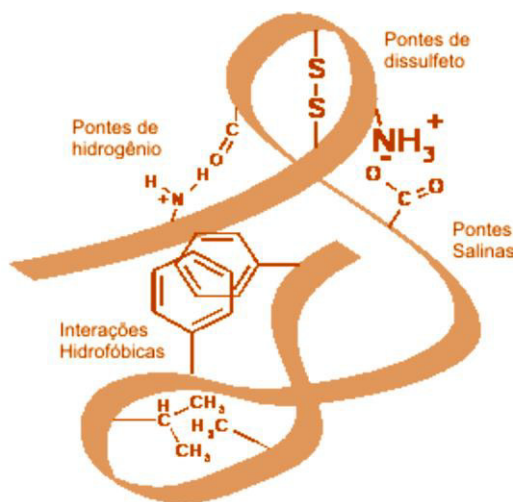
A descoberta de microrganismos termofílicos abriu novas oportunidades para a descoberta de proteínas com atividades em condições extremas de temperatura, possibilitando seu uso em muitos processos onde esta condição é necessária (ANDRADE et al., 1999). A aplicação biotecnológica de microrganismos para o uso industrial, apesar de suas vantagens, apresenta limitações. A principal delas está relacionada com o escasso número de linhagens termofílicas para a pesquisa de proteínas termoestáveis específicas (AQUINO, 2000). Além disso, para aplicação em indústrias alimentícia e farmacêutica, há restrições legais quanto ao uso dessas proteínas de fontes microbianas (COSTA, 2009).

Dessa forma, considerando as aplicações tecnológicas de proteínas sob as condições que a indústria exige, há uma busca por novas fontes. Muitos trabalhos na literatura relatam a extração de proteínas termoestáveis a partir de sementes de leguminosas (LIMA et al., 2013).

3.5.1 Características estruturais relacionadas à termoestabilidade das proteínas

A proteína é mantida por um delicado balanço de forças não covalentes, como pontes de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e força de van der Waals, como ilustra a Figura 4. Com o aumento da temperatura, essas interações são rompidas e a proteína se desdobra. Algumas proteínas recuperam sua conformação ativa após o resfriamento, mas, para a maioria, a desnaturação é irreversível (GOMES et al., 2007).

Figura 4 – Mecanismos de estabilização da estrutura da proteína



Fonte: Gomes et al., 2007.

A elevada rigidez intrínseca da proteína termoestável, decorrente da estabilidade do enovelamento, requer alta temperatura de atividade (maior que 40 °C) para promover o movimento térmico e o aumento da flexibilidade essencial para a atividade catalítica, isto é, a adaptação da proteína às temperaturas extremas configura ser resultado de um equilíbrio entre o aumento da rigidez responsável pela estabilidade térmica e a flexibilidade requerida para exercer sua função fisiológica (SHIRAKI et al., 2001).

Diversas razões têm sido atribuídas à maior estabilidade de proteínas termofílicas incluindo melhor ligação de hidrogênio, melhor empacotamento interno hidrofóbico, maior propensão a estrutura secundária, estabilização de hélice dipolar, melhor interação eletrostática, melhor interação de Van der Waals, melhor afinidade por cálcio, diminuição das glicinas e aumento das prolinas em cadeias, cadeias mais curtas, que diminuem em número e volume de cavidades internas e aumentam a interação aromática (QUEROL; PEREZ-PONS; MOZOVILLARIAS, 1996).

Segundo Bruins e Janssen (2001), duas estratégias evolutivas parecem definir a termoestabilidade:

- I. Fatores intrínsecos ou diretamente associados à estrutura da molécula, conduzindo à rigidez e ao dobramento; e
- II. Fatores extrínsecos, que contribuem a estabilizar as proteínas em um determinado meio, como alguns solutos, ligantes, chaperonas moleculares e o próprio substrato.

Os fatores intrínsecos que colaboram para a rigidez das proteínas estão relacionados com as estruturas primárias e secundárias das mesmas. O chamado “efeito hidrofóbico” é o principal mecanismo de termoestabilidade intrínseca da proteína e conduz o enovelamento, que resulta na estrutura nativa da molécula e reduz sua tendência ao desdobramento (GOMES et al., 2007).

Essa conclusão, de acordo com Scandurra et al., (1998), baseia-se nas seguintes observações: solventes polares desnaturam proteínas termoestáveis; resíduos hidrofóbicos são “sequestrados” para o interior da molécula, evitando o contato da água, e resíduos hidrofóbicos das proteínas termoestáveis são mais conservados que os hidrofílicos.

Embora as proteínas mesofílicas apresentem uma estabilidade básica dada pelo “core” hidrofóbico, que é a parte mais conservada da molécula, a diferença entre estas e as proteínas termofílicas é a hidrofobicidade; nessas últimas, aparece também nas regiões menos conservadas, dando formação a núcleos altamente hidrofóbicos (PACK; YOO, 2003).

O efeito hidrofóbico faz com que as substâncias apolares minimizem seus contatos com a água. A agregação das cadeias apolares dos aminoácidos no interior de uma proteína contribui para o aumento da entropia de dobramento da molécula, pois evita a formação de “gaiolas” ordenadas de moléculas de água em torno dos grupos hidrofóbicos. Quanto maior a hidropatia (tendências hidrofóbicas e hidrofílicas combinadas de cada aminoácido), maior a tendência de o aminoácido ocupar o interior da proteína (GOMES et al., 2007).

A maioria das proteínas termofílicas descritas apresenta altos teores de aminoácidos hidrofóbicos e com resíduos aromáticos. Os aminoácidos mais hidrofóbicos são Isoleucina (Ile), Valina (Val), Leucina (Leu), Fenilalanina (Phe), Cys e Met. Tanto a integridade dos aminoácidos formadores proteína, quanto à formação do núcleo hidrofóbico são essenciais para a sua viabilidade (DELATORRE et al., 2010).

Outras características específicas relacionadas com a termoestabilização de proteínas têm sido amplamente discutidas. Revisões detalhadas são encontradas em Vieille e Zeikus (2001). Dentre essas características, destacam-se:

- Pontes dissulfeto;
- Pontes de hidrogênio;
- Pareamento de íons;
- Interação eletrostática;
- Encurtamento do N e C terminais e ancoramento da terminação livre;
- Estabilização por ligação com metal;
- Modificação pós-tradução.

Entre os fatores extrínsecos de termoestabilização, destacam-se os solutos, proteínas ligantes, chaperonas moleculares (chaperoninas), sais, coenzimas, ativadores, poliaminas e o próprio substrato. Os sais inorgânicos ajudam na estabilidade da enzima por exercerem efeitos específicos, quando o íon do sal interage com a proteína na maneira conformacional e, geral, relacionado com a redução da atividade da água. As chaperoninas são chaperonas moleculares e têm como função a restauração de proteínas parcialmente desnaturadas pelo calor (GOMES et al., 2007).

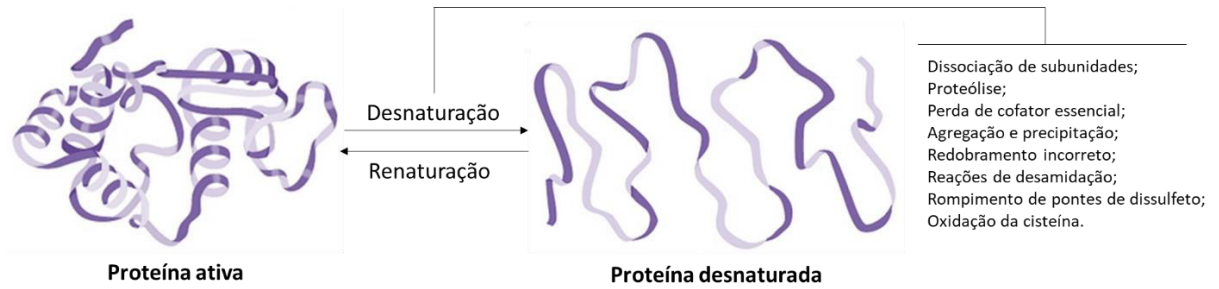
Diferentes proteínas são desnaturadas em diferentes temperaturas. O calor fornece energia para romper as interações não covalentes, que estabilizam a estrutura nativa da proteína, expondo e permitindo a interação de grupos hidrofóbicos presentes no seu interior (ARAÚJO, 1995). Um aumento da temperatura favorece vibrações no interior da molécula e a energia dessas vibrações pode torna-se alta o suficiente para desfazer a estrutura primária da proteína (CAMPBELL, 2001).

O mecanismo de desnaturação por efeito da temperatura é altamente complexo e envolve, inicialmente, a desestabilização da maioria das interações não-covalentes. As pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e de Van der Waals são interações exotérmicas, sendo desestabilizadas à alta temperatura e estabilizadas à baixa temperatura (DELATORRE et al., 2010).

Entretanto, como as pontes de hidrogênio se encontram no interior da cadeia peptídica, elas são mais estáveis em uma faixa mais ampla de temperatura. Por outro lado, as interações hidrofóbicas são endotérmicas, sendo estabilizadas em temperaturas elevadas e desestabilizadas

em temperatura baixa. Dessa forma, com o aumento da temperatura a estabilidade nestes dois tipos de interações se opõe (DELATORRE et al., 2010). A Figura 5 apresenta os efeitos da alta temperatura sobre a estrutura proteica.

Figura 5 – Efeitos da alta temperatura sobre a estrutura da proteína



Fonte: Adaptado pelo autor a partir de informações de Gomes et al., 2007.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Vegetal da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e foram utilizadas sementes das seguintes espécies: *Acacia mangium* (Acácia australiana), *Mimosa caesalpiniaefolia* (Sansão do campo) e *Stylosanthes capitata* (Estilosante).

As sementes maduras, livres de tratamentos químicos ou físicos, foram adquiridas comercialmente da Empresa Arbocenter Comércio de Sementes Ltda (Birigui, São Paulo, Brasil). As sementes foram armazenadas em embalagens plásticas e acondicionadas em geladeira a 6 °C.

4.2 Equipamentos

As sementes foram trituradas utilizando um moedor de café CADENCE MDR301. O pH de tampões, soluções e amostras foi medido através do pHmetro de bancada EDGE HI 2002 da HANNA. Durante os ensaios de extração, precipitação e diálise foi usado o agitador magnético múltiplo com aquecimento SP – 10206/A da SPLABOR. Para a separação das amostras foi usada a centrífuga refrigerada 2-16PK da SIGMA e a micro centrífuga refrigerada de bancada NT 805 da NOVATÉCNICA.

Para a determinação da concentração proteica, as medidas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro SP 2000 UV da BEL PHOTONICS. No ensaio para verificação da estabilidade térmica, a temperatura foi mantida constante por banho maria médio digital NT 245 com precisão de 0,1 °C da NOVATÉCNICA. A manutenção da temperatura durante o experimento foi realizada usando banhos de gelo. Outros equipamentos utilizados foram a balança analítica FA2104N da BIOPRECISA e agitador vortéx de tubos AP – 56 da PHOENIX LUFERCO.

4.3 Reagentes

Reagentes de grau analítico como *n*-hexano, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, cloreto de sódio, sulfato de amônio, ácido clorídrico e tris hidroximetil aminometano foram obtidos comercialmente da VETEC.

4.4 Delipidação das sementes

As sementes foram trituradas e o pó obtido foi delipidado com *n*-hexano na proporção 1:5 (m/v) durante 3 horas em temperatura ambiente (25 °C), sendo repetido se necessário (MARTINS, 2015). Em seguida, o solvente foi evaporado em capela de exaustão e o pó delipidado estocado em frasco fechado e conservado em temperatura ambiente para preparação de extratos proteicos.

4.5 Extração de proteínas

Foram aplicados dois processos para obtenção do extrato proteico das sementes selecionadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5.1 Processo 1

O pó delipidado das sementes foi ressuspensionado e macerado (durante 3 minutos) utilizando tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,2) contendo NaCl 0,1 M na proporção 1:20 (m/v). Após a maceração, o pó permaneceu em contato com solução tampão até completar o período de 30 minutos sob banho de gelo e agitação constante. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 11.000 xg por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante, identificado como extrato bruto, foi coletado para dar prosseguimento ao processo.

4.5.2 Processo 2

O pó delipidado foi ressuspensionado e macerado (tempo de 3 minutos) em tampão tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contendo NaCl 0,1 M, na proporção de 1:20 (m/v). Após o tempo de maceração, o pó permaneceu em contato com a solução tampão até completar o tempo de 30 minutos sob agitação constante e banho de gelo. Após esse período, o material foi centrifugado sob as mesmas condições do Processo 1 e o sobrenadante, denominado extrato bruto, recolhido.

4.6 Recuperação de proteínas termoestáveis

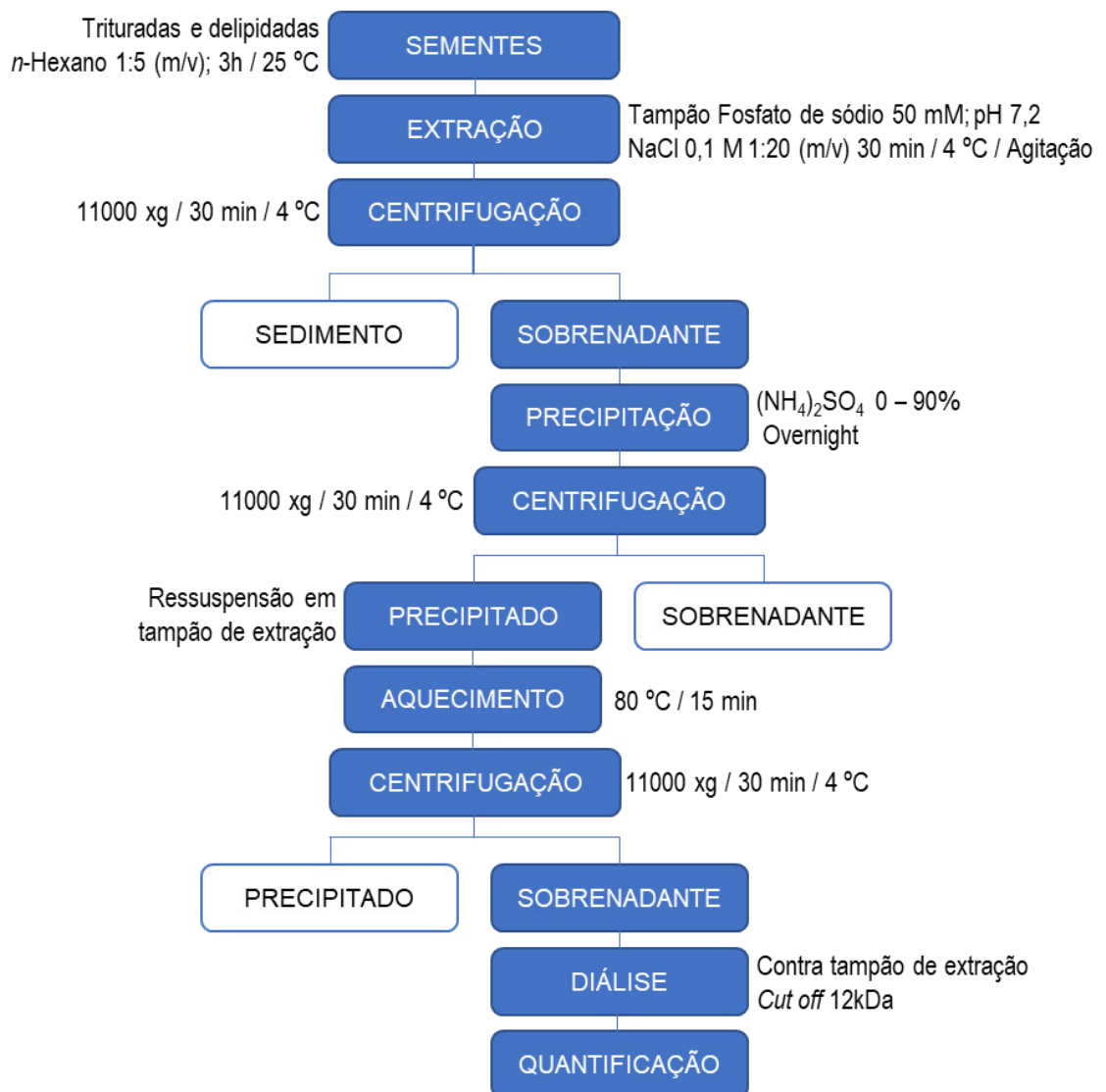
4.6.1 Processo 1

Após a extração, realizou-se a precipitação com sulfato de amônio na faixa 0 – 90% de saturação sob agitação moderada e banho de gelo. A agitação das amostras após a adição do sal ocorreu durante 30 minutos e, posteriormente, as amostras foram acondicionadas em geladeira (4 °C) para que o tempo de precipitação fosse estendido (*overnight*). Decorrido o

tempo da precipitação, as amostras foram então centrifugadas a 11.000 xg por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 2 ml de tampão de extração.

As amostras foram submetidas a aquecimento de 80 °C durante 15 minutos (SOLANKI et al., 2018) e após essa etapa, o material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriormente citadas. O sobrenadante foi obtido e dialisado exaustivamente contra tampão de extração (*cut-off*: 12 kDa). Todos os volumes foram registrados. O fluxograma da Figura 6 resume o procedimento descrito para o Processo 1.

Figura 6 – Processo 1 de extração e purificação parcial

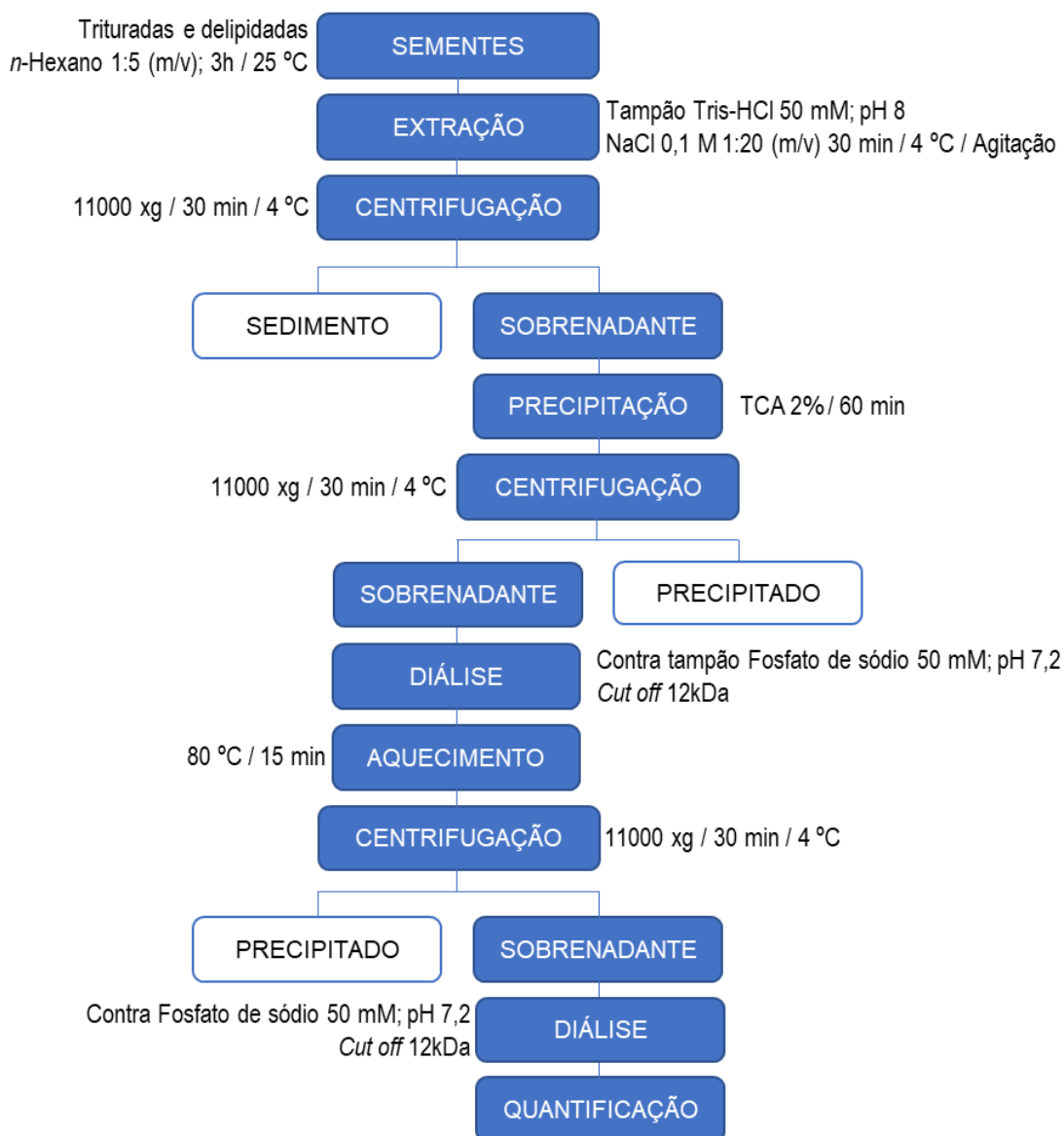


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6.2 Processo 2

As proteínas do extrato bruto foram precipitadas com TCA 2% sob agitação moderada em banho de gelo por 60 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado nas mesmas condições já mencionadas e o sobrenadante obtido foi submetido a diálise exaustiva contra tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7.2) acrescido de NaCl 0,1 M (*cut-off*: 12 kDa). Como no Processo 1, as amostras retiradas da diálise foram aquecidas a 80 °C durante 15 minutos e depois realizada uma centrifugação nas mesmas condições já descritas anteriormente. As amostras foram novamente dialisadas contra o mesmo tampão. O fluxograma da Figura 7 apresenta o Processo 2 de forma resumida.

Figura 7 – Processo 2 de extração e purificação parcial



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Análise estatística

Os dados foram obtidos em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a significância das diferenças entre as médias seguido do teste Tukey ($p < 0,05$; $F_{\text{crítico}} = 5,14$; nível de confiança de 95%). O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi usado para avaliar a distribuição normal dos dados. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism (versão 7.00 / 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a possibilidade de sementes de leguminosas serem uma fonte promissora de proteínas com importância biotecnológica, este trabalho apresentou um estudo voltado a processos de extração e fracionamento para obtenção de proteínas termoestáveis obtidas de sementes de *Acacia mangium*, *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Stylosanthes capitata*.

Uma vez que sementes de leguminosas são subexploradas e pouco de suas moléculas conhecidas pela comunidade científica, as pesquisas desenvolvidas com o intuito de detectá-las e avaliar atividades biológicas tornam-se relevantes, não somente por fornecer novos insumos para aplicações biotecnológicas, mas também para estimular estudos para uso racional dessas espécies vegetais, visando práticas de conservação da biodiversidade (MARTINS, 2015).

Os resultados dos experimentos deste trabalho são apresentados obedecendo a seguinte sequência: inicialmente, no item 5.1, é mostrada a curva padrão construída para determinação da concentração proteica, de acordo com a metodologia desenvolvida por Bradford (1976). No item 5.2, são expostos os resultados obtidos por meio do Processo 1 de extração e purificação parcial proteica das sementes selecionadas. O teor de proteínas totais é mostrado na Figura 9 e a comparação dos rendimentos e percentuais de recuperação de proteínas em cada uma das sementes são mostrados na Tabela 2.

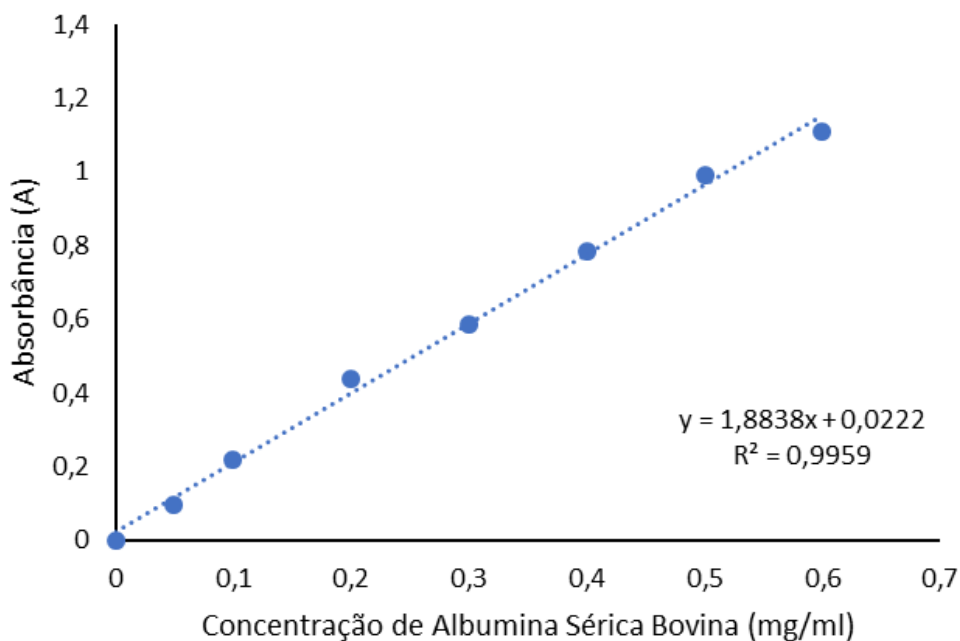
Em seguida, no item 5.3, são mostrados os resultados atingidos através da extração e purificação parcial estabelecidas no Processo 2. O teor de proteínas totais, os rendimentos e a recuperação proteica obtidos são mostrados na Figura 10 e Tabela 3, respectivamente. Finalmente, no item 5.4, é discutido a influência do tratamento térmico usado na recuperação de proteínas de sementes de leguminosas.

5.1 Quantificação proteica

A quantidade de proteína obtida foi mensurada de acordo com a metodologia desenvolvida por Bradford (1976). Os cálculos foram realizados a partir de uma curva padrão, construída por meio das leituras de absorbância para concentrações já conhecidas de BSA, conforme mostrado na Figura 8. O teor de proteínas totais (mg de PT) foi determinado como produto resultante da multiplicação entre a concentração de proteínas (mg/ml) e volume final da amostra (ml).

O ensaio foi desenvolvido em duplicata e diluições foram realizadas nas amostras para que as leituras de absorbância apresentadas estivessem dentro dos valores estabelecidos na curva padrão correspondendo a concentrações de proteína adequadas.

Figura 8 – Curva padrão



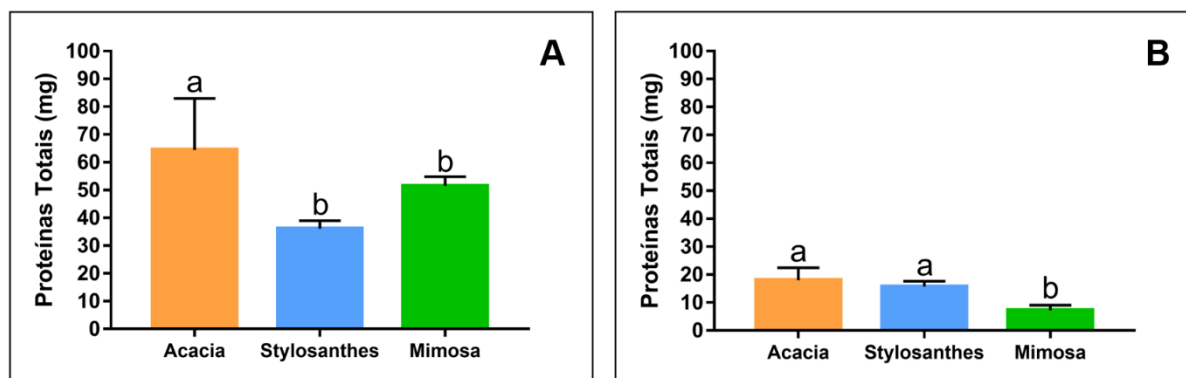
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Avaliação do Processo 1 de extração e fracionamento proteico

Os resultados obtidos por meio do Processo 1 envolvendo extração com solução salina tamponada (NaCl 0,1 M e Fosfato de sódio 50 mM; pH 7,2) e precipitação com sulfato de amônio (faixa de saturação 0-90%) seguido de tratamento térmico (80 °C) são exibidos na Figura 9.

Houve maior recuperação de proteínas em extratos das sementes de *A. mangium* (64,48 mg de PT) comparado com as outras sementes. Da mesma forma, a fração obtida após precipitação de proteínas do extrato de *A. mangium* com sulfato de amônio apresentou maior teor de proteínas (18,07 mg de PT). Os extratos brutos das sementes de *S. capitata* e *M. caesalpiniaefolia* apresentaram, respectivamente, 36,11 e 51,43 mg de PT. As suas frações correspondentes obtidas com SA 0-90% apresentaram 15,71 e 7,21 mg de PT.

Figura 9 – Teor de proteínas totais das sementes *Acacia mangium*, *Stylosanthes capitata* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em extratos obtidos a pH 7,2 (A) e frações proteicas com o uso de sulfato de amônio 0-90% e aquecimento (B). Barras indicam desvio padrão na determinação em triplicata. As médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).



Em termos de balanço de massa proteico, observa-se que não foi possível recuperar completamente a quantidade de proteína solúvel inicial para todas as sementes, visto que se recuperou 28,02; 43,50 e 14,03% de proteínas de *A. mangium*, *S. capitata* e *M. caesalpiniaefolia*, respectivamente (Tabela 2). Este fato se deve tanto a perdas inerentes ao processo de precipitação quanto a remoção de proteínas termolábeis pelo processo de aquecimento e centrifugação (FREITAS, 2011).

Tabela 2 – Rendimentos médios e percentual da recuperação proteica do Processo 1

mg de proteína / g de semente			
Sementes	<i>A. mangium</i>	<i>S. capitata</i>	<i>M. caesalpiniaefolia</i>
Extrato Bruto	85,98 ± 1,32	48,14 ± 2,85	68,58 ± 3,34
Fração SA 0-90%	24,09 ± 4,41	20,94 ± 1,96	9,62 ± 1,81
Recuperação proteica (%) *	28,02	43,50	14,03

*Calculado com base na quantidade de proteína contida no extrato.

Quanto à escolha do tampão de extração usado no processo 1, diversos estudos apresentam a extração de proteínas de sementes em tampões com pH próximos a neutralidade e que contenham solução salina em baixa concentração, o que está intimamente ligado ao aumento da força iônica do meio e o consequente aumento da solubilidade das proteínas, fenômeno caracterizado como “*salting in*” (SILVA et al., 2010).

Solanki et al. (2018) alcançaram um rendimento proteico no extrato de 249,5 mg de PT/g de semente usando uma solução extratora com pH 7,2 em semente de *Prosopis cineraria*, pertencente à família das plantas leguminosas. Sousa (2013) utilizou solução salina tamponada

em pH neutro para extração de proteínas solúveis de sementes de *Mimosa caesalpiniaefolia* e obteve um rendimento proteico de 0,03 mg de PT/g de semente. Chandrika e Shaila (1987) purificaram uma lectina de sementes de *Mimosa invisa* utilizando na extração uma solução salina tamponada em pH 7,2 contendo fosfato de potássio 10 mM e NaCl 0,15 M. O rendimento da lectina purificada foi de 50 mg PT/g de semente.

O isolamento de proteínas com atividade antiviral de sementes de *Phaseolus vulgaris* foi feito por Ye et al. (2001) usando pH neutro para obtenção do extrato aquoso e foi conseguido um rendimento proteico correspondente a 0,053 mg de PT/g de semente. Sementes de *Phaseolus mungo* foram usadas na extração em pH 7,2 para obtenção de proteínas antimicrobianas apresentando um rendimento equivalente a 41,76 mg de PT/g de semente (YE; NG, 2000).

O uso da precipitação para recuperação das proteínas é uma operação unitária comum no início das etapas de recuperação e purificação de bioprodutos ou *downstream processing* (DSP) com a finalidade de diminuir o volume inicial colaborando assim para as etapas posteriores.

Normalmente, não é possível alcançar alta purificação através da precipitação, pois a proteína alvo (termoestável) precipita junto com outras proteínas, entretanto essa é uma operação considerada primordial no fracionamento e purificação primária de proteínas, visto que requer o uso de equipamentos simples e baixo consumo de energia (PESSOA et al., 2011). Além disso, as proteínas frequentemente são mais estáveis como precipitados e deste modo a concentração de proteínas proporciona vantagens para armazenamento e redução do tamanho de equipamentos durante a sequência de passos do fracionamento proteico (SCOPES, 2004).

Diante do exposto, neste estudo optou-se pela precipitação proteica utilizando sulfato de amônio por ser um dos métodos de fracionamentos mais empregados e eficientes, visto que não provoca a desnaturação proteica por aumentar a estabilidade da conformação nativa (MARTINS, 2001). Além disso, o sulfato de amônio apresenta acentuada solubilidade em água, baixo calor de diluição e devido a densidade de suas soluções saturadas ser menor do que a densidade das proteínas, permite que a coleta do precipitado seja por centrifugação (CUTLER, 2004).

O conteúdo de proteína solúvel estimado nas sementes das espécies em estudo corrobora com resultados encontrados em outras espécies de leguminosas utilizando

metodologia semelhante. Sawasdipuksa et al. (2011) também extraíram proteína de sementes de leguminosas arbóreas *Pithecellobium dulce* usando precipitação de 80% de sulfato de amônio e posterior tratamento térmico (20 a 100 °C) por 15 minutos. Os resultados mostraram um rendimento de 32,60 mg de PT/g de semente e uma recuperação final de 2,4% das proteínas do extrato bruto inicial.

A precipitação de proteínas requer a aplicação de operações unitárias posteriores para remoção do agente precipitante e recuperação do precipitado formado. A operação usada para recuperar os precipitados de proteína formados é comumente a centrifugação ou filtração. A separação dos traços finais do agente precipitante é realizada, em geral, por diálise ou diafiltração, quando a precipitação for por salinificação (BOHÓRQUEZ, 2014).

Nos casos em que são aplicados solventes orgânicos ou sais voláteis como agentes precipitantes, torna-se possível reciclá-los através de destilação simples ou aquecimento, respectivamente (WATANABE et al., 2006). Algo que é industrialmente interessante, visto que envolve a redução de gastos ocasionado pela recuperação de reagentes usados no processo, além da redução de impactos ambientais por causa da diminuição de efluentes. Diante do exposto, técnicas como centrifugação e diálise foram aplicadas no presente estudo.

5.3 Avaliação do Processo 2 de extração e fracionamento proteico

Na Figura 10, estão apresentados os teores médios de proteína total obtidos através do Processo 2, caracterizado pelo uso de solução salina tamponada levemente alcalina (NaCl 0,1 M e Tris-HCl 50 mM; pH 8), TCA 2% como agente precipitante e com posterior tratamento térmico (80 °C). O teor de proteínas totais nos extratos de *A. mangium*, *S. capitata* e *M. caesalpiniaefolia* foi 56,64; 37,48 e 37,64 mg de PT, respectivamente.

Após precipitação e aquecimento, as frações de *A. mangium*, *S. capitata* e *M. caesalpiniaefolia* apresentaram, respectivamente, 2,51; 1,23 e 0,60 mg de PT. Os rendimentos proteicos médios obtidos e o percentual de recuperação das proteínas são mostrados na Tabela 3. A recuperação proteica para todas as sementes foi inferior a 5%. Após precipitação, coletou-se apenas o sobrenadante para dar prosseguimento a purificação parcial e, dessa forma, grande parte do conteúdo proteico foi desnaturado permanecendo na fase precipitada.

Figura 10 – Teor de proteínas totais das sementes *Acacia mangium*, *Stylosanthes capitata* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em extratos obtidos a pH 8,0 (A) e frações proteicas com o uso de ácido tricloroacético 2% e aquecimento (B). Barras indicam desvio padrão na determinação em triplicata. As médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

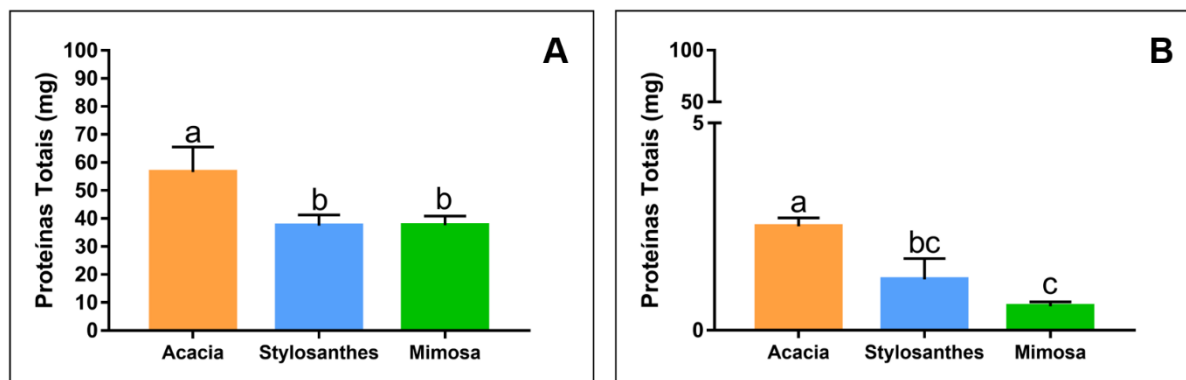


Tabela 3 – Rendimentos médios e percentual da recuperação proteica do Processo 2

mg de proteína total / g de semente			
Sementes	<i>A. mangium</i>	<i>S. capitata</i>	<i>M. caesalpiniaefolia</i>
Extrato Bruto	75,52 ± 0,43	49,97 ± 3,79	50,19 ± 3,20
Fração	3,34 ± 0,20	1,64 ± 0,50	0,78 ± 0,10
Recuperação proteica (%)*	4,43	3,28	1,55

*Calculado com base na quantidade de proteína contida no extrato.

A solução extratora utilizada no Processo 2 mostrou-se eficaz e também foi usada por pesquisadores anteriores. Benjakul et al. (2000) relataram aumento da solubilização de proteínas isoladas de sementes das espécies de feijão caupi, amendoim e feijão guandu em meio alcalino obtendo rendimentos proteicos equivalentes a 718, 1299 e 240 mg PT/g de semente, respectivamente. Uma proteína antimicrobiana foi extraída em meio alcalino (pH 8,8) de sementes da espécie *Acacia confusa* e o rendimento alcançado foi de 8 mg PT/g de semente (LAM; NG, 2010).

Li et al. (2012) extraíram proteínas com potencial antifúngico de sementes da espécie *Sophora alopecuroides* utilizando solução salina tamponada com fosfato 0,01 M (pH 8) e atingiram um rendimento proteico correspondente a 66,4 mg PT/g de semente. Peptídeos de *Pennisetum glaucum* foram extraídos em solução alcalina pH 8,5 (AGRAWAL; JOSHI; GUPTA, 2016). Extrato de albumina de semente de ervilha (*Pisum sativum L.*) foi adquirido usando tampão borato 0,2 M pH 8,0 contendo NaCl 0,5 M e apresentou 411,4 mg PT/g de semente (OLMEDO et al., 2017).

O uso de solventes orgânicos como TCA para precipitação de proteínas é um método baseado na redução da constante dielétrica do meio, o qual provoca a agregação de proteínas por interação de cargas. A desvantagem do uso dessa metodologia é a possível desnaturação das proteínas. Entretanto, esse fator pode ser reduzido por meio da diminuição da temperatura para valores em torno de 0 °C, pois em temperaturas baixas a flexibilidade das biomoléculas é limitada, minimizando assim a capacidade de interação do solvente usado e consequente desnaturação irreversível das proteínas (BOHÓRQUEZ, 2014).

Dessa forma, a precipitação com o uso de solventes orgânicos depende muito da temperatura. Embora o mecanismo convencional seja associado a mudança da constante dielétrica do meio, esse argumento não pode ser sempre considerado, visto que, conforme a temperatura é aumentada, o efeito desnaturante dos solventes orgânicos é intensificado, pois as interações hidrofóbicas intermoleculares são fortalecidas (BOHÓRQUEZ, 2014). Além disso, a concentrações elevadas do solvente orgânico, o processo de agregação da proteína é induzido e as modificações na estrutura nativa da proteína agregada irão depender principalmente da temperatura e termoestabilidade da proteína, propriedade que está associada as forças hidrofóbicas da proteína em questão (BOHÓRQUEZ, 2014).

Os solventes apropriados para precipitação de proteínas são aqueles não tóxicos e miscíveis em água em todas as proporções (CUTLER, 2004). O uso de ácidos como precipitantes proteicos tem sido extensivamente estudado. No caso do TCA, as concentrações mais usuais são 2 a 12% (ARISTOY; TOLDRÁ, 1991).

Carreira et al. (2003) estudaram a influência da precipitação pelo ácido tricloroacético (TCA) sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína. O TCA foi adicionado à solução de hidrolisado com uma concentração de 10% (p/v) sob vigorosa agitação. Os resultados desse estudo mostraram que ocorreu a eliminação de proteínas e peptídeos de elevado peso molecular, isolando no sobrenadante apenas peptídeos de baixo peso molecular. Contudo, de acordo com Yvon et al. (1989) a precipitação com o TCA não está relacionada apenas ao tamanho da cadeia polipeptídica, mas é também fortemente influenciada pelo grau de hidrofobicidade de proteínas com baixo peso molecular. Por isso, o TCA é o método mais popular e preferido para a preparação de amostras para análise proteômica (RAJALINGAM et al., 2009).

Wang, Tai e Chen (2008) realizaram um estudo sobre a otimização da extração de proteínas de tecidos vegetais e citaram que em sementes de leguminosas, como soja e

amendoim, o método de precipitação com TCA pode produzir uma melhor resolução dos perfis proteicos de sementes de leguminosas em géis. Dessa forma, o uso do TCA nos estudos apresentados mostra-se eficiente para obtenção de proteínas desnaturadas contidas no precipitado para identificação. Entretanto, neste trabalho, o TCA foi utilizado com o intuito de obter proteínas ainda em sua conformação nativa contidas no sobrenadante.

Diante do exposto, associa-se a baixa recuperação proteica obtida com o uso do TCA, a precipitação e possível desnaturação da maioria das proteínas presente na amostra. Além disso, a precipitação realizada em baixas temperaturas (como a que foi realizada nesse estudo), favorece a interação do solvente com água e torna menos significativa a interação com as proteínas, de forma que a precipitação se torna induzida pelo efeito de desidratação ocasionado nas superfícies de moléculas isoelétricas da proteína (BOHÓRQUEZ, 2014).

5.4 Influência do tratamento térmico na recuperação proteica

As frações foram submetidas a tratamento térmico como o objetivo de eliminar proteínas indesejadas com base na termoestabilidade. Assim, proteínas lábeis foram depletadas.

O uso do calor como etapa de purificação é uma prática comum quando a proteína de interesse é termoestável (SILVA, 2012). Klomklao et al. (2010) usou como primeira etapa, na purificação de um inibidor de tripsina de *Vigna angularis*, tratamento térmico do extrato total a 90 °C durante 10 minutos e mostrou como resultado o aumento da atividade dessa proteína termoestável cerca de 6 vezes em relação ao controle. Da mesma maneira, essa etapa foi realizada para a obtenção de um inibidor proteico termoestável de sementes de *Vigna radiata*, sendo sua atividade aumentada cerca de 3 vezes em relação ao controle (KLOMKLAO et al., 2011).

Costa, Araújo e Porto (2018) desenvolveram um trabalho de obtenção de um inibidor de tripsina a partir de sementes de *Cassia grandis*. Esta enzima demonstrou alta termoestabilidade e apresentou potencial biotecnológico como inseticida, oferecendo métodos alternativos para combater pragas e podendo ser uma ferramenta potencial para aplicações futuras na agricultura.

Solanki et al. (2018) relataram atividade antifúngica de uma proteína termoestável isolada da semente de *Prosopis cineraria*, que pode ser potencialmente explorada para gerenciar doenças fúngicas pós-colheita de frutas através de meios alternativos para reduzir o

uso de produtos químicos perigosos. O uso de biofungicidas ecológicos é um passo em frente para promover a agricultura sustentável. A proteína foi purificada em diferentes temperaturas (10 a 80 °C) por 10 minutos. Como conclusão, os autores observaram que a proteína manteve sua termoestabilidade até 50 °C durante 10 minutos.

Lima et al., (2013) mostraram que sementes de *Libidibia ferrea*, uma leguminosa nativa do Brasil, possuem uma amilase termoestável com potencial aplicação industrial, principalmente em processos que envolvem o processamento do amido. A relativa estabilidade a 60 °C da proteína presente no extrato é uma característica particularmente interessante, podendo ser estas sementes uma nova fonte de enzimas para fins biotecnológicos. Levando em conta a importância das amilases como enzimas industriais, a caracterização desta enzima em sementes de uma espécie nativa do Brasil fornece informações preciosas para o conhecimento de novos compostos bioativos da flora brasileira, com potencialidades de uso em diversos processos tecnológicos (LIMA et al., 2013).

Diante do exposto, a padronização de processos para obtenção de proteínas termoestáveis tem grande potencial industrial para diversos segmentos.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que proteínas termoestáveis podem ser obtidas de extratos de sementes de *A. mangium*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. capitata* por diferentes processos com rendimentos variáveis. Melhores resultados em termos de teor proteico foram obtidos através de extração em tampão neutro, precipitação com sulfato de amônio e aquecimento.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, H.; JOSHI, R.; GUPTA, M. Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 204, v. 1, p. 365-372, 2016.
- ANDRADE, C. M. M. C.; PEREIRA Jr, N.; ANTRANIKIAN, G. Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 287-298, 1999.
- AQUINO, A. C. M. M.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Studies on a thermostable α -amilase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 61, p. 323-328, 2000.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: Teoria e Prática**. Viçosa – UFV, Imprensa Universitária, p. 335, 1995.
- ARISTOY, M. C.; TOLDRÁ, F. Deproteinization techniques for HPLC amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1792-1795, 1991.
- ASGHARI, S. M.; KHAJCH, K.; RANJBAR, B.; SAEDI, R. J. J.; NADERI-MANESH, H. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 173, 2004.
- BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; THUMMARATWASIK, P. Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some thai legume seeds. **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, p. 107-127, 2000.
- BOHÓRQUEZ, M. A. M. **Avaliação do etanol como agente precipitante de glicosil hidrolases produzidas por *Trichoderma harzianum* P49P11**. 2014. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.
- BOYE, J. I & BARBARA, C. Protein processing in food and bioproduct manufacturing and techniques for analysis. In: **Food and Industrial Bioproducts and Bioprocessing**. John Wiley & Sons, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRUINS, M.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. Thermozyms and their applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 90, p. 155, 2001.

- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3 ed. Editora Artmed, Porto Alegre, p. 752, 2001.
- CARREIRA, R. L.; ORNELLAS, C. B. D.; MORAIS, H. A.; MOTTA, S. D.; SILVESTRE, M. P. C. Efeito da precipitação pelo ácido tricloroacético (TCA) e da ultrafiltração sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína. **Science and Agrotechnology**, v. 27, n. 2, p. 414-421, 2003.
- CARUGO, O. Amino acid composition and protein dimension. **Protein Science**, v. 17, p. 2187-2191, 2008.
- CHANDRIKA, R.; SHAILA, M. S. Isolation and properties of a lectin from the seeds of *Mimosa invisa* L. **Journal of Biosciences**, v. 12, n. 4, p. 383-391, 1987.
- CHIESA, S.; GNANSOUNOU, E. Protein extraction from biomass in a bioethanol refinery – Possible dietary applications: Use as animal feed and potential extension to human consumption. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 427-436, 2011.
- CONTESSOTO, V. G.; OLIVEIRA JR, A. B.; CHAHINE, J.; OLIVEIRA, R. J.; LEITE, V. B. P. Introduction to the protein folding problem: no approach using simplified computational models. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 40, n. 4, 2018.
- COSTA, R. J. **Avaliação do processo de extração de lipases de semente de trigo**. 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2009.
- COSTA, R. M. P.; ARAÚJO, V. F.; PORTO, A. L. CgTI, a novel thermostable Kunitz trypsin-inhibitor purified from *Cassia grandis* seeds: Purification, characterization and termiticidal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 2296-2306, 2018.
- CRISIL RESEARCH. **Advanced enzyme Technologies LTDA IPO Grade 3/5 (Average)**, 2013. Disponível em: < <http://www.crisil.com/ipo-gradings> >. Acesso em de 05 outubro de 2018.
- CUTLER, P. **Protein Purification Protocols**. Humana Press, New Jersey, 2^a ed, p. 101-124, 2004.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, N. L.; FENNERMA, O. R. **Química de Alimentos**. 4 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.
- DELATORRE, A. B.; LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; BARBOSA, J. B.; MARTINS, M. L. L. Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis de importância comercial. **Perspectivas online**, v. 4, n. 16, 2010.

ESMAILI, M.; GHAFARI, M. S.; MOOSAVI-MOVAHEDI, Z.; ATRI, M. S.; SHARIZADEH, A.; FARHADI, M. Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin: Food industry application in LWT. **Food Science and Technology**, v. 72, p. 44-2166, 2011.

FREEDONIA, G. World enzymes: industry study with forecasts for 2017 & 2022. **The Freedonia Group**, p. 338, 2014.

FREITAS, J. A. **Purificação e caracterização de uma peroxidase de raízes de feijão de corda (*Vigna unguiculata L. Walp.*) e sua aplicação na remoção de fenóis**. 2011. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, 2011.

GALANAKIS, C. M. Recovery of high added value componentes from Food wastes: Convetional, emerging Technologies and commercialized applications. **Trends in Food Science Technology**, v. 26, p. 68-87, 2012.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications - Review. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GONZÁLEZ-PÉREZ, S.; ARELLANO, J. B. Vegetable protein isolates. In: PHILIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of Hidrocolloids**. 2 ed. Food Science, Technology and Nutrition, 2009, p. 383-419.

GRANDE, S. C.; CREN, E. C.; Demand of vegetable proteins: potentialities and differential of Macauba brans (Review). **Journal of Chemical Engineering and Chemistry – JCEC**, v. 2, n. 3, p. 190-214, 2016.

GUÉGUEN, J. Legume seed protein extraction, processing and product characteristics. **Qualitas Plantarum – Plant Foods for Human Nutrition**, v. 32, p. 267-303, 1983.

HELDT, H. **Plant biochemistry**. 3 ed. San Diego: Elsevier, 2005.

HOL, W. G. J. Applying knowledge of protein structure and function. **Trends Biotechnol**, v. 5, n. 5, p. 137-143, 1987.

ILLANES, A. Enzymes Production. In:_____. **Enzymes Biocatalysis: Principles and Applications**. Springer, 1. ed., p. 57-106, 2008.

ISMAYA, W. T. The role of protein biochemistry in biotechnology. **INOVASI online**, v. 19, n. 23, p. 11-18, 2011.

JANEWAY, C.; MURPHY, K. P.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Janeway's immunobiology. New York: **Garland Science**, p. 381-402, 2008.

KENTARO, T. Protein Properties. **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 2, p. 28-33, 2018.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; OSAKO, K.; TANAKA, M. A heatstable trypsin inhibitor in adzuki bean (*Vigna angularis*): effect of extraction media, purification and biochemical characteristics. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 163-169, 2010.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; CHAIJAN, M. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* L.). **Food Chemistry**, v. 129, p. 1348-1354, 2011.

LAM, S. K.; NG, T. B. Acafusin, a dimeric antifungal protein from *Acacia confusa* seeds. **Protein & Peptide Letters**, v. 17, n. 7, p. 817-822, 2010.

LI, T.; YIN, X.; LIU, D.; MA, X.; LV, H.; SUN, S. Isolation and characterization of a novel lectin with antifungal and antiproliferative activities from *Sophora alopecuroides* seeds. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 44, n. 7, p. 606-613, 2012.

LIMA, T. C.; ALVES, J. P. A.; BRITO, M. S.; FIGUEIREDO, M. F.; SALLES, H. O.; ANDRADE, L. B. S. Caracterização de uma amilase de sementes de *Libidibia férrea*. In: 65ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 2013. **Resumo dos trabalhos**. Disponível em: <www.sbpcnet.org.br/livro/65ra/resumos/resumos/3668.html>. Acesso em: 06 de outubro de 2018.

MARTINS, T. F. **Purificação e caracterização bioquímica de um inibidor tipo Bowman – Birk de sementes de *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke**. 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, 2015.

MARTINS, T. S. **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. 2001. 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2001.

MCCARTHY, T.; HANNIFFY, O.; LALOR, E.; SAVAGE, A. V.; YUOHY, H. G. Evaluation of three thermostable fungal endo- β -glucanases from *Talaromyces emersonii* for brewing and food applications. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1742, 2005.

MILLERD, A. Biochemistry of legume seed proteins. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 26, p. 53-72, 1975.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, p. 9-23, 2009.

MOSSÉ, J.; PERNOLLET, J. C. Storage proteins of legumes seeds. In: ARORA, S. K. **Chemistry and Biochemistry of Legumes**. 1 ed. Oxford: IBH CO, 1983, p. 111-193.

NEHETE, J. Y.; RAJENDRA, S. B.; NARKHEDE, M. R.; GAWALI, S. R. Natural proteins: sources, isolation, characterization and applicattions. **Pharmacognosy Reviews**, v. 7, n. 14, p. 107-116, 2013.

NELSON, D. E.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NORTON, G. **Plant Proteins**. Butterworth & Co Ltd, 1976.

OLMEDO, I. A.; RUIZ, R.; PEINADO, M. J.; RUBIO, L. A. A pea (*Pisum sativum* L.) seed albuin extract prevents colonic DSS induced dysbiosis in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 279-294, 2017.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial; produção por fungos e aplicações. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

OSBORNE, T. B. **The vegetable proteins**. London: Longmans Green, 1924.

PACK, S. P.; YOO, Y. J. Protein thermostability: structure-based difference of residual properties between thermophilic and mesophilic proteins. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.**, v. 26, p. 257, 2003.

PALMA-FERNANDEZ, E. R.; GOMES, E.; SILVA, R. Purification and characterization of two beta-glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Folia Microbiologica**, v. 47, n. 6, p. 685, 2002.

PASSOTO, J. A. Proteínas lácteas, aplicações e funcionalidades. **Food ingredients Brasil**, n. 22, p. 80-82, 2012.

PESSOA, P. A.; HIRATA, G. M.; WATANABE, E.; MIRANDA, A. E. **Downstream processing and product recovery**. Reading: Elsevier B.V, p. 651-663, 2011.

QUEROL, E.; PEREZ-PONS, J. A.; VILLARIAS-MOZO, A. Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 9, p. 265-271, 1996.

RAJALINGAM, D.; LOFTIS, C.; XU, J. J.; KUMAR, T. K. S. Tricholoacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. **Protein Science**, v. 18, p. 980-993, 2009.

REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Produtos proteicos de soja. In: _____. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2006.

RIBEIRO, A. C. F. C. **Análise molecular de lectinas em sementes de leguminosas**. 2008. 192 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 2013.

SADEGHI, M.; NADERI-MANESH, H.; ZARRABI, M.; RANJBAR, B. Effective factors in thermostability of thermophilic proteins. **Biophysical Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 256-270, 2006.

SANTOS, A. F.; GANDRA, R. M.; OLIVEIRA, S. S. C.; KNEIPP, L. F.; AVILA-LEVY, C. M.; SODRÉ, C. L.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. Peptidases em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. In: RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à Agro&Indústria**. 1 ed. Blucher, 2017.

SAWASDIPUKSA, N.; LEI, Z.; SUMNER, L. W.; NIYOMPLOY, P.; SANGVANICH, P. A lysozyme with antifungal activity from *Pithecellobium dulce* seeds. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 4, p. 489-494, 2011.

SCANDURRA, R.; CONSALVI, V.; CHIARALUCE, R.; POLITI, L.; ENGEL, P. C. Protein thermostability in extremophiles. **Biochimie**, v. 80, n. 11, p. 933-941, 1998.

SCOPES, R. K. **Proteins and Enzymes**. New York: Springer – Verlag, p. 115-412, 2004.

SHEWRY, P. R. Seed Proteins. In: BLACK, M.; BEWLEY, J. D. **Seed technology and its biological basis**. England: Sheffield, 2000, p. 42-84.

SHIRAKI, K.; NISHIKORI, S.; FUJIWARA, S.; HASHIMOTO, H.; KAI, Y.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T. Comparative analyses of the conformational stability of a hyperthermophilic protein and its mesophilic counterpart. **The FEBS Journal**, v. 268, p. 4144, 2001.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 2, p. 125-140, 2002.

SILVA, M. C.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D.; MARCOS, F. C. A.; ABREU, C. M. P. Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 103-107, 2010.

SILVA, R. G. G. **Purificação, caracterização bioquímica e atividade biológica de um inibidor de tripsina da torta da mamona (*Ricinus communis L.*)**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1-15, 2005.

SOLANKI, D. S.; KUMAR, S.; PARIHAR, K.; TAK, A.; GEHLOT, P.; PATHAK, R.; SINGH, S. K. Characterization of a novel seed protein of *Prosopis cineraria* showing antifungal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 16-22, 2018.

SOUSA, E. M. **Caracterização ecofisiológica de sementes de espécies lenhosas da Caatinga**. 2013. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

STEPHANI, R.; SOUZA, A. B.; SILVA, P. H. F.; PERRONE, I. T. Dossiê proteínas. **Food Ingredients Brasil**, n. 22, p. 58-90, 2012.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 65, n. 1, p. 1-43, 2001.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, N.; ANDRADE, C. J. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista CINTINO**, v. 1, n. 1, p. 44-50, 2011.

WANG, W.; TAI, F.; CHEN, S. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 2032-2039, 2008.

WATANABE, E. O.; PESSOA, F. P.; MIRANDA, E. A.; MOHAMED, R. S. Evaluation of the use of volatile electrolyte system produced by ammonia and carbon dioxide in water for the salting-out of proteins: precipitation of porcine trypsin. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 30, n. 2, p. 124-129, 2006.

WINGFIELD, P. T. Protein precipitation using ammonium sulfate. **Current Protocols in Protein Science**, v. 13, n. 1, p. A3F1-A3F8, 2016.

WONG, P.; ALTHAMMER, S.; HILDEBRAND, A. An evolutionary and structural characterization of mammalian protein complex organization. **BMC Genomics**, v. 9, 2008.

YE, X. Y.; NG, T. B. Isolation of pisumin, a novel antifungal protein from legumes of the sugar snap pea *Pisum sativum*. **Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 134-235, 2003.

YE, X. Y.; NG, T. B. Mungin, a novel cyclophilin like antifungal protein from the mung bean. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, n. 3, p. 1111-1115, 2000.

YE, X. Y.; NG, T. B.; TSANG, P. W. K.; WANG, J. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 367-375, 2001.

YUKO, Y.; KEITO, N.; MEGUMI, Y.; HUI, Z.; KUNIHICO, O.; MASAYOSHI, T.; Anti-hypertensive activity of genetically modified soybean seeds accumulating novokinin. **Peptides**, v. 7, p. 29-331, 2008.

YVON, M.; CHABANET, C.; PÉLISSIER, J. P. Solubility of peptides in trichloacetic acid (TCA) solutions. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 34, n. 1, p. 166-176, 1989.