

CRISTIANE DO CARMO CESARIO

**PROPRIEDADES TÉCNICO-FUNCIONAIS DE PROTEÍNA
ISOLADA DE FARELO DESENGORDURADO DE PINHÃO-
MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

T

C421p
2012

Cesario, Cristiane do Carmo, 1984-

Propriedades técnico-funcionais de proteína isolada de farelo desengordurado de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) / Cristiane do Carmo Cesario. – Viçosa, MG, 2012.
xiii, 76f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Marco Túlio Coelho Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 70-75.

1. Pinhão-manso. 2. Proteínas - Solubilidade.
3. *Jatropha curcas* - Análise. 4. Eletroforese.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. cd. 664.07

CRISTIANE DO CARMO CESARIO

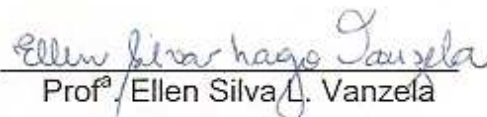
**PROPRIEDADES TÉCNICO-FUNCIONAIS DE PROTEÍNA
ISOLADA DE FARELO DESENGORDURADO DE PINHÃO-
MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 16 de julho de 2012



Prof^a. Edimar Aparecida F. Fontes



Prof^a. Ellen Silva L. Vanzela



Prof^a. Jane Sélia dos Reis Coimbra.
(co-orientadora)



Prof. Marco Túlio Coelho Silva
(orientador)

Aos meus pais

“...O remédio para a tristeza é o conhecimento. A ciência é uma fonte de alegria...”

Rubem Alves

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é foi realizado em conjunto e, portanto, agradeço:

Aos meus pais, José Raimundo e Maria Teresa, pelo incentivo e apoio.

À minha irmã, Eliézia, que mesmo distante, acreditou e contribuiu para o sucesso deste trabalho.

Ao Wagner, meu querido namorado, que está sempre comigo.

Aos amigos que fiz e que me auxiliaram em disciplinas, trabalhos acadêmicos e durante o desenvolvimento deste projeto, a Joice, Adriana, Érike, Bárbara, Cristiane, Renata, Roberta, Vanessa, Érika, Yara, Sr. Manuel, Pio, Letícia, Carla, Juarez, Osvaldo, Dimas, Nivaldo e Tomaz (Perereca).

Ao professor Marco Túlio Coelho Silva, por ter acreditado em meu trabalho e pela forma assídua de nos orientar, com sabedoria e intensa dedicação.

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra pela co-orientação, e também pelo generoso auxílio e atenção.

Ao professor Paulo Henrique Alves da Silva pela co-orientação.

Ao professor Paulo Cesar Stringheta pelas contribuições durante a aprovação deste projeto.

Às professoras Edimar Aparecida F. Fontes e Ellen Silva L. Vanzela pelas valiosas contribuições e participação como membros da banca que avaliou este trabalho.

Ao Valério pela ajuda durante o preparo das amostras pesquisadas neste estudo.

À Lizzy Alcântara, membro do Laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, localizado no campus UFV, pela paciência e dedicação, e por realizar as análises por Cromatografia de Alta Eficiência.

Aos professores Luis Antonio Minim e Frederico José Vieira Passos. pela permissão de utilização de equipamentos e utensílios.

Ao Raphael Vasconcellos, membro do Laboratório de Infectologia Molecular Animal – LIMA, localizado no campus UFV, pelo excelente trabalho de caracterização de proteínas por eletroforese.

Ao professor José Carlos Gomes pelo auxílio e orientação.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) pela realização das análises de determinação de aminoácidos.

Aos estagiários, Fernanda, Isabela e Anoar pela ajuda durante a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e seus funcionários, pelo compromisso e dedicação, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE GRÁFICOS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo geral.....	2
1.1.1 Objetivos específicos	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Pinhão-Manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	3
2.1.1 Potencial do Pinhão-Manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) como fonte proteica.	6
2.1.2 Potencial do Pinhão-Manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) como fonte de lipídeos.	7
2.1.3 Pinhão-Manso (<i>Jatropha Curcas</i> L.) como alternativa aos combustíveis fósseis.	8
2.1.4 Componentes tóxicos presentes em Pinhão-Manso (<i>Jatropha curcas</i> L.)	12
2.2 Propriedades Funcionais de proteínas	14
2.2.1 Solubilidade das proteínas.....	17
2.2.2 Capacidade absorção de água	18
2.2.3 Capacidade absorção de óleo.....	19
2.2.4 Propriedade Emulsificante	19
2.2.5 Propriedade Espumante	21
2.3 Fracionamento de Proteínas.....	21
2.3.1 Albuminas	22
2.3.2 Globulinas	23
2.3.3 Prolaminas	23
2.3.4 Glutelinas	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Delineamento Experimental	24
3.2 Obtenção e preparo das amostras.....	25
3.3 Análises químicas de caracterização.....	26

3.4 Solubilidade em função do pH	27
3.5 Obtenção do isolado proteico	27
3.5 Fracionamento de proteínas.....	28
3.6 Propriedades Funcionais.....	32
3.6.1 Capacidade de absorção de água	33
3.6.2 Capacidade de absorção de óleo.....	33
3.6.3 Propriedades Espumantes.....	34
3.6.4 Propriedade emulsificante e estabilidade da emulsão	35
3.7 Análise Estatística.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Características físico-químicas	36
4.1.1 Composição Centesimal (g/100g)	36
4.1.2 Conteúdo em Aminoácidos.....	42
4.1.3 Teores de Ésteres de Forbol.....	44
4.2 Curvas de solubilidade proteica.....	48
4.2.1 Curva de Solubilidade das proteínas do farelo desengordurado de Pinhão-Manso.....	48
4.2.2 Solubilidade das proteínas dos Isolados Proteicos de Pinhão-Manso.....	49
4.3 Fracionamento das proteínas	51
4.3.1 Frações proteicas encontradas em Pinhão-Manso.....	51
4.3.2 Caracterização das frações proteicas de Pinhão-Manso	53
4.4 Propriedades funcionais dos isolados.....	55
4.4.1 Capacidade de absorver água	55
4.4.2 Capacidade de absorver óleo.....	58
4.4.3 Atividade espumante	60
4.4.4 Atividade emulsificante.....	64
5 CONCLUSÃO.....	69
6 REFERÊNCIAS	70
ANEXO I	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição percentual (g/100g) de ácidos graxos de algumas oleaginosas.....	4
TABELA 2 – Composição centesimal de Amêndoas de Pinhão-Manso.....	4
TABELA 3 - Propriedades funcionais de proteínas em alimentos e aplicações.....	15
TABELA 4 - Concentrações dos reagentes para preparo de 6 mL do gel empilhador (5%).....	31
TABELA 5 - Concentrações dos reagentes para preparo de 10 mL do gel separador (10%).....	32
TABELA 6 - Composição Centesimal da Amêndoa de Pinhão-Manso.....	36
TABELA 7 - Composição Centesimal dos Farelos	38
TABELA 8 - Composição Centesimal dos Isolados.....	40
TABELA 9 - Conteúdo em aminoácidos de amêndoas de Pinhão-Manso, Leite de Vaca, Soja e Padrão recomendado pela FAO / WHO / ONU.....	42
TABELA 10 – Teores de Ésteres de Forbol.....	44
TABELA 11 – Frações proteicas isoladas de farelo de Pinhão-Manso.....	51
TABELA 12 - Capacidade de absorver água dos isolados proteicos de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos soja e caseína	56
TABELA 13 - Capacidade de absorver óleo dos isolados proteicos de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos soja e caseína.....	58
TABELA 14 - Atividade Espumante média dos isolados proteicos de Pinhão-Manso e dos padrões soja e caseína em diferentes condições de pH.....	61
TABELA 15 - Atividade Emulsificante média dos isolados proteicos de Pinhão-Manso e dos padrões soja e caseína em diferentes condições de pH.....	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fruto e sementes de Pinhão-Manso (<i>Jatropha curcas</i>).....	5
FIGURA 2 - Fluxograma extração de óleos vegetais.....	10
FIGURA 3 - Tigliane e Forbol.....	13
FIGURA 4 - Diferença entre o modo de adsorção de um surfactante de baixo peso molecular e o de uma proteína, nas interfaces água e óleo.....	20
FIGURA 5 - Fluxograma de descrição do delineamento experimental.....	25
FIGURA 6 - Fluxograma do fracionamento das proteínas.....	30
FIGURA 7 - Extração de óleo em aparelho Soxhlet e farelo de amêndoa de Pinhão-Manso desengordurado e peneirado.....	39
FIGURA 8 – Cromatograma do isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengorduradas com hexano.....	45
FIGURA 9 – Cromatograma da Semente de Pinhão-Manso integral.....	45
FIGURA 10 – Cromatograma do isolado proteico da torta de Pinhão- Manso desengordurada com etanol.....	46
FIGURA 11 - Cromatograma do isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengorduradas com etanol.....	46
FIGURA 12 – Padrão <i>SDS-PAGE</i> das frações obtidas do farelo desengordurado de amêndoas de Pinhão-Manso.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Matérias-primas utilizadas na produção mensal de biodiesel (B100) – 2010.....	11
GRÁFICO 2 – Perfil de Solubilidade das proteínas de farelo de Pinhão-Manso em duas extrações equivalentes e consecutivas.....	48
GRÁFICO 3 – Perfil de Solubilidade das proteínas dos isolados de Pinhão-Manso.....	50
GRÁFICO 4 – Percentual de cada fração, segundo critério de solubilidade (OSBORNE 1909) com modificações, das proteínas isoladas de Pinhão-Manso de três determinações.....	52
GRÁFICO 5 – Capacidade de Absorver água das proteínas isoladas de Pinhão Manso e dos padrões proteicos soja e caseína....	57
GRÁFICO 6 – Capacidade de Absorver óleo das proteínas isoladas de Pinhão Manso e dos padrões proteicos soja e caseína....	59
GRÁFICO 7 – Atividade espumante e estabilidade da espuma formada das proteínas isoladas de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos soja e caseína em diferentes condições de pH.....	63
GRÁFICO 8 – Atividade emulsionante e estabilidade da emulsão das proteínas isoladas de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos soja e caseína em diferentes condições de pH.....	67

RESUMO

CESARIO, Cristiane do Carmo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Propriedades técnico-funcionais de proteína isolada de farelo desengordurado de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. Orientador: Marco Túlio Coelho Silva. Coorientadores: Jane Sélia dos Reis Coimbra e Paulo Henrique Alves da Silva.

A procura de fontes alternativas para a produção de biodiesel encontra como alternativa o Pinhão-Manso, que apresenta um teor elevado de óleo com propriedades suficientes para a produção desse bicomcombustível. Estudos demonstram que o grão de Pinhão-Manso é tóxico e que seus derivados também podem causar prejuízos à saúde. O aproveitamento das tortas e farelos de Pinhão-Manso, como ocorre com a soja, geraria importante renda e contribuiria para viabilizar economicamente a cultura. O principal componente tóxico do Pinhão-Manso é o Ester de Forbol, solúvel em etanol. O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades funcionais de isolados proteicos preparados à partir de farelos obtidos pela extração do óleo de amêndoas, com hexano ou etanol, e obtidos pela extração com etanol, do óleo residual de tortas resultantes da prensagem de sementes inteiras. Observou-se um reduzido índice de solubilidade do isolado preparado à partir de farelos obtidos pela extração do óleo de amêndoas com etanol, o que contribuiu para seu baixo desempenho como ingrediente funcional. No entanto todos os isolados apresentaram boa capacidade de absorção de água e de óleo, comparáveis ou mesmo superiores às observadas para os isolados padrões de caseína e soja. A atividade espumante e emulsificante, das proteínas oriundas de amêndoas descascadas e desengorduradas com hexano, foi superior aos valores obtidos para as demais amostras. Em geral, os isolados das sementes e amêndoas de Pinhão-Manso, apresentaram desempenho consideravelmente melhor que os isolados padrões de soja e caseína, demonstrando ser possível o aproveitamento destas tortas e farelos em formulações de alimentos.

ABSTRACT

CESARIO, Cristiane do Carmo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Technical and functional properties of protein isolates from jatropha meal (*Jatropha curcas* L.)**. Adviser: Marco Túlio Coelho Silva. Co-advisers: Jane Sélia dos Reis Coimbra and Paulo Henrique Alves da Silva.

Jatropha, which has a high content of oil with good characteristics for the production of biofuel, is an alternative source of oil for the production of biodiesel. Studies have shown that the seeds of jatropha and their derivatives are toxic, and can cause damage to health. However, use of cakes and meals of Jatropha in the same way as soybeans meals are used, would generate significant income and contribute to turn Jatropha a sustainable economic culture. The most toxic component of Jatropha species are Phorbol Esteres, which are soluble in ethanol. The objective of this study was to evaluate the functional properties (solubility, water and oil holding capacity, foaming and emulsifying activity) of protein isolates prepared from jatropha meal produced by extracting the oil from dehulled seeds with hexane or ethanol and extracting with ethanol, the residual oil of whole seeds pre-pressed cake. Protein isolate prepared by extracting the oil from dehulled seeds with ethanol showed poor solubility which contributed for its low performance as a functional ingredient. However, all isolates showed good water or oil absorption, comparable or even superior to those observed with standard casein or soy isolates. Foaming and emulsifying activity of proteins derived from dehulled seeds defatted with hexane was higher than values obtained for the other samples. Overall performance indicates the possibility of use of Jatropha protein as functional ingredient for foods.

1 INTRODUÇÃO

Com o advento do Programa Brasileiro de Biodiesel e o aumento de grande demanda por óleos vegetais, o Pinhão-Manso (*Jatropha curcas* L.) vem sendo divulgado como uma alternativa de matéria-prima para produção de biodiesel, pois contém um óleo com características apropriadas para ser utilizado na fabricação deste biocombustível. Esta escolha se baseia também na expectativa de que a planta possua alta produtividade de óleo, tenha baixo custo de produção (por ser perene) e seja resistente ao estresse hídrico, o que seria uma vantagem significativa principalmente na região semi-árida do país (BELTRÃO, 2006)

As sementes de Pinhão-Manso são altamente tóxicas, sendo que a ingestão e o uso do óleo como purgativo de gado causam graves irritações e envenenamentos. Por muito tempo, pensou-se que a toxicidade da planta era causada pela ação da lectina curcina, abundante nas sementes. Entretanto, trabalhos demonstram que a toxicidade se deve principalmente à presença de ésteres de forbol, compostos amplamente distribuídos nas espécies vegetais das famílias Euphorbiaceae e Thymelaeaceae (EVANS, 1986, FERRARI et.al., 2009). A torta e farelos de Pinhão-Manso poderiam servir como alimento para animais e eventualmente para humanos, mas devido à ineficiência dos processos de detoxicação, esses produtos *in natura*, podem ser utilizados apenas como fertilizantes, por serem ricos em nitrogênio, fósforo e potássio (OPENSHAW, 2000).

Segundo Moretto & Fett (1998), embora o processo tradicional de extração de óleos vegetais seja a prensagem, devido ao elevado valor dos óleos vegetais, não existem fábricas que possam sobreviver sem dispor de instalações de extração por solvente.

Embora o hexano seja o solvente padrão para a extração de óleos, outros solventes foram avaliados como alternativas para a extração de óleos vegetais, por razões de custo, disponibilidade, toxidez e principalmente segurança (OKAMOTO, 1947;RAO & ARNOLD, 1958; ELDRIDGE, 1969; SILVA & TURATTI, 1991). O hexano é altamente explosivo, eventualmente tóxico e potencialmente cancerígeno. Além disso, é um derivado de petróleo, enquanto o etanol é um solvente biorenovável.

O principal componente tóxico presente em Pinhão-Manso, o éster de forbol, é solúvel em álcoois como o metanol e o etanol (GOEL et al., 2007) assim, a utilização do etanol, como solvente, para a extração do óleo permite obter farelo desengordurado e detoxicado.

A partir do exposto, uma maneira de ampliar o uso das proteínas da torta e farelos desengordurados de oleaginosas é por meio da transformação destes em concentrados e isolados proteicos, definidos pela legislação brasileira como produtos proteicos, com, no mínimo, (68 e 88) % de proteína (% N x 6,25) em base seca, respectivamente (BRASIL, 2000), sendo os de soja os únicos concentrado e isolado classificados pela legislação (GLORIA & REGITANO-d'ARCE, 2000). Esses produtos são utilizados como ingredientes nas formulações de diversos alimentos processados, tais como produtos de panificação, laticínios e carnes, para modificar sua qualidade funcional e diminuir custos (MONDOR et al., 2004; L'HOCINE et al., 2006; SANTOS, 2009). Assim, este trabalho buscou caracterizar, isolados proteicos obtidos de farelos desengordurados de Pinhão-Manso, quanto as suas propriedades tecno-funcionais.

1.1 Objetivo geral

Preparar isolados proteicos de Pinhão-Manso (*Jatropha curcas L.*), provenientes de farelos obtidos da torta e das sementes descascadas (amêndoas) bem como estudar as propriedades tecno-funcionais desses isolados.

1.1.1 Objetivos específicos

- Preparar a matéria-prima
- Realizar a extração do óleo residual da torta de Pinhão-Manso com etanol.
- Realizar a extração do óleo, das sementes descascadas (amêndoas) de Pinhão-Manso, com etanol.

- Realizar a extração do óleo, das sementes descascadas (amêndoas) de Pinhão-Manso, com hexano.
- Preparar isolados proteicos a partir dos farelos obtidos da extração do óleo, com hexano ou etanol, das amêndoas e torta.
- Realizar análises químicas de caracterização (teor de umidade, proteína bruta, matéria graxa, cinzas e de carboidratos) nos isolados e amêndoas de Pinhão-Manso.
- Realizar o fracionamento das proteínas presente em Pinhão-Manso.
- Realizar testes para caracterização da funcionalidade tecnológica dos isolados proteicos (solubilidade, capacidade de absorção e retenção de água, capacidade de absorção e retenção de óleo, propriedades espumantes e propriedades emulsificantes).
- Determinar a composição em aminoácidos das amêndoas e dos farelos de Pinhão-Manso.
- Determinar o teor de éster de forbol presente nos isolados e semente de Pinhão-Manso por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Pinhão-Manso (Jatropha curcas L.).*

A pesquisa de espécies de plantas que podem ser utilizadas para fornecer combustíveis alternativos (biodiesel) tem atraído muitos cientistas nos últimos anos, principalmente pelo seu papel chave no desenvolvimento sustentável. As sementes de Pinhão-Manso contêm um óleo com características apropriadas para ser utilizado na fabricação de biodiesel e com composição em ácidos graxos semelhante a dos óleos usados para alimentação humana (GUBITZ et al., 1998; FERRARI et al., 2009).

A Tabela 1 contém a composição percentual em ácidos graxos dos óleos de algumas oleaginosas.

Tabela 1- Composição percentual (g/100g) em ácidos graxos dos óleos de algumas oleaginosas.

Ácido Graxo	Oleaginosa		
	Pinhão Manso	Soja	Algodão
Mirístico	-	0,2	0,1
Palmitico	13,3	12,0	13,7
Palmitoléico	0,8	0,1	0,2
Esteárico	6,4	4,2	2,0
Oléico	41,2	17,5	33,5
Linoléico	36,5	55,2	48,0
Linolênico	0,3	7,7	0,8

Fonte: BICUDO et al., 2007

A partir do exposto verifica-se o elevado conteúdo dos ácidos graxos, oleico e linoleico, presentes em Pinhão-Manso, superiores ou até mesmo similares ao observado para os óleos de soja e algodão.

A espécie *Jatropha curcas* L., pertence à família Euphorbiaceae, é amplamente distribuída em áreas tropicais e subtropicais. A produtividade é de (1.340 a 2.000) kg . ha⁻¹, com potencial para atingir 8000 kg . ha⁻¹, dependendo do teor de óleo na planta (30 a 50) % e da tecnologia de produção adotada (MARQUES, 2007; FERRARI et al., 2009).

Cada semente é composta, em média, por 60 % de amêndoa e 40 % de casca (FLORES, 2004). A tabela 2 reúne dados de diferentes autores, referente à composição centesimal de amêndoas de Pinhão-Manso.

Tabela 2 – Composição centesimal de amêndoas de Pinhão-Manso

Componentes (% m/m)			Referência
<i>Lipídeos</i>	<i>Proteínas</i>	<i>Umidade</i>	
56,7 (±1,75)	25,6 (±2,15)	4,12 ((±0,58)	Makkar et al., 1997
56,2 (±0,83)	32,5 (±1,12)	4,6 (±0,08)	Martinez-Herrera et al., 2006
52,5 (±6,3)	26,85 (±1,8)	7,63 (±0,7)	Ferrari et al. , 2009

O Pinhão-Manso (*Jatropha curcas* L.), conhecido também como Pinhão do Paraguai, purgueira, pinha de purga e grão-de-maluco,

pertencente ao gênero *Jatropha*, que contém 160 espécies, aproximadamente, herbáceas e arbustivas, apresentam valor medicinal, ornamental e algumas são produtoras de óleo (ALVES et al., 2008). É um arbusto de crescimento considerável, possuindo altura de dois a três metros, chegando até os cinco metros de comprimento quando submetido a condições especiais de cultivo. As folhas são verdes esparsas e brilhantes, largas e alternadas (CORTESÃO, 1956; BRASIL, 1985; MAIA et al., 2011)

O Pinhão-Manso é um arbusto com flores pequenas, amarelo-esverdeadas e o fruto é uma cápsula com três sementes escuras e lisas (Figura 1) (MARTINS, et al., 2008).



Figura 1 – Fruto e sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas*)
Fonte: plantabio.com (2012)

Para Purcino e Drummond (1986) o Pinhão-Manso é uma planta que além de perene e de fácil cultivo, apresenta boa conservação da semente colhida, podendo se tornar grande produtora de matéria prima como fonte opcional de combustível.

O interesse no conhecimento agrônômico da cultura é cada vez maior, visando à seleção e o aprimoramento de variedades mais produtivas e economicamente viáveis, principalmente devido ao alto potencial na produção de óleo para fabricar o biodiesel (CARNIELLI, 2003; NUNES, 2007; ALVES et al., 2008).

Dentro desse contexto, sabe-se pouco sobre características agrônômicas deste cultivar, entretanto, a literatura traz relatos promissores

de sua capacidade produtora de óleo, em determinadas condições de cultivo. É uma cultura sem variedade ou cultivar definido, existindo apenas acessos originados de diversas partes do mundo que apresentam grande variabilidade genética, provocando a geração de indivíduos com hábito de crescimento diferenciado, produtividade desuniforme e produção de frutos com teor de óleo heterogêneo (LIMA et al., 2011). Assim, encontram-se sementes de pinhão, com peso entre 0,551 a 0,797 g, podendo apresentar, dependendo da variedade e dos tratos culturais, etc, de 33,7 a 45 % de casca e de 55 a 66 % de amêndoa. Segundo Silveira (1934), cada semente pode conter de 27,90 a 37,33 % de óleo e na amêndoa se encontra de 52,54 a 61,72% de óleo. O óleo de Pinhão-Manso está presente principalmente na amêndoa dos frutos. Cada fruto pesa aproximadamente 0,75g e a amêndoa representa cerca de 65% da massa total do mesmo(MAKKAR et al., 1998).

A distribuição geográfica do Pinhão-Manso é bastante vasta, devido principalmente a seu caráter rústico e resistência a longas estiagens, sendo mais facilmente adaptável às adversidades de solo e clima. Essa espécie ocorre espontaneamente desde o Maranhão até o Paraná, mesmo em áreas de solos arenosos e pouco férteis. A planta é consideravelmente resistente à seca e cresce rapidamente em regiões de clima quente. É encontrado em quase todas as regiões intertropicais, estendendo-se sua ocorrência à América Central, Índia, Filipinas e Timor, até mesmo às zonas temperadas, em menor proporção (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973; BRASIL, 1985; ALVES et al., 2008).

2.1.1 Potencial do Pinhão-Manso (*Jatropha curcas* L.) como fonte proteica.

Proteínas são polímeros constituídos de alguns dos 21 diferentes aminoácidos interligados por ligações peptídicas (ARAÚJO, 2011). São moléculas complexas que podem representar mais de 50% do peso seco das células (FENNEMA, 2010).

No que se refere ao Pinhão-Manso, a composição da torta e farelo, pode variar em função do modo de extração do óleo (prensa mecânica ou extração com solvente) e ainda se o grão for previamente descascado.

Estudos sobre a composição da torta de Pinhão-Manso demonstraram que o teor de proteína da torta parcialmente desengordurada, proveniente de prensagem, é de cerca de 46%, enquanto que na torta totalmente desengordurada (por solvente) varia entre 48% e (56 - 61)% (PANIGRAHI et al., 1984; ADERIBIGBE et al., 1997; GONÇALVES et al., 2009).

Também é importante destacar os estudos de Ferrari et al. (2009), em que avaliou-se a composição química e de constituintes tóxicos de sementes de Pinhão-Manso de diferentes origens tendo como resultado um valor médio de 16% de proteína entre as amostras teste e Goel et al. (2007), que analisaram os constituintes nutritivos potencialmente tóxicos de Pinhão-Manso de diferentes localizações, com características climáticas distintas e encontraram teores proteicos, nas sementes, variando de 19,0 a 31,1 %.

Considerando a abordagem anterior, a torta resultante da extração do óleo apresenta conteúdo proteico potencialmente utilizável como ingrediente de ração animal e para indústria de alimentos, no entanto, sua utilização atual limita-se a produção energética, dado sua alta toxidez. Desta forma, fazem-se necessários, trabalhos como este, que envolvam o estudo de técnicas de desintoxicação dos produtos oriundos de Pinhão-Manso, a fim de tornar a produção e utilização deste cultivar cada vez mais viável.

2.1.2 Potencial do Pinhão-Manso (*Jatropha curcas* L.) como fonte de lipídeos.

Lipídios são um grupo heterogêneo de substâncias, de origem vegetal, animal ou mesmo microbiana, cuja característica comum é ser insolúvel ou pouco solúvel em água e solúvel em solventes orgânicos, apresentando, portanto, escassa polaridade. Os Lipídeos desempenham um papel importante na qualidade dos alimentos, pois contribuem com atributos como textura, sabor, nutrição e densidade calórica (FENNEMA, 2010).

As propriedades físicas de óleos e gorduras dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos (CASTRO et al., 2004). Os óleos e gorduras diferenciam-se pela proporção de grupos acila saturados e insaturados

presentes nos triacilgliceróis (MORETTO & FETT, 1998). A resolução nº 270 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) define a temperatura de 25 °C como limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando como óleo quando o ponto de fusão encontra-se abaixo dessa temperatura (BRASIL, 2005).

Os teores de lipídeos presentes nas sementes de Pinhão-Manso são variáveis, condicionados principalmente a técnicas de cultivo.

Ferrari et al. (2009) avaliaram a composição química e de constituintes tóxicos de acessos de Pinhão-Manso de diferentes origens e determinaram ser o óleo o constituinte mais variável, em concentração, com amostras variando de 10 a 40 %. Também foi verificado por estes autores que o óleo de Pinhão-Manso é composto, em sua maioria, de ácidos graxos insaturados, sendo predominantes os monoinsaturados com 45,4 %, seguido dos poli-insaturados com 33 % e os saturados com 21,6 %.

Martinez-Herrera e colaboradores (2006) estudaram a composição química, e constituintes tóxicos / antinutricionais em acessos de Pinhão-Manso originários do México e encontraram amostras com teor de lipídeos entre 55,2 e 57,7 %, sendo os ácidos oleico e linoleico predominantes. Já Goel, et al. (2007) analisaram os constituintes nutritivos potencialmente tóxicos de Pinhão-Manso de diferentes procedências e encontraram valores para lipídeos de 43 a 59 %, sendo as amostras de diferentes origens, com características climáticas distintas.

Vale ressaltar aqui o elevado conteúdo de lipídeos encontrado em Pinhão-Manso, ou seja, seus altos índices de produtividade de óleo colocam-no entre as principais oleaginosas potencialmente utilizáveis para a produção de biocombustíveis.

2.1.3 Pinhão-Manso (*Jatropha Curcas* L.) como alternativa aos combustíveis fósseis.

O processo mais primitivo de obtenção de óleos e gorduras vegetais consiste no aquecimento e hidratação da matéria-prima que permite a coagulação de proteínas e carboidratos, levando a separação do óleo ou gordura derretidos. Outra técnica baseia-se na extração por prensagem, que

consiste em "espremer" a matéria-prima para que a separação do óleo ou gordura aconteça. A prensagem é rotineiramente utilizada para extração de materiais com altos teores de óleos ou gorduras ou com alto teor de umidade. Há ainda a extração por solvente, na qual o material a ser extraído é moído e submetido ao contato de um solvente. O óleo é dissolvido no solvente e a solução é separada do resíduo não gorduroso (farelo) por decantação. Pela repetição desse processo, pode-se extrair quase que a totalidade do óleo presente na semente ou na torta resultante da prensagem, obtendo-se com isso, farelos com teores de óleo residuais da ordem de 0,5 %. Ao final, a mistura solvente / óleo é destilada, obtendo assim o óleo bruto e recuperando o solvente que poderá ser reutilizado em novas extrações.

O farelo desengordurado resultante, contendo menos de 1% de óleo é submetido a moagem e usado na preparação de rações para animais e, eventualmente, no caso da soja, para a alimentação humana.

De acordo com Moretto e Fett (1998), a industrialização das sementes oleaginosas divide-se em duas partes importantes, a produção de óleo bruto, de torta ou farelo residuais e a refinação dos óleos brutos produzidos. A eficiência do processo depende das técnicas e recursos utilizados. De modo geral, o processamento para extração de óleos e gorduras vegetais é o mesmo para as diferentes matérias-primas (palma, colza, soja, girassol, oliva, milho, etc.). As diferenças na preparação do material a ser extraído são devidas às diferenças de forma, tamanho, textura e umidade da matéria prima.

A Figura 2 mostra o fluxograma básico da extração de óleos vegetais.

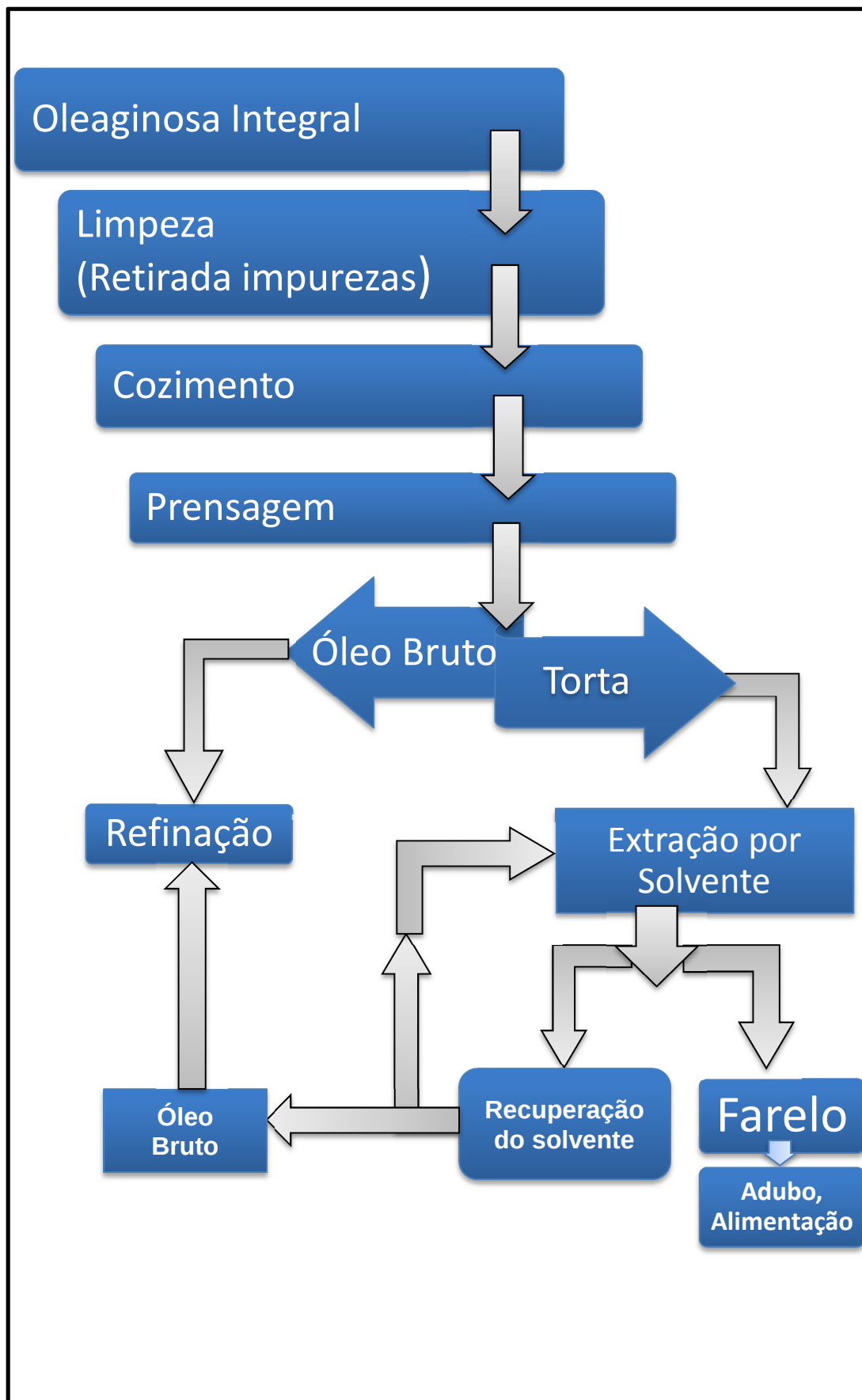


Figura 2 – Fluxograma extração de óleos vegetais

Os fatores ambientais e a elevação dos preços do petróleo favorecem a expansão do mercado de produtos combustíveis derivados da biomassa no mundo todo, predominando o etanol, para uso em automóveis, e biodiesel, para caminhões, ônibus, tratores, transportes marítimos, aquaviários e em motores estacionários para a produção de energia elétrica, nos quais o óleo diesel é o combustível mais utilizado.

Recentemente, a imprensa brasileira divulgou novos investimentos em desenvolvimento de sementes híbridas de Pinhão-Manso para a produção de biodiesel e querosene de aviação (FOLHA, 2012). Entretanto, nos últimos anos, o óleo de soja tem sido a principal matéria-prima para a produção de biodiesel (B100). Foram consumidos cerca de dois milhões m³ ao longo de 2010 (ANP, 2011). O Gráfico 1 demonstra a evolução mensal da participação de diferentes matérias-primas na produção do biodiesel em 2010.

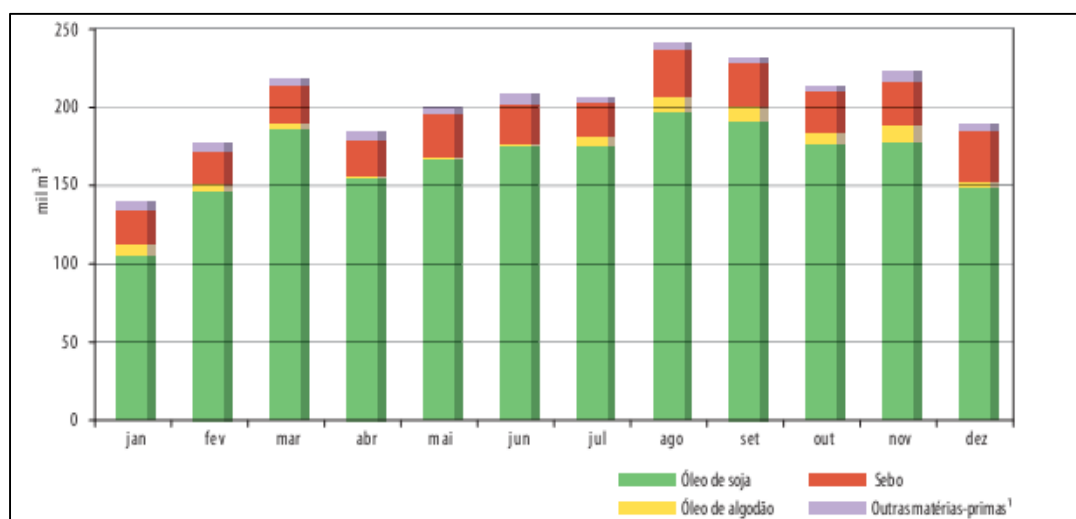


Gráfico 1 - Matérias-primas utilizadas na produção mensal de biodiesel (B100) – 2010

Fonte: ANP/SPP, conforme Resolução ANP nº 17/2004.

¹Outras matérias-primas: óleos de palma, amendoim, girassol, sésamo e nabo forrageiro, óleos e gorduras residuais.

Vale ressaltar que, enquanto a soja produz cerca de 500 kg óleo / ha, o Pinhão-Manso tem potencial para produção de 1500 kg óleo /há (MAKKAR et al., 1998). Visto assim, percebe-se a necessidade de estudos

agronômicos para o Pinhão-Manso, afim de “domestica-lo” ou seja, torna-lo cultivável por produtores diversos.

Nesse sentido, o cultivo de diferentes oleaginosas tem sido preconizado nos últimos anos, em virtude da necessidade de novas alternativas energéticas que garantam a diversificação de culturas evitando assim a sobrecarga de um ou outro cultivar.

2.1.4 Componentes tóxicos presentes em Pinhão-Manso (*Jatropha curcas* L.)

A avaliação do valor nutricional de determinados alimentos depende, principalmente, dos nutrientes presentes e da disponibilidade biológica dos mesmos. Neste sentido é importante verificar a presença de fatores antinutricionais que consiste em substâncias com capacidade de alterar as possibilidades de aproveitamento dos nutrientes contidos nos alimentos.

Os fatores antinutricionais podem ser amplamente divididos em quatro grupos: Taninos e lectinas; Fatores que agem na utilização dos minerais dos quais inclui os fitatos, oxalatos e glicosilatos; Antivitaminas; Substâncias mistas, como as micotoxinas, mimosina, cianogênicos, nitrato, alcalóides, agentes fotossensibilizantes, fitoestrogênios e saponinas. Esses fatores também podem ser classificados de acordo com sua aptidão em resistir aos processamentos térmicos de desativação. Os fatores termolábeis, são desativados na presença de calor, abrangem os inibidores de proteases, fitatos, lectinas, goitrogênios e antivitaminas. Enquanto que os fatores termoestáveis, não se alteram na presença de calor, são representados pelas saponinas, polissacarídeos não amiláceos, proteínas antigênicas, estrogênios e alguns componentes fenólicos (FRANCIS et al., 2001; FERNANDES, 2010).

Por muito tempo, se pensou que a atividade tóxica do Pinhão-Manso era causada pela ação da lectina curcina, abundante nas sementes. Entretanto, trabalhos têm demonstrado que a toxicidade se deve principalmente à presença de ésteres de forbol, compostos amplamente distribuídos nas espécies vegetais das famílias Euphorbiaceae e Thymelaeaceae (EVANS, 1986, FERRARI *et.al.*, 2009). É válido destacar

ainda que, há em grãos de Pinhão-Manso, uma proteína com potencial alergênico semelhante à albumina 2S da mamona (MARTINEZ-HERRERA et al., 2006; MACIEL et al., 2009; GONÇALVES et al., 2009).

Esteres de forbol são diterpenos tetracíclicos, comumente com atividade promotora de tumor, simulam a ação do diacilglicerol (DAG), ativador da proteína quinase C, que regula diferentes sinais de vias transdutoras além de outras atividades metabólicas celulares. A estrutura dos ésteres de forbol é dependente do esqueleto de carbono tetracíclico diterpeno conhecido como tiglane (Figura 3), que contém quatro anéis designados como A, B, C e D.

A hidroxilação dessa estrutura em diferentes posições permite inúmeras possibilidades de formação da ligação éster, resultando em uma variedade de compostos de éster de forbol. O forbol (Figura 3), o diterpeno pai dos ésteres de forbol, contém cinco grupos hidroxila com reatividade diferente em relação à acilação (GOEL et al., 2007).

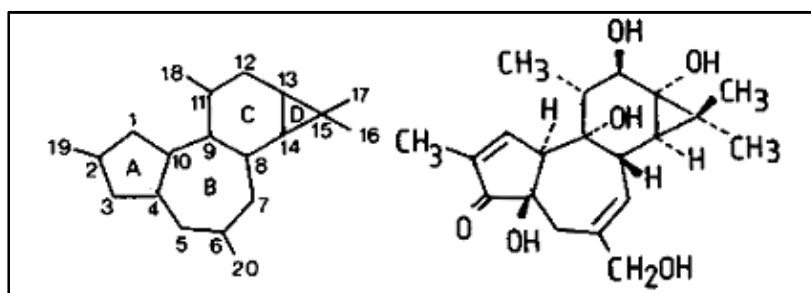


Figura 3 – Tiglane e Forbol

Fonte: adaptado de GOEL et al., 2007

A curcina, também encontrada em Pinhão-Manso, é uma proteína com ação semelhante à da ricina da mamona, exibindo, in vitro, efeito inibitório na síntese protéica (FELIX et al., 2008). Por ser uma proteína, essa toxina é termolábil.

Makkar et al. (1997) afirmam que os ésteres diterpenos são as substâncias mais tóxicas presentes nos grãos do Pinhão-Manso, pois são indutoras da formação de tumores e de resposta inflamatória. Não existem relatos da existência de genótipos não-tóxicos no Brasil, havendo registros de sua ocorrência apenas em regiões do México. Esses acessos de origem

mexicana, caracterizados como “não tóxicos” não contêm ésteres de forbol, mas contêm a curcuma em concentrações normais nos grãos.

Estudos mostram que os ésteres de forbol não podem ser destruídos apenas utilizando tratamentos térmicos (GONÇALVES et al., 2009).

Diversos estudos com seres humanos e com animais, ruminantes (bovinos e caprinos) ou não (camundongos, ratos, frangos, peixes), demonstraram toxidez dos grãos de Pinhão-Manso. Os primeiros sinais observados são diarreia, dispnéia, desidratação e perda de condição geral. Em trabalhos em que foram testadas doses agudas de 2,5g/kg/dia e crônicas 0,025g/kg/dia de torta durante 14 dias, levaram todos os animais à morte. (ADAM, 1974; AHMED e ADAM, 1979, LIBERALINO et al., 1988, EL BADAWI et al., 1992; GONÇALVES et al., 2009).

Rakshit et al. (2008), realizaram testes biológicos, com rações contendo farelo de Pinhão-Manso. Devido à presença de substâncias tóxicas como lecitina e ésteres de forbol, as refeições foram submetidas a tratamentos alcalinos e de calor para destruir o éster de forbol, bem como o conteúdo de lectina. Após o tratamento, o teor de éster de forbol foi reduzido até 89% na farinha de sementes inteira e descascadas. Em todos os ratos, independentemente do tratamento, ocorreu redução de apetite acompanhado por diarreia, atividade motora reduzida, além de atrofia em órgãos vitais.

Ferrari et al. (2009), pesquisaram a composição química e toxicidade em acessos de Pinhão-Manso de diferentes origens e assim como o teor de óleo, observou-se grande variação no teor de ésteres de forbol, sendo 1,41 mg.g⁻¹ na amostra menos tóxica e 8,97 mg.g⁻¹ considerada a mais tóxica. Já Makkar et al. (1998) encontraram 0,11 mg.g⁻¹ de éster de forbol nas variedades de Pinhão-Manso consideradas não tóxicas provenientes do México.

2.2 Propriedades Funcionais de proteínas

De acordo com Fennema (2010), o termo “funcionalidade”, se define como qualquer propriedade das proteínas, distinta, das nutritivas que condiciona sua utilidade, refere-se às propriedades físico-químicas que

influenciam no desempenho das proteínas nos sistemas alimentares durante o processamento, armazenagem, preparo e consumo. A maior parte das propriedades funcionais afetam as características sensoriais dos alimentos (especialmente a textura) e também podem ter papel importante em seu comportamento físico, ou de seus ingredientes durante o preparo. A utilização funcional de várias proteínas está listada na Tabela 3.

Tabela 3 – Propriedades funcionais de proteínas em alimentos e aplicações.

<i>Função</i>	<i>Mecanismo</i>	<i>Alimento</i>	<i>Fonte Proteica</i>
1) Solubilidade	Hidrofobicidade	Bebidas	Albuminas do Soro
2) Viscosidade	Ligação com água, tamanho e forma hidrodinâmicos	Sopas, molho para salada, sobremesas	Gelatina
3) Ligação com água	Pontes de hidrogênio, hidratação iônica	Salsicha, bife de hambúrguer, bolos, pães.	Proteínas da carne, proteína de ovo
4) Gelatinização	Retenção e imobilização de água	carnes, géis, bolos, panificação, queijos	Proteínas da carne, proteína de ovo, proteínas de leite.
5) Coesão / Adesão	Hidrofobicidade, Ligação iônica e Ligação de hidrogênio.	Carnes, salsichas, pastas, assados	Proteínas da carne, proteína do ovo, proteínas de leite.
6) Elasticidade	Ligações hidrofóbicas, ligações dissulfeto	Carnes, pães	Proteínas da carne
7) Emulsificação	Adsorção nas interfaces, formação de filme	Salsichas, almondegas, sopas, bolos, molhos	Proteínas da carne, proteína de ovo, proteínas de leite.
8) Formação de Espuma	Adsorção nas interfaces, formação de filme	Sorvetes, bolos, sobremesas,	Proteína de ovo, proteínas de leite.
9) Fixação de lipídeos e aroma	Ligações hidrofóbicas	Empanados, produtos de panificação com baixo teor de gordura	Proteínas de leite e ovo, proteínas de cereais

Fonte: adaptado de Hettiarachchy & Ziegler (1994)

As propriedades físicas e químicas que ditam a funcionalidade da proteína são: a sua forma; composição e sequência de aminoácidos; carga líquida e sua distribuição; relação hidrofobicidade / hidrofiliabilidade; estruturas primária, secundária, terciária e quaternária; flexibilidade/rigidez. Portanto, há uma variação enorme em suas propriedades química e física, sendo muito difícil prever a utilização de cada uma com respeito a uma determinada propriedade funcional (ARAÚJO, 2011).

De maneira empírica, as propriedades funcionais das proteínas podem ser classificadas em três grandes grupos: (a) propriedade de hidratação (dependente das interações proteína - água), (b) propriedades relacionadas à superfície proteica (interações proteína – proteína), (c) propriedades hidrodinâmicas - reológicas. Ao primeiro grupo pertencem propriedades como absorção e retenção de água, a humectabilidade é o inchamento, a adesão, a persabilidade, a solubilidade, e a viscosidade, e com frequência se faz referência com a propriedade hidrodinâmica térmica. As propriedades do segundo e terceiro grupos se relacionam a processos como precipitação e formação de géis, tensão superficial, emulsões, e características espumantes das proteínas. Sabe-se muito a respeito das propriedades físico-químicas de várias proteínas alimentares, entretanto, previsões das propriedades funcionais a partir de suas propriedades moleculares ainda não foram bem sucedidas. Foram estabelecidas algumas correlações empíricas, no entanto, testes em sistemas-modelo muitas vezes não se processam similarmente ao ocorrente nos sistemas alimentares reais no qual as proteínas interagem com outros componentes como lipídeos, açúcares, polissacarídeos, sais e outros componentes menores, o que modifica seu comportamento funcional (FENNEMA, 2010).

Segundo Damodaran (1996) citado por Donadel & Prudencio-Ferreira (1999), as proteínas são moléculas anfifílicas e podem migrar espontaneamente para uma interface ar - água ou óleo - água. Embora todas as proteínas sejam anfifílicas, estas diferem significativamente em suas propriedades de atividade de superfície. Estas diferenças estão relacionadas primariamente a diferenças na conformação das proteínas. Os principais fatores conformacionais que influem na atividade de superfície das proteínas são a estabilidade e flexibilidade da cadeia polipeptídica, facilidade

de adaptação às mudanças no meio e o padrão de distribuição de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície da proteína. Cada aminoácido, que se encontram incorporados à cadeia polipeptídica, possui uma cadeia lateral característica, que influencia as propriedades físico-químicas e, como resultado, as propriedades da proteína à qual pertence (ARAUJO, 2011).

Neste sentido, uma mistura de proteínas e outras moléculas, tais como açúcares e sais minerais podem ser utilizados, por exemplo, como substitutos de gordura em alimentos como requeijões, molhos para saladas, sorvetes, maionese, margarinas, etc. Isso é necessário porque nenhuma proteína ou combinação delas pode fornecer todas as propriedades funcionais desejáveis em um sistema alimentício (FENNEMA, 2010), é a combinação entre os diferentes componentes presentes que ditam a funcionalidade de um alimento.

2.2.1 Solubilidade das proteínas

Araújo (2011) afirma que a solubilidade das proteínas é determinada por três fatores principais: grau de hidratação, densidade e distribuição de cargas ao longo da cadeia e presença de substâncias não-protéicas como fosfatos, carboidratos e lipídeos, que podem apresentar efeito estabilizante. A insolubilidade completa da proteínas produz um precipitado, mas isto ocorre somente quando várias moléculas do polipeptídeo se aproximam de tal forma, que produzem agregados de proteínas suficientemente grandes para serem visíveis e centrifugados com baixa força centrífuga. Além disso, a distribuição de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície da proteína determina a solubilidade em diferentes solventes. Embora grupos hidrofóbicos tendem a estar concentrados no interior das moléculas da proteína, um número substancial está localizado na superfície e em contato com o solvente.

A solubilidade de uma proteína é a manifestação termodinâmica do equilíbrio entre a interação proteína-proteína e proteína-solvente e está relacionada a seu balanço de hidrofiliidade e hidrofobicidade. Assim, sua composição de aminoácidos afeta sua solubilidade. Porém, as características de hidrofobicidade e hidrofiliidade de superfície da proteína

são os fatores mais importantes que afetam suas características de solubilidade, pois é a superfície da proteína que entra em contato com a água que está ao seu redor (DAMODARAN, 1997; DONADEL & PRUDENCIO-FERREIRA, 1999).

2.2.2 Capacidade absorção de água

A água é um constituinte essencial dos alimentos. As propriedades reológicas e de textura dos alimentos dependem da interação da água com outros constituintes do alimento, em especial com as macromoléculas como as proteínas e os polissacarídeos. As moléculas de água ligam-se a diversos grupos nas proteínas. Esses grupos incluem grupos carregados; grupos peptídicos da cadeia principal; grupos amida da Asparagina e Glutamina; grupos hidroxilas dos resíduos de Serina, Treonina e Tirosina; e resíduos não-polares. A capacidade da proteína de se ligar a água, também chamada de capacidade de hidratação, é definida como gramas de água ligada por grama de proteína (FENNEMA, 2010).

A capacidade das proteínas de ligar-se a água é importante em alimentos viscosos, a fim de proporcionar espessamento e corpo a esses produtos (SAETAE & SUNTORNUSUK, 2011). Também são importantes para o desempenho de outras propriedades funcionais como dispersibilidade, umectabilidade, solubilidade, gelificação, emulsificação, formação de espuma, e correlatos.

Fennema (2010) afirma que vários fatores ambientais, como pH, força iônica, temperatura, tipo de sais e conformação proteica, influenciam a capacidade das proteínas de ligar-se a água. Em geral, as proteínas são menos hidratadas em seu pH isoelétrico, no qual o aumento das interações proteína-proteína resulta em uma interação mínima com a água. Em concentrações elevadas de sal, grande parte da água presente está ligada a íons salinos, resultando em desidratação da proteína. Com a elevação da temperatura, em geral, a capacidade das proteínas de ligar-se a água diminui, isso se deve a redução das pontes de hidrogênio e a diminuição da hidratação dos grupos iônicos.

Em alimentos, a capacidade de uma proteína reter água é mais importante do que a capacidade de ligar-se a água, pois a última refere-se à capacidade da proteína embeber água e retê-la contra a força gravitacional dentro de uma matriz proteica, como géis proteicos ou músculo de carne bovina. Entretanto, estudos demonstram que a capacidade de retenção de água das proteínas está correlacionada positivamente à capacidade de se ligar à água (FENNEMA, 2010).

Saetae & Suntornsuk (2011), estudaram algumas propriedades técnico-funcionais de isolados de Pinhão-Manso, incluindo a capacidade dessas proteínas de ligar-se à água, e obtiveram resultados superiores aos encontrados na literatura para albumina sérica e caseína.

2.2.3 Capacidade absorção de óleo

A absorção de gordura, de uma proteína, varia em função do número de grupos hidrofóbicos expostos (DENCH et al., 1981).

LIN (1974) e Donadel & Prudencio-Ferreira (1999) acreditam que, provavelmente, as cadeias laterais não polares das proteínas tenham afinidade com as cadeias hidrofóbicas da molécula de gordura e contribuam para a absorção de gordura.

A capacidade das proteínas de ligar-se a substâncias apolares, como óleo, é determinante no que se refere a propriedade de fixação de aroma (SAETAE & SUNTORNUSUK, 2011). As proteínas são inodoras, no entanto, podem ligar-se a compostos aromáticos e essas interações ocorrem, principalmente, por interações hidrofóbicas, assim, qualquer fator que afete as interações hidrofóbicas ou a hidrofobicidade de superfície das proteínas influenciarão na fixação do aroma (FENNEMA, 2010). Assim, a capacidade de uma proteína absorver gordura apresenta aplicabilidade diversa em formulações alimentícias.

2.2.4 Propriedade Emulsificante

Emulsão é um sistema heterogêneo que consiste em um líquido imiscível, completamente difuso em outro, na forma de gotículas com

diâmetro superior a 0,1 micron. A formação de uma emulsão, portanto, requer energia para manter as gotículas dispersas na fase contínua, sendo intrinsecamente instável; com o tempo, as gotículas da fase dispersa serão atraídas, resultando na separação das fases. As forças envolvidas na estabilidade da emulsão dependem do balanço das forças associadas com a interface do óleo e da água. Deduz-se, no entanto, que isso é termodinamicamente desfavorável e, por esse motivo, tal processo mostra estabilidade mínima, que pode ser aumentada pela adição de agentes ativos de superfície (ARAÚJO, 2011).

As proteínas são moléculas anfifílicas, migram espontaneamente para uma interface óleo-água (Figura 4). Dessa forma, as proteínas formam uma película altamente viscoelástica, a qual tem a capacidade de suportar choques mecânicos durante a estocagem e manipulação de alimentos. Assim, as emulsões estabilizadas por proteínas são mais estáveis do que aquelas preparadas com surfactantes de baixo peso molecular (FENNEMA, 2010).

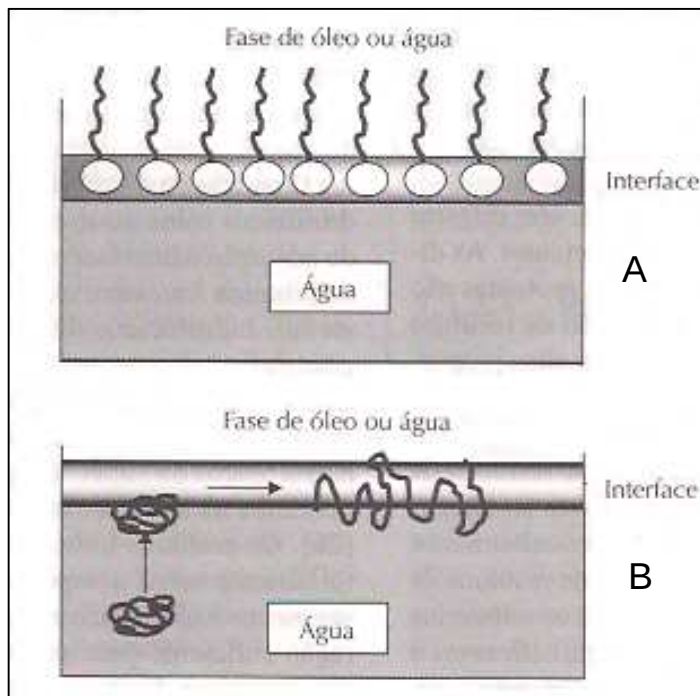


Figura 4 – Diferença entre o modo de adsorção de um surfactante de baixa massa molar (A) e o de uma proteína (B), nas interfaces água e óleo.

Fonte: FENNEMA, 2010

Estudos demonstram que a atividade emulsionante das proteínas de Pinhão-Manso cresce com o aumento da solubilidade. Lestaril et al. (2011) compararam a atividade emulsionante da torta de Pinhão-Manso com outras fontes proteicas como Isolado Proteico de Soja e Caseinato de Sódio, em diferentes valores de pH. Os resultados demonstraram um melhor desempenho das proteínas oriundas de Pinhão-Manso, além de uma relação direta entre o aumento de pH e a atividade emulsionante.

2.2.5 Propriedade Espumante

As espumas consistem de uma fase contínua aquosa e uma fase dispersa gasosa (ar). Muitos alimentos processados são produtos do tipo espuma, como cremes batidos, sorvetes, merengues, pães, musses, etc. Na maioria desses produtos, as proteínas são os principais agentes ativos de superfície que ajudam na formação e na estabilidade da fase dispersa gasosa (FENNEMA, 2010).

Os requisitos básicos para que uma proteína seja um bom agente formador de espuma baseia-se em sua habilidade de (1) rapidamente adsorver-se nas interfaces ar-água durante a bateção, (2) sofrer rápida conformação e rearranjo nas interfaces, e (3) formar um filme viscoelástico coesivo por meio da interação intermolecular (HETTIARACHCHY, 1994).

Saetae & Suntornsuk (2011), estudaram algumas propriedades técnico-funcionais de isolados de Pinhão-Manso, incluindo a atividade espumante e obtiveram uma relação direta positiva entre pH, solubilidade e atividade espumante, os autores concluíram que, em valores de pH de menor solubilidade (pH isoelétrico) o material em estudo apresentou menor atividade espumante, sendo o inverso também verdade. Confirmando a inter-relação existente entre as diversas propriedades funcionais proteicas.

2.3 Fracionamento de Proteínas

De acordo com Flores (2004), as proteínas presentes em sementes vegetais são divididas em três grandes grupos: a) proteínas estruturais, responsáveis pela estruturação celular; b) proteínas com atividade biológica,

normalmente enzimas; c) proteínas de reserva ou armazenamento, as de maiores proporções entre as sementes vegetais, sua função fisiológica é prover os esqueletos de carbono e nitrogênio utilizados durante a germinação da semente. Osborne (1909), classificou essas proteínas, de acordo com suas características de solubilidade, em albuminas, solúveis em soluções aquosas, globulinas, solúveis em soluções salinas, prolaminas, solúveis em soluções alcóolicas e glutelinas solúveis em soluções alcalinas.

Os solventes utilizados para extrair proteínas, de diferentes sementes vegetais são: água, solução salina neutra, solução alcóolica (70-80)% e soluções ácidas e alcalinas, muito diluídas (OSBORNE, 1909). A solubilidade das proteínas depende de fatores intrínsecos, como a composição e sequência de aminoácidos, tamanho e conformação das moléculas, relação hidrofobicidade / hidrofiliabilidade (GUERRERO *et.al.* 2002) e também de fatores extrínsecos, como tratamento térmico aplicado à proteína, concentração de sais, pH, concentração de proteína e interação com outros componentes presentes no meio (LOURENÇO 2000), portanto, são necessárias inúmeras considerações quando se trabalha com proteínas, independentemente de suas fontes.

2.3.1 Albuminas

As albuminas incluem moléculas que possuem propriedades funcionais, sendo muitas delas enzimas que metabolizam substâncias armazenadas nas sementes, como por exemplo, as glicosidases e as proteases. Estas últimas tem papel importante durante a germinação. Outras proteínas de papel significativo, no que se refere ao sistema de defesa da planta, são os inibidores de tripsina e as lectinas, que também compõem essa classificação. Em grande parte das sementes vegetais, as albuminas são fontes de lisina e aminoácidos sulfurados, principalmente metionina (FLORES, 2004).

As proteínas das leguminosas de maior proporção são principalmente albuminas e globulinas (VILLALVA, 2008).

2.3.2 Globulinas

A diversidade e, principalmente, a importância econômica de leguminosas e culturas de grãos têm levado ao intenso progresso no desenvolvimento de pesquisas sobre proteínas de armazenamento em sementes de diferentes gêneros (LUIZ, 2006). Dentre as proteínas vegetais mais estudadas estão as globulinas que são encontradas em maior proporção e contribuem tanto para a qualidade nutricional dos grãos como para suas propriedades funcionais.

Essas proteínas podem ser classificadas por seu coeficiente de sedimentação em dois grupos: Globulinas 7S ou vicilinas e Globulinas 11S ou leguminas. As Globulinas 7S são proteínas triméricas deficientes em aminoácidos sulfurados, com pesos moleculares de 150 a 190 kDa. As Globulinas 11S são proteínas complexas que consistem em seis subunidades, cada uma composta por dois polipeptídios, um de ponto isoelétrico ácido e outro de ponto isoelétrico alcalino, unidos por uma ligação dissulfeto, com peso molecular variando de 50 a 60 kDa, dependendo da fonte botânica. As globulinas contêm grandes quantidades de ácido glutâmico, aspártico, leucina e aminoácidos básicos (FLORES, 2004).

2.3.3 Prolaminas

Constituem a fração proteica mais abundante em cereais como trigo e milho, são conhecidas por sua solubilidade em soluções alcoólicas e também pelo elevado nível de prolina e glutamina. Em análises eletroforéticas, da forma nativa, é possível observar uma mistura complexa de polipeptídeos de aproximadamente 50 componentes (FLORES, 2004). Em trigo é chamada de gliadina, que pela ação mecânica durante a panificação, interage com a glutenina, uma glutelina também naturalmente presente em cereais, formando o glúten, enquanto a gliadina (composta pelos aminoácidos sulfurados, cistina e cisteína) é uma proteína bastante extensível mas pouco elástica, a glutenina é o polímero responsável pela elasticidade da estrutura (LACERDA, 2008).

2.3.4 Glutelinas

As glutelinas mais estudadas são as de trigo, que possuem um intervalo de peso molecular de centenas de milhares de kDa. São agregados proteicos insolúveis em álcool e estabilizadas por ligações dissulfeto, contudo, glutelinas são um grupo de prolaminas, que, quando dissociadas, as unidades se tornam solúveis em álcool (FLORES, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Delineamento Experimental*

O Fluxograma da Figura 5 descreve as etapas de desenvolvimento deste trabalho.

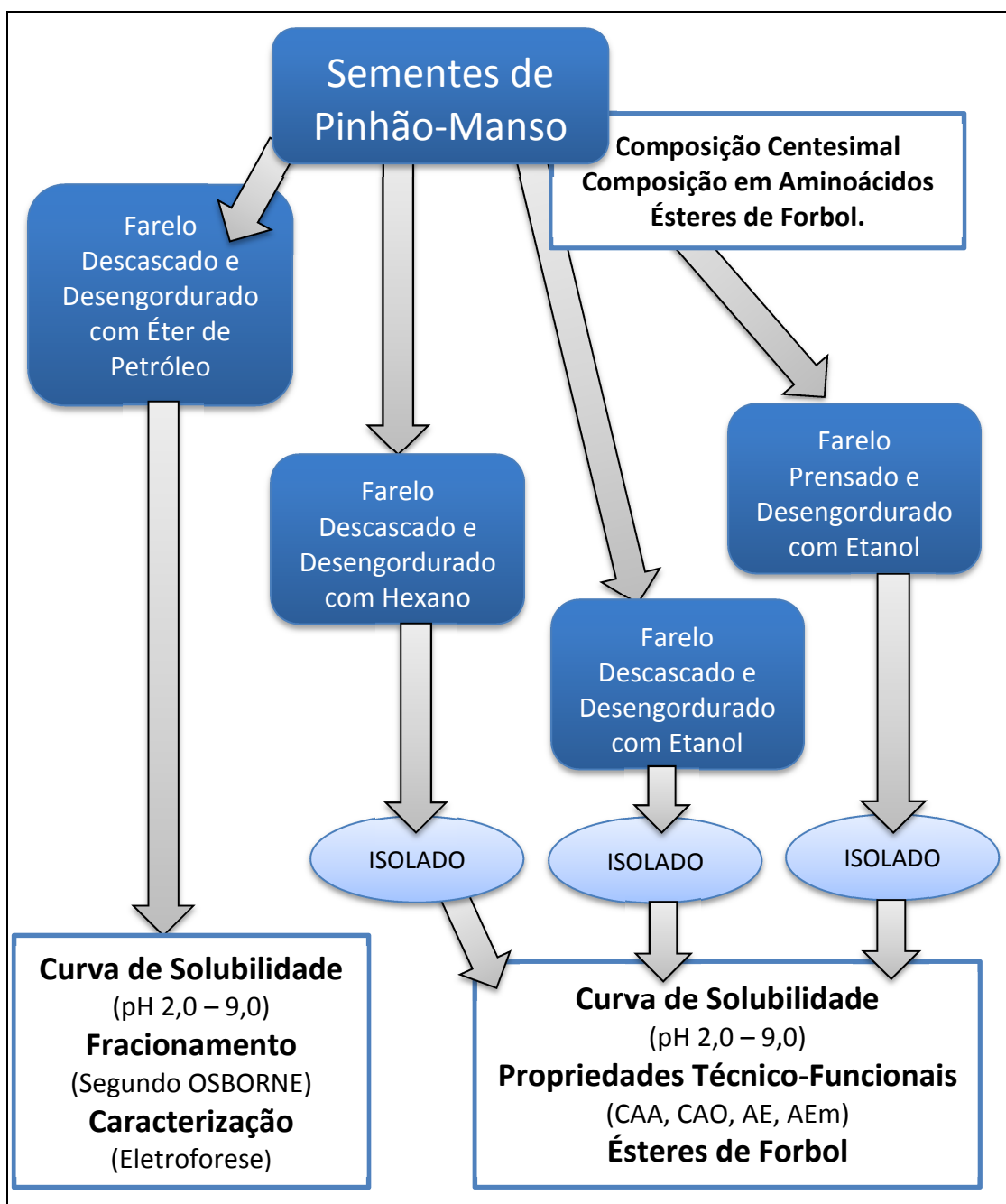


Figura 5 – Fluxograma de descrição do delineamento experimental

3.2 Obtenção e preparo das amostras

As sementes de Pinhão-Manso (*Jatropha curca L.*), utilizadas, foram provenientes de uma pequena plantação, pertencente ao Sítio Primavera, localizado próximo a Viçosa - MG.

Após retirar, manualmente, a casca das sementes, as amêndoas foram trituradas, peneiradas (MESH, ABNT 16 / 1,19 mm) e o óleo extraído

em aparelho Soxhlet, com hexano ou etanol por 9 e 27 horas, respectivamente. O tempo de extração foi determinado com base na afinidade do solvente pela fração lipídica a ser extraída.

Uma terceira amostra estudada foi obtida a partir da torta de sementes de Pinhão-Manso com casca, prensadas pelo método tradicional na empresa FUSERMANN (REFINARIA NACIONAL DE PETRÓLEO VEGETAL LTDA). O óleo residual da torta foi extraído com etanol, na planta-piloto de extração de óleos por solvente do DTA/UFV.

A graduação alcóolica do etanol utilizado durante a extração do óleo, foi de 99,9%.

Após extração do óleo, os farelos foram submetidos a secagem em estufa a 105 °C por 1 h, para garantir completa volatilização do solvente.

3.3 *Análises químicas de caracterização*

As análises realizadas na matéria-prima e nos farelos desengordurados foram: umidade, teor de proteína bruta (Kjeldahl), teor de lipídeos, teor de cinzas, todos de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2004). O teor de carboidratos calculado por diferença pela soma percentual dos componentes anteriores.

As análises de composição em aminoácidos foram feitas pelo Instituto de tecnologia de Alimentos (ITAL) Campinas. As análises de Triptofano determinadas segundo técnicas descritas por SPIES (1967). As análises de aminoácidos totais determinadas segundo técnicas descritas por HAGEN, et al. (1989) e WHITE, et al. (1986).

A determinação do éster de forbol foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência -HPLC seguindo metodologia proposta por Makkar et al. (1997), com modificações. Exatos 10,0 gramas de amostra foram extraídos com metanol (4 vezes de 10 mL). Seguidamente, os extratos transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com metanol.

Os extratos obtidos foram analisados utilizando um sistema (SHIMADZU, LC-10AD VP, Japão) conectado a um detecto de feixe de fotodiodo (SHIMADZU, UV-Visível, Japão) e integrador-processador

(SHIMADZU, SCL-10A VP, Japão) com duas bombas e injeção automática, utilizando uma coluna empacotada (apHera™ C18 Polymer, Supelco) com octadecilsilicone de 125 x 4 mm e tamanho de partícula 5 µm. Fase móvel: acetonitrila e água (80 : 20). Como padrão utilizou-se 12-Miristato 13-Acetato de forbol sintético 99 % (Sigma – Aldrich, USA)

3.4 Solubilidade em função do pH

Para esta determinação foram utilizadas amêndoas de Pinhão-Manso descascadas, trituradas e desengorduradas em aparelho Soxhlet com éter de petróleo.

O teor de proteína total foi determinado pelo método de Kjeldahl (LUTZ, 2004). A solubilidade das proteínas foi determinada como descrito pelos autores Gloria & Regitano-d'arce (2000) e Lestari et al.(2011), com modificações: Cerca de 10 g do material foram dispersos em 100 mL de água destilada. O pH da suspensão foi ajustado para valores de 2 a 10, com HCl 0,1 mol.L⁻¹ ou NaOH 0,1 mol.L⁻¹. Após um período de 10 minutos, o pH foi reajustado. A dispersão foi então mantida sob agitação por 1 hora e em seguida centrifugada a 9000 g por 30 minutos centrífuga (Beckman, J2-MC, USA).

Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para a determinação de N total pelo método do Biureto (GORNALL, BARBAWILL & DAVID, 1948) utilizando-se albumina bovina, 99 % (REAGEN - Ultrapure Chemicals do Brasil LTDA) como padrão.

O resultado expresso em PDI (índice de dispersibilidade protéica, g proteína na solução/g proteína total x 100).

A fim de certificar a ocorrência de saturação das soluções extratoras, realizou-se uma segunda determinação, em condições equivalentes, utilizando o resíduo da primeira extração.

3.5 Obtenção do isolado proteico

A extração das proteínas foi realizada com base nos autores: Gloria & Regitano-d'arce (2000), OLIVEIRA (2010), Lestari et al. (2010).

Foram preparadas suspensões de farelo desengordurado de Pinhão-Manso, peneirado (MESH ABNT 45 / 0,35 mm), em água na proporção de 1:10, adicionando-se hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ até $\text{pH } 9 \pm 1$. A dispersão foi mantida sob agitação magnética, aproximadamente 90 rpm, por 24 horas. Após a extração, a fração solúvel da mistura alcalina foi separada em centrífuga (Beckman, J2-MC, USA) a 6000 *g* por 30 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante contendo as proteínas solubilizadas foi transferido para um bequer e o pH ajustado para o ponto de menor solubilidade das proteínas presentes, ou seja, até ocorrer a precipitação, utilizando-se $\text{HCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. A suspensão resultante foi centrifugada nas mesmas condições da centrifugação anterior. O material precipitado foi considerado o isolado proteico de Pinhão-Manso umedecido. Os valores de pH a serem utilizados para a extração alcalina e precipitação no ponto isoelétrico, foram escolhidos tendo como base a curva de solubilidade do farelo desengordurado de Pinhão-Manso. A secagem das suspensões foi realizada por meio de liofilização (TERRONI, LH0400 / 4L, Brasil).

3.5 Fracionamento de proteínas

O fracionamento das proteínas dos farelos foi realizado segundo Osborne (1909), com modificações. O fluxograma da Figura 6 exemplifica as etapas do processo de fracionamento.

As suspensões foram preparadas na proporção 1:10 e centrifugadas em centrífuga (Beckman, J2-MC, USA) a 6000 *g* por 20 minutos. O teor proteico em cada extrato foi determinado por Biureto (GORNALL, BARBAWILL & DAVID, 1948). Para diálise utilizou-se tubo (SIGMA-Aldrich, D0530, USA) capacidade 300mL/m.

Durante o fracionamento, a etapa de separação das albuminas e globulinas é possível por meio de diálise porque as albuminas, além de solúveis em soluções salinas também são solúveis em água pura. Assim, os sais presentes no extrato proteico, contendo as albuminas e globulinas, compartimentado no tubo de diálise, migram do extrato para o meio externo,

fazendo precipitar as globulinas que, posteriormente, são separadas das albuminas por centrifugação.

Ao final do processo de fracionamento, obtém-se quatro frações proteicas com características de solubilidade distintas e um resíduo final denominado resíduo osborne, composto de proteínas não solubilizadas, carboidratos e lipídeos (OSBORNE, 1909)

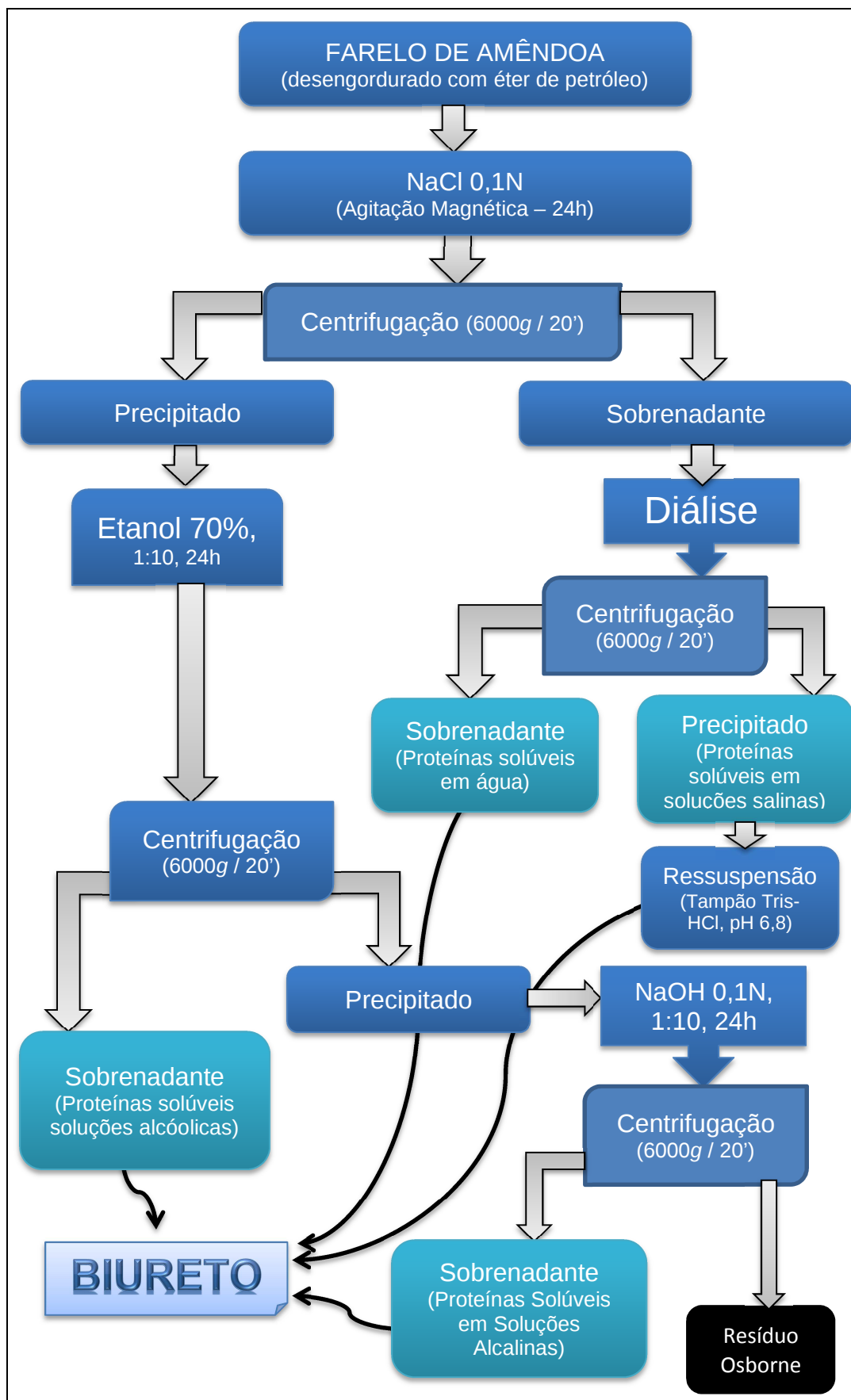


Figura 6 – Fluxograma do fracionamento das proteínas, segundo Osborne (1909), com modificações.

A separação das proteínas dos extratos foi confirmada por Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme metodologia descrita por Sambrook (1989) como segue: O condicionamento das amostras para a corrida eletroforética foi realizado por meio da adição de soluções de SDS (Dodecil sulfonato de sódio), glicerol, Coomassie Brilliant Blue e 2-mercaptoetanol. O gel separador (gel de acrilamida) foi preparado a partir das soluções 30% de acrilamida, 1% bis-acrilamida em água destilada em tampão 1,0 mol.L⁻¹ Tris-HCl pH 8,8, solução 10% SDS e solução 10% persulfato de amônio, além do catalisador TEMED, conforme Tabela 3. O gel empilhador foi preparado utilizando solução tampão 1,0 mol.L⁻¹ .Tris-HCl pH 6,8 além das soluções já citadas anteriormente, conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Concentrações dos reagentes para preparo de 6 mL do gel empilhador (5%)

Ordem	Reagente	Quantidades
1º	Água destilada	4,1 mL
2º	Solução tampão 1,0 mol.L ⁻¹ Tris-HCl pH 8,8.	760 µL
3º	Solução 10% SDS.	60 µL
4º	Solução 10% persulfato de amônio.	60 µL
5º	30% de acrilamida, 1% bis-acrilamida em água destilada.	1,0 mL
6º	TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina)	6,0 µL

Fonte: SAMBROOK (1989)

Imediatamente após obtida as misturas para preparação dos géis, estas foram transferidas para o espaço entre as placas do equipamento, sendo os géis separador e empilhador adicionados em momentos diferentes. Após a polimerização dos géis, a placa foi acoplada ao aparelho, e as cubas preenchidas com solução tampão eletroforético (0,2 mol.L⁻¹ glicina, 0,1% SDS, 0,05 M Tris, pH 8,3). Aplicou-se cerca de 12 µl, de cada amostra, nos poços formados no gel separador. Seguidamente ligou-se a fonte de

energia. Quando a corrida chegou ao final, aguardou-se 1 hora para então desligar o equipamento. A revelação foi feita com solução de nitrato de prata 0,1% em formaldeído. Como padrão utilizou-se marcador de baixo peso molecular (Thermo scientific pageruler prestained, Protein Ladder 26616 / 25000 – 170000 g.mol⁻¹, USA).

Tabela 5 – Concentrações dos reagentes para preparo de 10 mL do gel separador (10%)

Ordem	Reagente	Quantidades
1º	Água destilada	4,0 mL
2º	Solução tampão 1,0 mol.L ⁻¹ Tris-HCl pH 6,8	2,5 mL
3º	Solução 10% SDS.	100 µL
4º	Solução 1% persulfato de amônio.	100 µL
5º	40% de acrilamida, 1% bis-acrilamida em água destilada.	3,3 mL
6º	TEMED (N,N,N',N'-Tetrametilenodiamina)	4,0 µL

Fonte: SAMBROOK (1989)

3.6 Propriedades Funcionais

Para a caracterização tecnológica, os isolados proteicos foram dispersos em água destilada e avaliados quanto as seguintes propriedades funcionais: Capacidade de Absorção de Água, Capacidade de Absorção de Óleo, Propriedades Espumantes e Propriedades Emulsificantes. Como padrão de referência foi utilizado proteína isolada de soja 90%, marca SAMPROSOY-Brasil e Caseína 90 %, marca SIGMA-Brasil.

3.6.1 Capacidade de absorção de água

A capacidade de absorção de água (CAA) foi avaliada de acordo com a metodologia descrita previamente por (GLORIA & REGITANO-d'ARCE, 2000 e WANI et al., 2011), com modificações, como segue:

Uma amostra de 1,0 g do isolado proteico foi homogeneizada em 12,5 mL de água destilada a 2000 rpm em vortex (B. Braun Biotech International, Certomat MV, Alemanha) por 5 minuto. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 4000 g, (centrífuga Beckman, J2-MC, USA). O sobrenadante foi cuidadosamente retirado utilizando pipeta pasteur e o sedimento drenado por 20 minutos em um ângulo de 45°. Após drenagem, o tubo contendo o sedimento hidratado, foi pesado e a capacidade de absorção de água (CAA) calculada de acordo com a equação 1.

$$CAA (\%) = \frac{\text{massa do sedimento (g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100 \quad (1)$$

3.6.2 Capacidade de absorção de óleo

A capacidade de absorção de óleo (CAO) foi avaliada de acordo com a metodologia descrita previamente por (GLORIA & REGITANO-d'ARCE, 2000 e WANI et al., 2011), com modificações. Uma amostra de 1,0 g do material em estudo foi homogeneizada em 12,5 mL de óleo de soja refinado a 2000 rpm em vortex (B. Braun Biotech International, Certomat MV, Alemanha) por 5 minuto. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 15 minutos (4000 g, centrífuga (Beckman, J2-MC, USA). O sobrenadante foi cuidadosamente retirado utilizando pipeta pasteur e o sedimento drenado por 20 minutos em um ângulo de 45°. Após drenagem, o tubo contendo o sedimento, foi pesado e a capacidade de absorção de óleo (CAO) calculada de acordo com a equação 2.

$$CAO (\%) = \frac{\text{massa do sedimento (g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100 \quad (2)$$

3.6.3 Propriedades Espumantes.

A propriedade espumante (PE) foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Lestari et al. (2010), com modificações. Exatamente 1,0 g da amostra foi solubilizada em 100 mL de água destilada. Seguidamente o pH da solução foi ajustado para valores desejados (pH 3,0, pH 5,0, pH 7,0 e pH 9,0). A mistura então homogeneizada durante 5 minutos em bequer de 500 mL, usando-se máxima rotação em “mixer” (Black & Decker, SB40, Brasil). O volume aumentado pelo batimento foi medido em uma proveta de 500 mL. A porcentagem do aumento de volume foi calculada de acordo com a equação 3.

$$PE (\%) = \frac{V_f}{V_o} \times 100 \quad (3)$$

onde: V_o = volume antes da agitação (mL)

V_f = volume ao final da agitação (mL)

O estudo da estabilidade da espuma (PE_{30min}) foi feito por meio do repouso da amostra à temperatura ambiente (25 ± 2) °C com leitura do volume total inicialmente e após 30 minutos. A estabilidade da espuma foi calculada de acordo com a equação 4.

$$PE_{30min} (\%) = \frac{V_{f_{30min}}}{V_f} \times 100 \quad (4)$$

onde: V_f = volume ao final da agitação (mL)

$V_{f_{30min}}$ = volume após 30 minutos (mL)

3.6.4 Propriedade emulsificante e estabilidade da emulsão

A atividade emulsificante (AE) foi avaliada de acordo com a metodologia descrita previamente por Lestari et al. (2010), com modificações. Uma amostra de 0,1 g foi disperso em 100 mL de água destilada. A dispersão foi mantida sob agitação magnética, em velocidade mediana, por 3 min. Seguidamente, o pH ajustado, como desejado (pH 3,0, pH 5,0, pH 7,0 e pH 9,0), com NaOH 0,1 mol.L⁻¹ ou HCl 0,1 mol.L⁻¹. A emulsão foi preparada como se segue: Em um tubo de ensaio foi adicionados 38 g da solução proteica e 14 g de óleo de soja refinado, a mistura foi homogeneizada a 2000 rpm em vortex (B. Braun Biotech International, Certomat MV, Alemanha) por 1 minuto. Imediatamente, 1 mL dessa emulsão foi transferido, com uma pipeta, para um béquer no qual se adicionou 250 mL de solução 0,1% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e em seguida foi feita leitura da absorvância a 500 nm, em espectrofotômetro (SHIMADZU, UVmini1240, Japão).

A estabilidade da emulsão (AE (%) _{30min}) foi avaliada pela transferência de 10 mL da emulsão para uma seringa que foi deixada em repouso, na vertical, por 30 minutos. Ao final deste período, foi coletado 5 mL, da parte inferior da seringa, em tubo de ensaio e então homogeneizado em vortex a 2000 rpm, por alguns segundos. Retirou-se 1 mL dessa emulsão que foi vertido para um béquer e adicionado de 250 mL de solução 0,1% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e em seguida foi feita leitura da absorvância a 500 nm.

A atividade emulsificante e estabilidade da emulsão foram calculados por meio das equações 5 e 6, respectivamente.

$$AE \propto A_{500nm} \quad (5)$$

$$AE (\%)_{30min} \propto \frac{A_{500nm,30min}}{A_{500nm}} \times 100 \quad (6)$$

3.7 Análise Estatística

Para análise dos dados, utilizou-se os recursos da estatística descritiva, média e desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características físico-químicas

4.1.1 Composição Centesimal (g/100g)

A composição centesimal, da amêndoa integral, dos farelos e isolados proteicos de Pinhão-Manso, está apresentada nas Tabelas 6, 7 e 8 respectivamente.

Tabela 6 – Composição Centesimal da Amêndoa de Pinhão-Manso

Componente	% (m/m)
Proteínas	19,07(±0,31)
	20,33(±0,30)*
Umidade	4,66(±0,11)
	-
Lipídeos	65,80(±1,2)
	69,02(±1,0)*

*valores em base seca

Os resultados obtidos neste estudo, expressos na Tabela 6, evidenciam o elevado conteúdo de lipídeos presente nas amêndoas de Pinhão-Manso, próximo a 70,0% em base seca, reforçando assim, observações descritas na literatura (PURCINO, 1988; MAKKAR et al., 1997; OPENSHAW, 2000), de que o Pinhão-Manso é uma oleoginosas com grande potencial para produção de óleo em grande escala, sendo portanto, uma importante consideração no que se refere a sua utilização como matéria-prima para a indústria de biocombustível.

Ainda considerando a abordagem anterior, o Pinhão-Manso é uma cultura com grande variabilidade genética, sem variedade ou cultivar definido, existindo apenas acessos originados de diversas partes do mundo gerando indivíduos com hábito de crescimento diferenciado, produtividade desuniforme e produção de frutos com teor de óleo heterogêneo (LIMA et al., 2011). Assim, tendo em vista seu elevado potencial produtor de óleos, tornam-se cada vez mais necessários, estudos agronômicos que possam potencializar a utilização efetiva desta cultura.

Dentre os estudos referentes à produtividade de óleo do Pinhão-Manso, encontram-se na literatura relatos de amêndoas de Pinhão-Manso, dependendo da variedade e dos tratos culturais, com percentual de óleo superior a 60 % (SILVEIRA, 1934; MARTINEZ-HERRERA et al., 2006). Makkar et al. (1998) afirma que, o óleo de Pinhão-Manso está presente principalmente na amêndoa dos frutos representando cerca de 65 % da massa total do mesmo.

Tabela 7 – Composição Centesimal dos Farelos

Componente	% (m/m)		
	FAPDHex	FAPDEtOH	FPPDEtOH
Proteínas	52,90(±0,25)	49,10(±0,32)	25,20(±0,18)
	56,81(±0,21)*	53,07(±0,34)*	26,89(±0,19)*
Cinzas	12,82(±0,31)	10,68(±0,28)	6,05(±0,12)
	13,78(±0,33)*	11,54(±0,30)*	6,45(±0,13)*
Carboidratos	24,79(±0,24)	23,83(±0,29)	59,94(±0,42)
	26,65(±0,26)*	25,76(±0,31)*	63,96(±0,45)*
Umidade	6,98(±0,21)	7,49(±0,27)	6,29(±0,18)
	-	-	-
Lipídeos	2,51(±0,01)	8,90(±0,05)	2,52(±0,01)
	2,69(±0,01)*	9,62(±0,05)*	2,69(±0,01)*

*valores em base seca

FAPDHex: Farelo das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com hexano

FAPDEtOH: Farelo das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com etanol

FPPDEtOH: Farelo da semente de Pinhão-Manso desengordurada por prensagem e seguidamente com etanol em planta piloto.

Devido a menor eficiência de extração de óleos, do solvente etanol, em comparação com hexano, os farelos obtidos, nas mesmas condições (extração em aparelho soxhlet - Figura 7), apresentaram concentrações diferentes de óleo. Já o farelo adquirido da empresa FUSERMAN, na qual parte do óleo foi extraído por prensagem e em seguida em planta piloto com etanol, apresentou concentração proteica menor porque a matéria-prima neste caso foi semente de Pinhão-Manso com casca, que geralmente é da ordem 30 % da semente (MARTINEZ-HERRERA et al., 2006). Portanto, neste caso, a concentração dos outros componentes é consequentemente menor. Assim, a composição centesimal das tortas e farelos depende da quantidade de óleo extraído e da quantidade de casca presente.



Figura 7 – Extração de óleo em aparelho Soxhlet e farelo de Amêndoa de Pinhão-Manso desengordurado e peneirado, granulometria 0,35 mm

Considerando ainda, a influencia da técnica de extração do óleo na composição centesimal de farelos e tortas, Lestari, et al. (2010), estudaram dois diferentes subprodutos da extração do óleo de Pinhão-Manso sendo eles, torta com 12% de lipídeos, oriunda de prensagem e farelo com menos de 1,0% de lipídeos, obtido da extração com o solvente hexano, e encontraram, nestes produtos, teores proteicos de 22,9% e 27,9%, respectivamente.

Já Rakshit et al. (2008), realizaram testes biológicos utilizando rações elaboradas com farelos de semente integral e descascada de Pinhão-Manso, desengorduradas e tratadas com calor e álcalis. Os farelos foram desengordurados até teores inferiores a 1% de gordura. Para o farelo obtido da semente integral o conteúdo proteico não ultrapassou 23%, entretanto para o obtido das amêndoas descascadas o teor proteico foi superior a 60%.

Assim como observado neste estudo, os resultados de Lestari (2010) e Rakshit (2008) demonstram o quanto a etapa de descascamento é determinante para a composição centesimal dos farelos.

Tabela 8 – Composição Centesimal dos Isolados

Componente	% (m/m)		
	IAPDHex	IAPDEtOH	IPPDEtOH
Proteínas	86,4(±0,32)	85,3(±0,24)	73,5(±0,26)
	90,60(±0,33)*	89,45(±0,25)*	77,15(±0,27)*
Cinzas	4,67(±0,22)	3,85(±0,25)	5,32(±0,18)
	4,90(±0,23)*	4,04(±0,26)*	5,58(±0,19)*
Carboidratos	4,17(±0,24)	5,76(±0,33)	16,30(±0,20)
	4,37(±0,25)*	6,04(±0,35)	17,11(±0,21)
Umidade	4,64(±0,12)	4,94(±0,22)	4,74(±0,17)
	-	-	-
Lipídeos	0,12(±0,07)	0,15(±0,08)	0,14(±0,06)
	0,12(±0,07)*	0,16(±0,08)*	0,15(±0,06)*

*valores em base seca

IPAPDHex: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com hexano

IAPDEtOH: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com etanol

IPPDEtOH: Isolado proteico da semente de Pinhão-Manso desengordurada por prensagem e seguidamente com etanol em planta piloto.

De modo geral, o conteúdo em proteínas dos isolados proteicos de Pinhão-Manso foi bastante satisfatório. Também de forma generalizada percebe-se que a composição centesimal, dos farelos, influencia o rendimento dos isolados, sendo menor, quanto maior o teor de carboidratos e óleo residual.

Considerando como padrão, os isolados proteicos de soja comerciais, apenas o isolado proteico da semente de Pinhão-Manso desengordurada por prensagem e seguidamente com etanol em planta piloto (IPPDEtOH), apresentou conteúdo proteico inferior ao indicado pela legislação brasileira que estabelece um mínimo de 88%, de proteínas, em base seca, para isolado proteico de soja (BRASIL, 2000). Uma das justificativas para esse teor menor de proteínas, deve-se ao fato de que este isolado provem da

semente de Pinhão-Manso prensada. A solubilidade das proteínas deste material é provavelmente menor, devido à etapa de cozimento na preparação para a extração por prensagem que pode insolubilizar algumas proteínas (WAN, 1991). Além disso, estudos demonstram que a solubilidade das proteínas da soja é superior ao observado para Pinhão-Manso, pois nas mesmas condições, em meio alcalino quase 100 % das proteínas de soja estão solubilizadas, enquanto que para as proteínas de Pinhão-Manso esses valores não superam 80 % (GOMES, 1987; SAETAE & SUNTORNUSUK, 2011).

Quanto ao teor de cinzas, é importante destacar que as etapas sucessivas de alcalinização, com hidróxido de sódio, e acidificação, com ácido clorídrico, durante a elaboração dos isolados produz o sal correspondente à reação do NaOH com o HCl, o Cloreto de Sódio (NaCl), o que explicaria os diferentes valores obtidos para essa determinação de (3,85 – 5,32) %.

São vários os estudos encontrados na literatura, referente ao isolamento de proteínas, seja de oleaginosas ou outros alimentos.

Lestari, et al. (2010), prepararam isolados proteicos de Pinhão-Manso de forma intermitente e obtiveram concentrações de (72,6 - 97,7)%, sendo o teor proteico diretamente influenciado pela técnica de extração de óleo.

Saetae & Suntornsuk (2011) estudaram os componentes tóxicos de sementes e isolados de Pinhão-Manso e obtiveram isolados com teores proteicos em torno de 89,0%.

Gloria & Regitano-d'arce (2000), determinaram as melhores condições para a obtenção de concentrado e isolado proteico, a partir da torta desengordurada da castanha do Pará. A produção do concentrado resultou em um rendimento de 70% e a do isolado, de 35%, os mesmos apresentaram teores proteicos da ordem de 59,3% e 81,6%, respectivamente.

OLIVEIRA (2010), elaborou um isolado proteico de soja, modificado com Hexametáfosfato de Sódio, obtendo um conteúdo proteico médio de 83,4%.

4.1.2 Conteúdo em Aminoácidos

Determinou-se o percentual de aminoácido por grama de proteína em amêndoas integrais, desengorduradas com hexano e desengorduradas com etanol. Os resultados encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 – Conteúdo em aminoácidos de amêndoas de Pinhão-Manso, Leite de Vaca, Soja e Padrão recomendado pela FAO/WHO/ONU

Aminoácidos	Pinhão-Manso^a (cotilédone integral) (mg/g de proteína)	Pinhão-Manso^a (cotilédone desengordurado com hexano) (mg/g de proteína)	Pinhão-Manso^a (cotilédone desengordurado com etanol) (mg/g de proteína)	Leite de Vaca^b (mg/g de proteína)	Soja integral^c (mg/g de proteína)	Padrão FAO/WHO/ONU^d (mg/g de proteína)
Histidina	26	21	14	27	21	16
Isoleucina	27	25	15	47	38	13
Leucina	62	60	34	95	75	19
Lisina	41	39	23	78	64	16
Sulfurados (Metionina+ Cistina)	24	27	15	33	28	17
Aromáticos (Fenilalanina+ tirosina)	64	62	35	102	96	19
Treonina	35	33	20	44	36	9
Triptofano	12	9	5	14	17	5
Valina	36	32	19	64	43	13
Total	327	308	180	504	418	127

^a Resultados obtidos pelo ITAL/Campinas – SP, conforme metodologia descrita por SPIRES (1967); WHITE, HART & FRY (1986); HAGENS, FROST & AUGUSTIN (1989).

^b BRASIL, 2000

^c Adaptado de VIEIRA et al., 1999

^d Adaptado de ZARKADAS et al., 1995

Para avaliar a qualidade nutricional de uma proteína é importante conhecer a composição em aminoácidos e a biodisponibilidade dos aminoácidos presentes (FRIEDMAN, 1996 citado por OLIVEIRA, 2010).

Por meio dos resultados contidos na Tabela 9 é possível observar que, dentre os aminoácidos essenciais, as proteínas de Pinhão-Manso, apresentam conteúdo, em grande parte, similar ao relatado para proteína de origem vegetal e inferior ao descrito pela literatura para leite de vaca, cujas proteínas são de alto valor biológico, dado a presença de todos os aminoácidos essenciais e em concentrações superiores ao recomendado por órgãos especializados como a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO.

Também é possível verificar, o quanto o solvente utilizado durante a extração do óleo, alterou o conteúdo de aminoácidos das amêndoas de Pinhão-Manso, sendo as tratadas com etanol, as que mais sofreram alterações, com reduções em cerca de 55 %.

Os resultados obtidos neste estudo são similares ao observado por Flores (2004) que estudou as características bioquímicas de sementes de Pinhão-Manso de origem mexicana, em que foram relatados a presença dos aminoácidos essenciais, Leucina em maior número, seguido por Lisina, Isoleucina e Fenilalanina.

Também são compatíveis a descrição de Martinez-Herrera et al. (2006), em que esses autores estudaram a composição química, e constituintes tóxicos / antinutricionais em amostras de Pinhão-Manso originárias do México, no qual os autores compararam o teor de aminoácidos presentes nas amostras ao teor encontrado em soja, ocorrendo maior diferenciação apenas com relação ao teor de lisina que em soja apresentou-se, aproximadamente, duas vezes maior, em comparação as amostras em estudo.

De forma similar, Makkar e colaboradores (1998) realizaram uma comparação evolutiva em acessos de Pinhão-Manso de diferentes origens, em que foram avaliados a composição química, digestibilidade e degradabilidade proteica. Esses autores relataram ter encontrado o Ácido Glutâmico em maior concentração, em todas as amostras estudadas, seguido de Arginina e Ácido Aspártico. Os teores de Leucina e Isoleucina encontrados foram superiores aos recomendados pela FAO (ZARKADAS et al., 1995), para uma proteínas de alto valor biológico.

4.1.3 Teores de Ésteres de Forbol

Os teores dos Ésteres de Forbol encontrados em cada amostra estão listados na Tabela 10.

As Figuras 8, 9, 10 e 11 contêm os cromatogramas das análises das sementes integral e dos isolados proteicos de Pinhão-Manso. Todas as amostras eluídas em metanol e analisadas por coluna de fase estacionária octadecilsilicone, detector de feixe de fotodiodo e fase móvel acetonitrila e água (80 : 20).

O ANEXO I contém o cromatograma usados para o calculo da curva analítica para o Éster de Forbol

Tabela 10 – Teores de Ésteres de Forbol

<i>Amostras</i>	<i>Ésteres de Forbol (mg.g⁻¹)</i>
SPI	0,91
IPAPDHex	1,76
IPADEtOH	0,04
IPPDEtOH	0,06

SPI: Semente de Pinhã-Manso integral

IPAPDHex: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com hexano

IPADEtOH: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com etanol

IPPDEtOH:: Isolado proteico da semente de Pinhão-Manso desengordurada por prensagem e seguidamente com etanol em planta piloto.

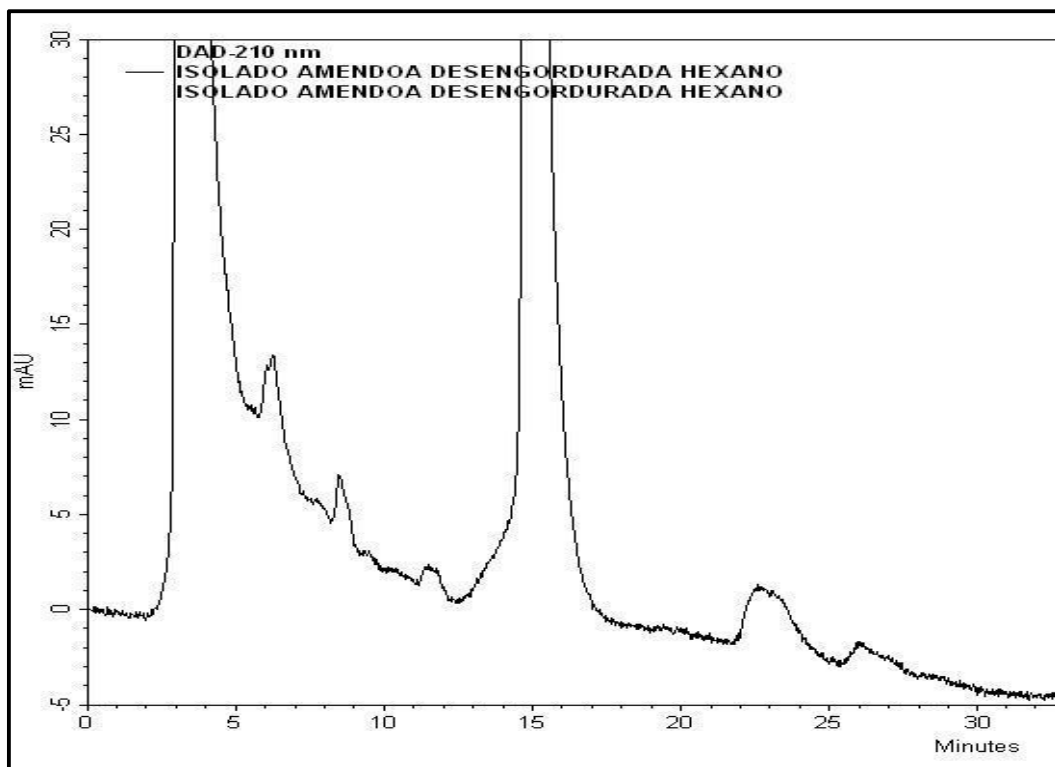


Figura 8 - Cromatograma do isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Mansão desengorduradas com hexano.

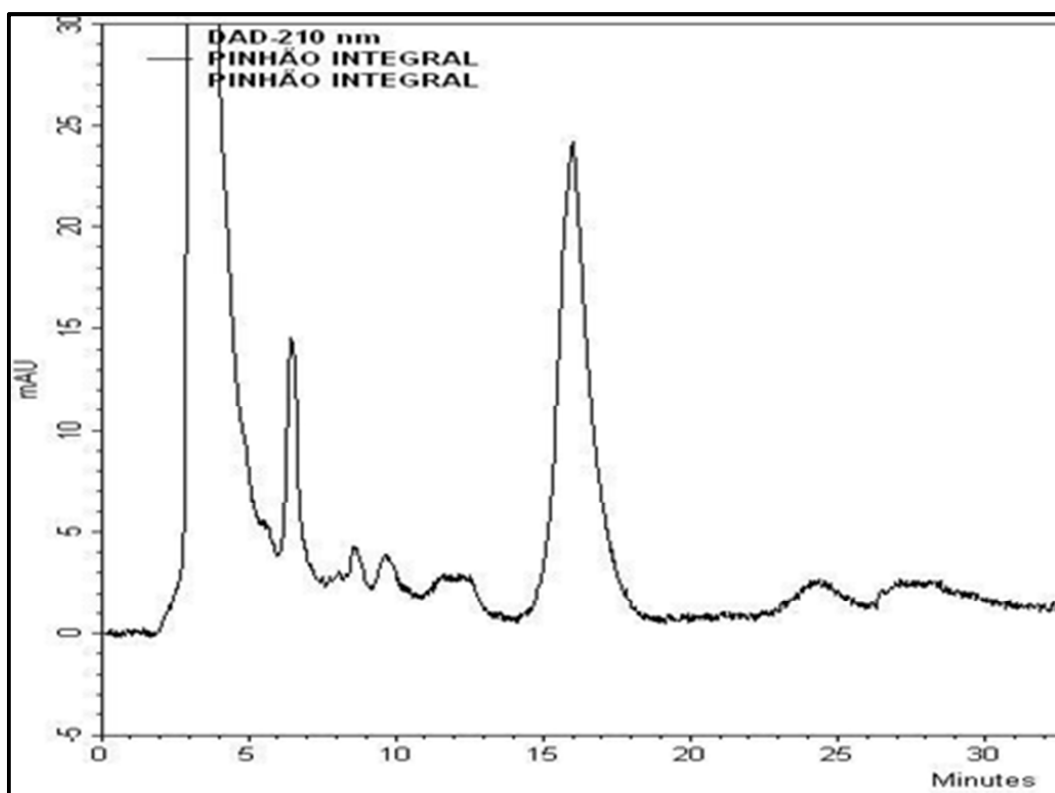


Figura 9 - Cromatograma da Semente de Pinhão-Mansão integral

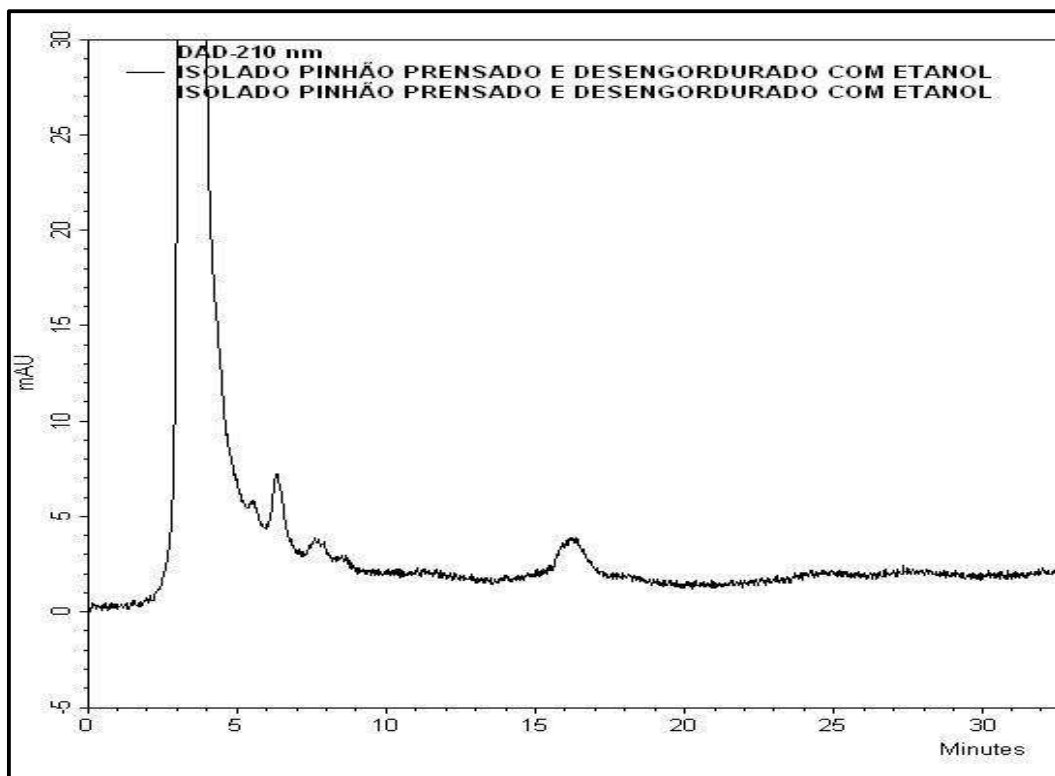


Figura 10 - Cromatograma do isolado proteico da torta de Pinhão-Manso desengordurada com etanol.

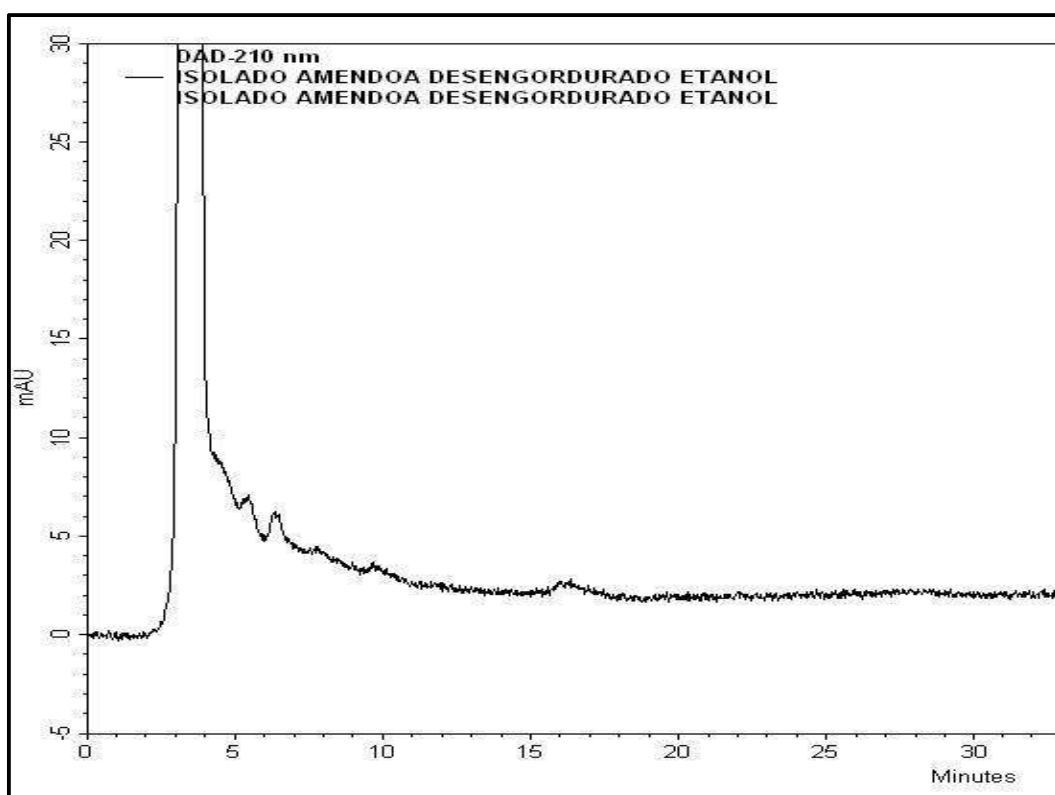


Figura 11 - Cromatograma do isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengorduradas com etanol

As sementes de Pinhão-Manso, se ingeridas sem nenhum tratamento de detoxicação, podem causar graves irritações e envenenamentos devido, principalmente, à presença de diterpenos tetracíclicos, mais comumente conhecidos por ésteres de forbol.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a elevada eficiência da detoxicação das sementes e produtos de Pinhão-Manso pelo etanol. A concentração dos ésteres de forbol nos isolados preparados à partir da amêndoa ($0,04 \text{ mg.g}^{-1}$) ou da torta ($0,06 \text{ mg.g}^{-1}$) desengordurados com etanol é muito menor que a concentração no isolado preparado à partir das amêndoas desengorduradas com hexano ($1,76 \text{ mg.g}^{-1}$) que também é maior que a concentração na semente integral ($0,91 \text{ mg.g}^{-1}$).

Este último resultado pode ser explicado pelo fato de que as amêndoas correspondem cerca de 70 % da semente integral, que por sua vez, apresenta aproximadamente 50 % de óleo (MARTINEZ-HERRERA et al., 2006). Portanto, a concentração dos ésteres de forbol, encontrado no isolado oriundo de amêndoas desengorduradas com hexano é maior que a concentração observada na semente integral.

Os teores para os ésteres de forbol, identificados neste estudo são similares ao observado por Saetae & Suntornsuk (2011) que em um estudo de compostos tóxicos em sementes de Pinhão-Manso, verificaram a presença de esteres de forbol da ordem de $0,73 \text{ mg.g}^{-1}$ de amostra.

Também Makkar et al. (1997), avaliaram quatro diferentes variedades de sementes de Pinhão-Manso, entre tóxicas e não tóxicas, de diferentes regiões do mundo, e encontraram teores de ésteres de forbol de até $2,7 \text{ mg.g}^{-1}$, para a variedade de maior toxidez, e para a variedade não toxica o teor deste componente não superou $0,11 \text{ mg.g}^{-1}$.

A partir do exposto, se considerarmos como padrão de referência, $0,11 \text{ mg.g}^{-1}$ de ésteres de forbol para cada grama de produto oriundo de Pinhão-Manso, fica claro que, é possível a desintoxicação pela utilização de etanol durante a extração do óleo, pois por meio desta técnica foi possível obter produtos com teores infinitamente menores de ésteres de forbol.

Ainda em relação a técnicas de desintoxicação de produtos oriundos de Pinhão-Manso, estudos demonstram que o tratamento das sementes com compostos alcalinos, como hidróxido de sódio, permite destruir os ésteres de

forbol (HAAS & MITTELBAACH, 2000; RAKSHIT et al., 2008; ABDALLA et al. 2008). Entretanto, apesar de eficiente, em grande parte das vezes o tratamento com compostos alcalinos reduz a palatabilidade dos produtos oriundos dessa técnica (RAKSHIT et al., 2008). Assim, a desintoxicação dos produtos de Pinhão-Manso, pelo uso de etanol, apresenta-se como uma alternativa bastante promissora.

4.2 Curvas de solubilidade proteica

4.2.1 Curva de Solubilidade das proteínas do farelo desengordurado de Pinhão-Manso

A curva de solubilidade, em relação ao pH, das proteínas, do farelo de Pinhão-Manso desengordurado, está representado no Gráfico 2

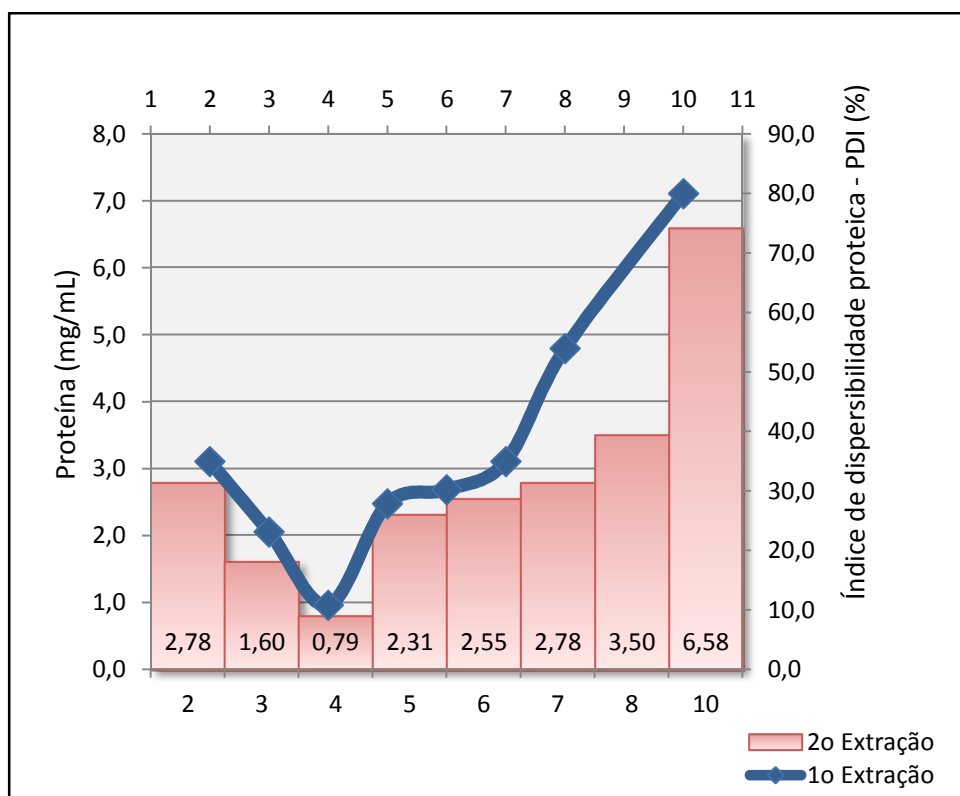


Gráfico 2 – Perfil de Solubilidade das proteínas de farelo de Pinhão-Manso em duas extrações equivalentes e consecutivas.

A mínima solubilidade foi obtida entre os pH's 3 e 5, portanto, é possível afirmar que nesta região encontra-se o ponto isoelétrico das proteínas. A mais alta solubilidade foi conseguida em meio alcalino (pH 10). Os compostos nitrogenados da torta desengordurada apresentaram 80,0% de solubilidade neste pH.

Em um meio onde o pH é menor que o ponto isoelétrico das proteínas presentes, os grupos amino ficam carregados positivamente, devido aos pKa's destes grupos serem maiores que o pH do meio, assim ocorre repulsão entre as cadeias polipeptídicas fazendo com que mantenham-se dispersas. A partir do ponto isoelétrico a solubilidade aumenta sensivelmente, dado ao surgimento de grupos carregados negativamente, nesta fase o pKa's destes grupos são inferiores ao pH do meio, nestas condições a interação das cadeias polipeptídicas com a água é bastante significativa o que acarreta em um elevado índice de solubilidade.

Ainda no Gráfico 2, são expressos em forma de barras verticais, os teores de proteína solúvel identificadas em uma segunda determinação, em condições equivalentes a primeira extração. O objetivo desta segunda etapa foi certificar a ocorrência de saturação proteica durante o experimento. Assim, por meio do Gráfico 2 é possível observar que mesmo no ponto de menor solubilidade proteica, ainda havia proteína a ser solubilizada.

4.2.2 Solubilidade das proteínas dos Isolados Proteicos de Pinhão-Manso

As curvas de solubilidade, em relação ao pH, dos isolados de Pinhão-Manso, estão representados no Gráfico 3

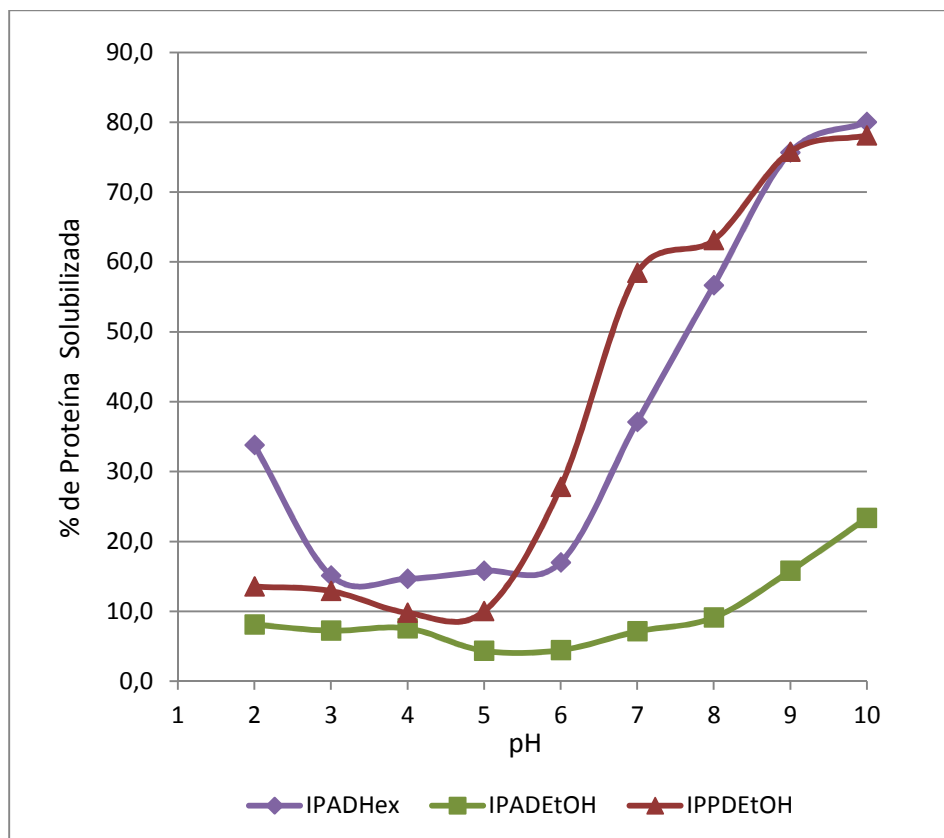


Gráfico 3 – Perfil de Solubilidade das proteínas dos isolados de Pinhão-Manso

IPADHex: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com hexano

IPADetOH: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com etanol

IPPDEtOH: Isolado proteico de Pinhão-Manso prensado e desengordurada com etanol em planta piloto.

É de fundamental importância que as proteínas isoladas apresentem elevada solubilidade, pois, essa característica é determinante para sua aplicabilidade como ingrediente funcional para a indústria de alimentos.

Observou-se que, a solubilidade dos isolados obtidos, está intimamente ligada a condição de obtenção da torta desengordurada, das quais esses produtos se originam. Observa-se no Gráfico 3, elevados teores de solubilidade, em condições alcalinas, exceto para o isolado obtido da amêndoa desengordurada com etanol, em que o percentual de proteína solubilizada não atingiu 30 %.

A esse respeito, Saetae & Suntornsuk (2011) afirmam que as diferentes características observadas entre amostras obtidas do tratamento convencional e aquelas tratadas com etanol deve-se ao fato de o etanol ser capaz de levar a rompimentos na estrutura interna das proteínas, alterando sua conformação, conseqüentemente sua polaridade e hidrofobicidade.

4.3 *Fracionamento das proteínas*

4.3.1 Frações proteicas encontradas em Pinhão-Mansô

A média dos percentuais de cada fração das proteínas de Pinhão-Mansô (em relação às proteínas totais) obtidas segundo método Osborne (1909), baseado nas diferentes características de solubilidade, encontra-se na Tabela 11. O Gráfico 4 traz uma representação gráfica dos valores, em percentual.

Tabela 11 – Frações proteicas isoladas de farelo de Pinhão-Mansô

Frações	% (m/m)*
Albuminas	12,76 (±0,27)
Globulinas	20,28 (±2,56)
Prolaminas	5,00 (±0,51)
Glutelinas	48,38 (±2,89)
Resíduo Osborne	13,60 (±0,56)

*Percentual de cada fração, segundo critério de solubilidade (OSBORNE, 1909) com modificações, das proteínas isoladas de Pinhão-Mansô

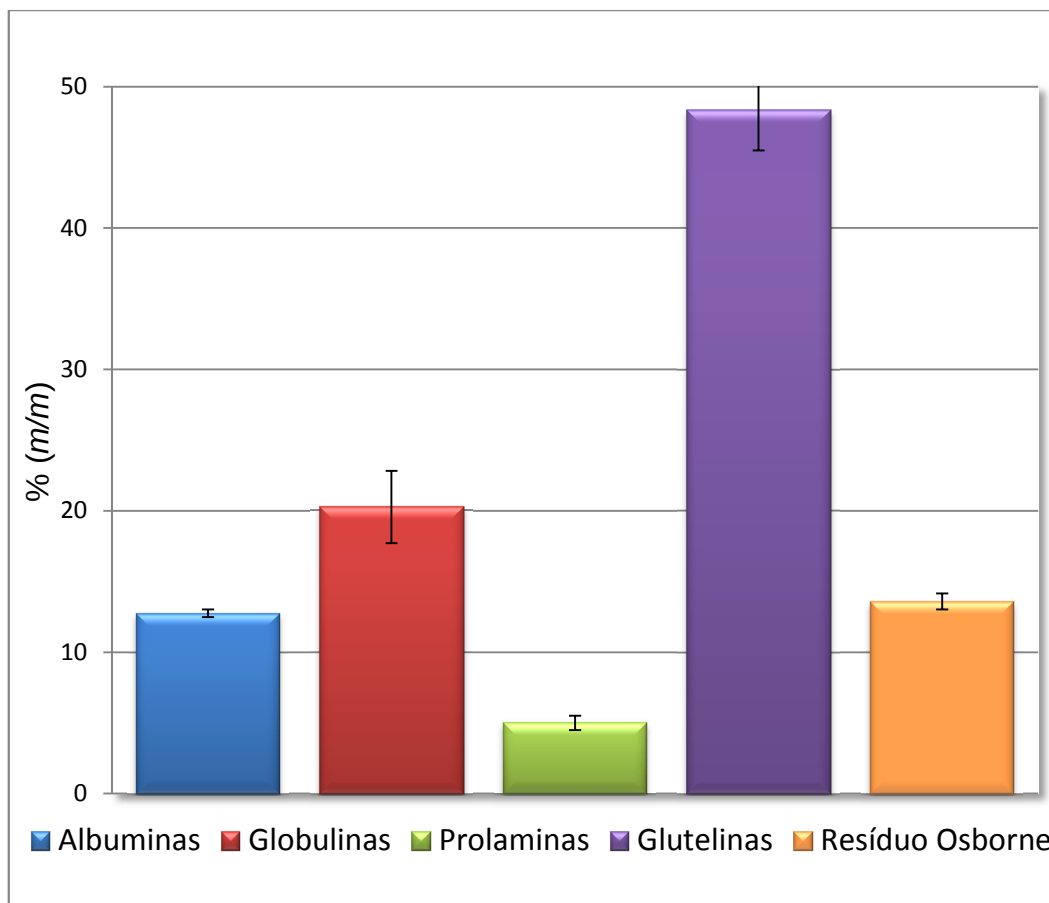


Gráfico 4 – Percentual de cada fração, segundo critério de solubilidade (OSBORNE, 1909) com modificações, das proteínas isoladas de Pinhão-Manso

O resultado expresso no Gráfico 4 é similar ao obtido por FLORES (2004) que desenvolveu um trabalho de pesquisa de caracterização bioquímica das proteínas de Pinhão-Manso de acessos de origem mexicana. Neste estudo, a autora fracionou o conteúdo proteico das amostras e encontrou cerca de 15 % de albuminas, 20,0% de globulinas, 6,4 % de prolaminas e 37,8 % de glutelinas. Sendo a fração solúvel em soluções alcoólicas extraída com álcool isopropílico, em teor não inferior a 70%.

Vale aqui citar Osborne (1909) que, no que se refere ao fracionamento de proteínas, afirma que o teor alcoólico, do solvente, é determinante para o sucesso da extração. O excesso de álcool em solução pode precipitar proteínas quando a concentração atingir certo nível, além disso, em nenhum caso, proteínas são solúveis apenas em álcool sem a presença de água.

Em geral, o limite de concentração alcoólica, para solubilização de proteínas vegetais, está na faixa de 50,0 a 90,0 %, em exceção para as proteínas oriundas de arroz que apresentam maior solubilidade em concentrações alcoólicas superiores a 90,0%. Outros álcoois, além do etílico, também são capazes de solubilizar proteínas. Os álcoois metil, propil e amílico, solubilizam essas proteínas, também formando precipitados quando em excesso, sendo menor essa formação quanto maior for o peso molecular do álcool. Tal condição pode explicar, o maior percentual da fração prolamina, obtida por Flores (2004), em comparação aos resultados obtidos neste trabalho.

Similar ao observado neste estudo, Usman et al.(2008), estudando os efeitos da hidrólise alcalina na quantidade extraída das frações proteicas, em torta de Pinhão-Manso, encontraram, em maior quantidade, a fração representada pelas glutelinas, seguido pelas globulinas, albuminas e finalmente prolaminas. Sendo a concentração das prolaminas (0,11g / kg) cerca de 100 vezes inferior ao determinado para as glutelinas (10,91g / kg).

4.3.2 Caracterização das frações proteicas de Pinhão-Manso

A Figura 12 contém o padrão *SDS-PAGE* das frações obtidas do farelo desengordurado de amêndoas de Pinhão-Manso.

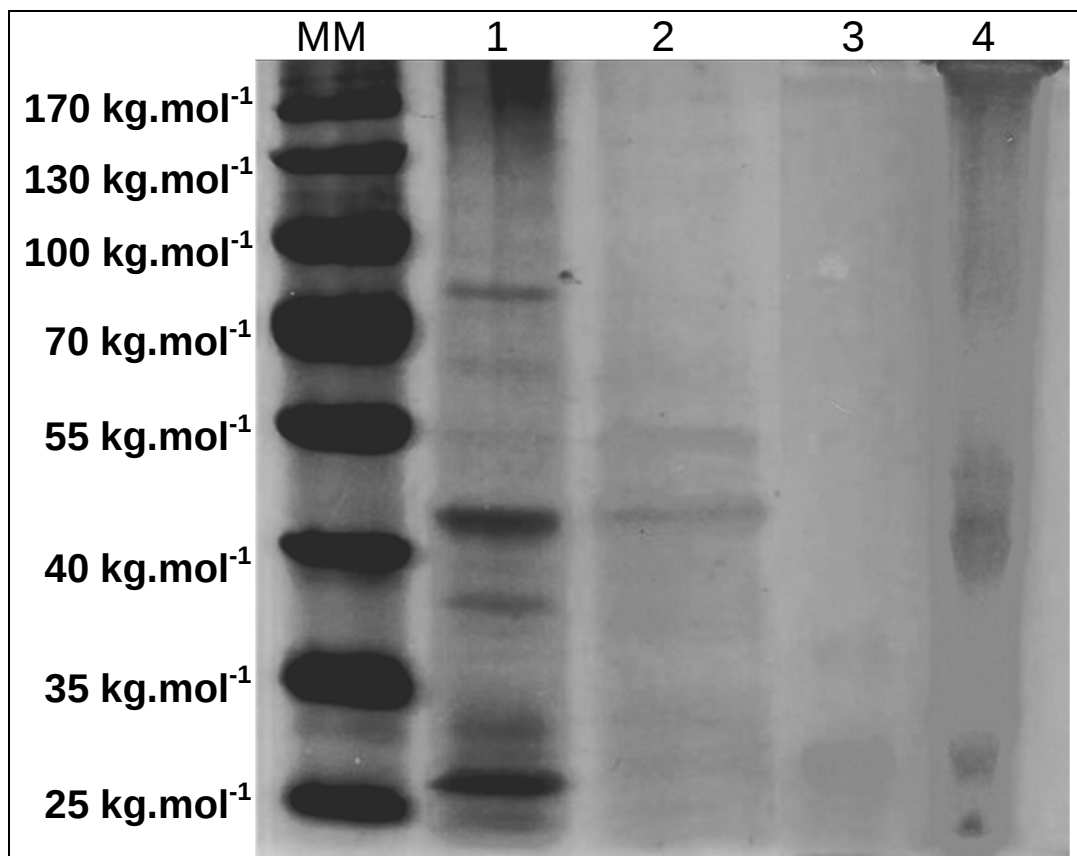


Figura 12 – Padrão *SDS-PAGE* das frações obtidas do farelo desengordurado de amêndoas de Pinhão-Manso. Albuminas (Linha 1), Globulinas (Linha 2), Prolaminas (Linha 3), Glutelinas (Linha 4)

As albuminas representam cerca de 13,0 % das proteínas presentes nas amêndoas de Pinhão-Manso. Por meio da determinação *SDS-PAGE* observou-se cadeias polipeptídicas em um amplo intervalo de peso molecular ($100 - <25 \text{ kg.mol}^{-1}$). As albuminas constituem principalmente, as proteínas metabólicas das sementes, varias delas possuem funções fisiológicas, tais como atividade enzimática, inibidores de proteases , estão relacionadas com o mecanismo de defesa da planta, ao ataque de pragas (FLORES, 2004).

Percebe-se na Figura 12, especialmente na coluna 1 uma banda, bastante expressiva, de peso molecular em torno de 28 kg.mol^{-1} . Estudos demonstram que as sementes de Pinhão-Manso contém curcina, uma proteína presente na fração das albuminas de peso molecular correspondente ao observado (LIN et al., 2003; FLORES, 2004).

Nas sementes de Pinhão-Manso, em média, as globulinas representam 20,0% das proteínas presentes (Tabela 10). Por meio da Figura 12 é possível observar bandas com peso molecular entre 70 - >25 kg.mol⁻¹. As globulinas são classificadas por seu coeficiente de sedimentação em dois grupos 7S e 11S, sendo este grupos compostos por subunidades de 50 – 70 kg.mol⁻¹ (FLORES, 2004).

As prolaminas são comuns a todos os cereais e são ricas em prolina e glutamina. No milho, as prolaminas são denominadas zeínas (BICUDO et al., 2006). Em Pinhão-Manso, essa fração não é muito expressiva. Em seu padrão eletroforético observam-se três bandas principais, com peso molecular em torno de 30 kg.mol⁻¹ (FLORES, 2004).

As glutelinas constituem a principal fração proteica observada nas amêndoas de Pinhão-Manso, 50,0% em média (Tabela 10). Por meio da Figura 12 é possível observar bandas com peso molecular entre 70 - <25 kg.mol⁻¹. Essas proteínas são polímeros de alto peso molecular, estabilizados por ligações dissulfeto. Em seu padrão eletroforético (Figura 12.) observa-se um borrão de arraste, provavelmente, devido ao grande número de componentes que compõe esta fração (FLORES, 2004).

4.4 Propriedades funcionais dos isolados

Para a caracterização tecnológica, os isolados proteicos foram avaliados quanto as seguintes propriedades funcionais: Capacidade de absorver água, capacidade de absorver óleo, atividade espumante e atividade emulsionante.

4.4.1 Capacidade de absorver água

A média dos valores para a capacidade de absorver água dos isolados proteicos de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos soja e caseína encontra-se na Tabela 12. O Gráfico 5 traz uma representação gráfica desses dados, em percentual.

Tabela 12 - Capacidade de absorver água dos isolados proteicos de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos soja e caseína

<i>Amostras</i>	<i>CAA (%)</i>
IPS	499,88 ($\pm 7,40$)
IPADEtOH	393,25 ($\pm 11,05$)
IPPDEtOH	361,09 ($\pm 41,09$)
IPAPDHex	316,65 ($\pm 3,35$)
IPCA	286,39 ($\pm 4,21$)

IPAPDHex: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com hexano

IPADEtOH: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com etanol

IPPDEtOH:: Isolado proteico da semente de Pinhão-Manso desengordurada por prensagem e seguidamente com etanol em planta piloto.

IPS: Isolado Proteico de Soja

IPCA: Isolado Proteico de Caseína

Todos os isolados, em teste, apresentaram boa capacidade de absorver água, valores esses superiores ao obtido para caseína e similares, ao observado para soja.

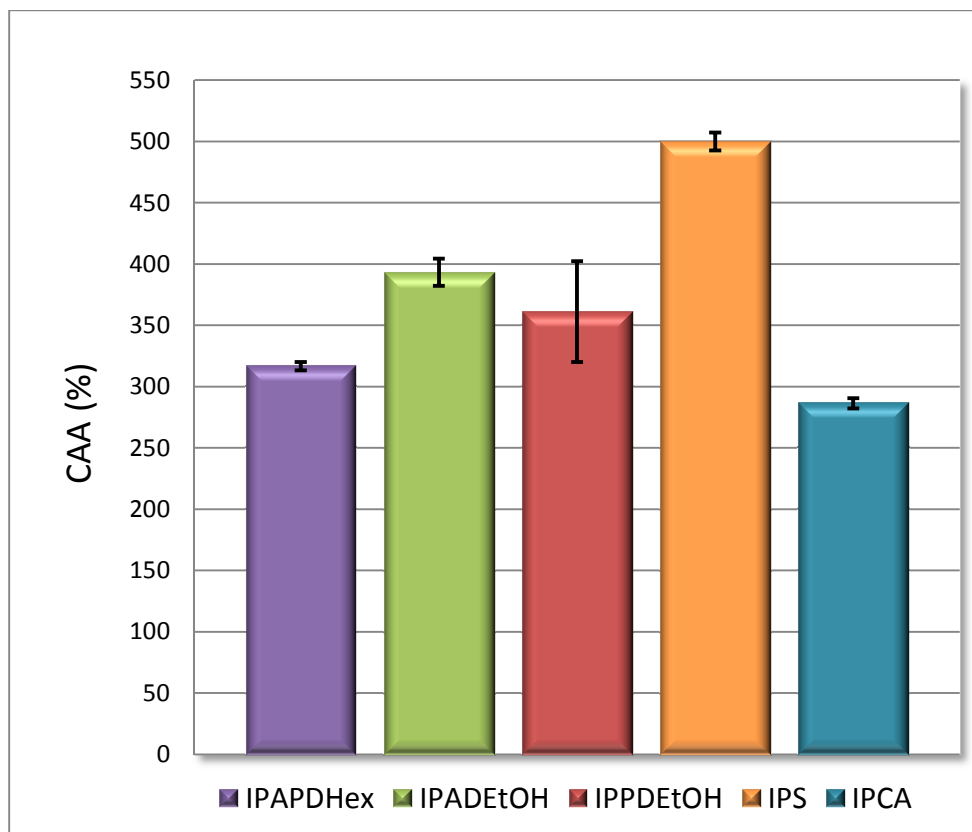


Gráfico 5 – Capacidade de Absorver água das proteínas isoladas de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos de soja e caseína.

IPAPDHex: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com hexano

IPADEtOH: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com etanol

IPPDEtOH:: Isolado proteico da semente de Pinhão-Manso desengordurada por prensagem e seguidamente com etanol em planta piloto.

IPS: Isolado Proteico de Soja

IPCA: Isolado Proteico de Caseína

Assim como observado neste estudo, os autores Saetae & Suntornsuk (2011), estudaram a composição tóxica e as propriedades funcionais de proteína isolada de torta de Pinhão-Manso desengordurada industrialmente por uma empresa asiática especializada. Os resultados demonstraram que as proteínas isoladas apresentaram boa capacidade de ligar-se à água, possivelmente devido a interações entre resíduos de aminoácidos polares das proteínas e a água.

Gloria & Regitano-d'arce (2000), em um estudo das características técnico-funcionais de concentrados e isolados proteicos de torta

desengordurada de Castanha do Pará, perceberam que a capacidade de absorver água da torta e concentrado foi superior ao observado para o isolado, as autoras explicam este resultado por meio do maior percentual de carboidratos presentes na torta e concentrado, quando comparado ao isolado. Os polissacarídeos presentes podem ser os responsáveis por essa maior imobilização de água.

4.4.2 Capacidade de absorver óleo

A média dos valores para a capacidade de absorver óleo dos isolados proteicos de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos soja e caseína encontra-se na Tabela 13. O Gráfico 6 traz uma representação gráfica desses dados, em percentual.

Tabela 13 - Capacidade de absorver óleo dos isolados proteicos de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos soja e caseína

<i>Amostras</i>	<i>CAO (%)</i>
IPAPDHex	389,09 ($\pm 5,92$)
IPADEtOH	257,21 ($\pm 5,99$)
IPPDEtOH	249,24 ($\pm 6,04$)
IPCA	189,02 ($\pm 6,01$)
IPS	184,73 ($\pm 8,53$)

IPAPDHex: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com hexano

IPADEtOH: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com etanol

IPPDEtOH:: Isolado proteico da semente de Pinhão-Manso desengordurada por prensagem e seguidamente com etanol em planta piloto.

IPS: Isolado Proteico de Soja

IPCA: Isolado Proteico de Caseína

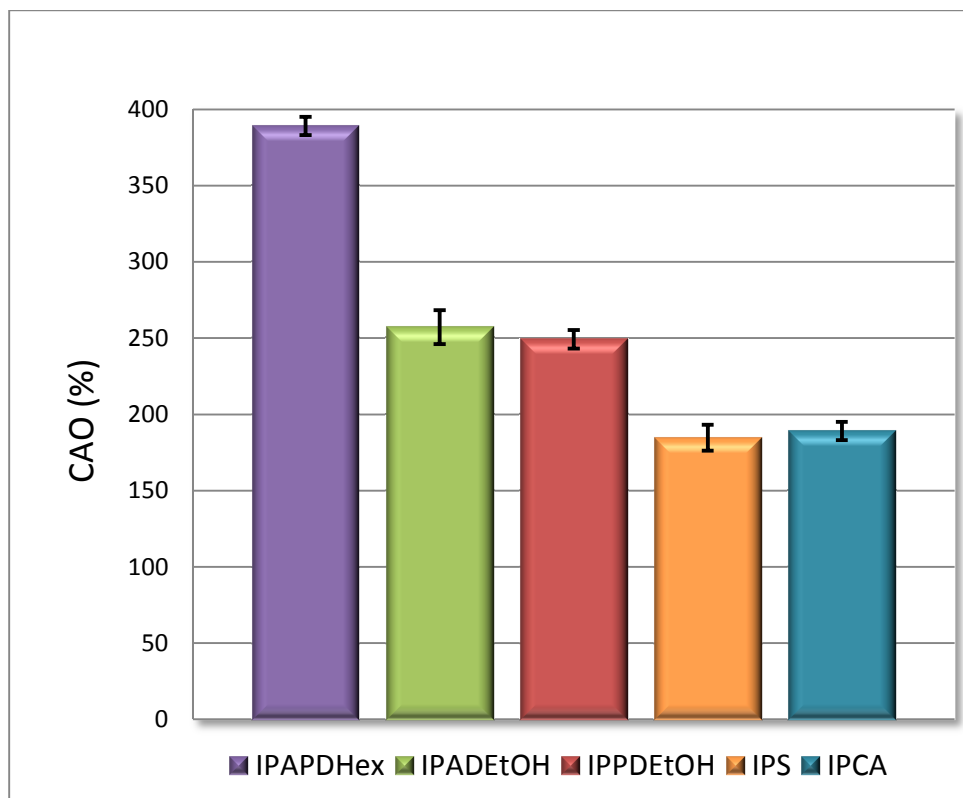


Gráfico 6 – Capacidade de Absorver óleo das proteínas isoladas de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos soja e caseína.

IPAPDHex: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com hexano

IPADEtOH: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com etanol

IPPDEtOH:: Isolado proteico da semente de Pinhão-Manso desengordurada por prensagem e seguidamente com etanol em planta piloto.

IPS: Isolado Proteico de Soja

IPCA: Isolado Proteico de Caseína

Todos os isolados, em teste, apresentaram boa capacidade de absorver óleo, valores esses, superiores ao obtido para os padrões proteicos, caseína e soja.

Também é importante considerar que, as amostras com melhor capacidade de absorver óleo, apresentaram os piores valores para à absorção de água, provavelmente devido a proporção em aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos, visto que no item 4.1.2, deste trabalho, percebeu-se alterações consideráveis entre o conteúdo de aminoácidos de amêndoas tratadas com etanol e amêndoas tratadas com hexano. Além disso, esses

resultados também podem ser explicados pela possível ocorrência de rompimento de algumas pontes de hidrogênio, pelo solvente alcoólico, modificando a conformação das cadeias e consequentemente alterando as características de polaridade e hidrofobicidade dessas proteínas.

Saetae & Suntornsuk (2011) estudaram a composição tóxica e as propriedades funcionais de proteína isolada de torta de Pinhão-Manso desengordurada industrialmente por uma empresa asiática especializada. Os resultados demonstraram que as proteínas isoladas de uma torta anteriormente detoxicada por lavagens susceptíveis com solvente alcoólico, apresentaram capacidade de reter óleo muito inferior ao observado para as amostras não tratadas, resultado similar ao observado neste estudo.

4.4.3 Atividade espumante

A média dos valores de atividade espumante para os isolados proteicos de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos soja e caseína encontra-se na Tabela 14. O Gráfico 7 traz uma representação gráfica dos valores, em percentual, encontrados para atividade espumante e estabilidade da espuma formada.

Tabela 14 - Atividade Espumante média dos isolados proteicos de Pinhão-Manso e dos padrões soja e caseína em diferentes condições de pH.

Amostras	Atividade Espumante média (%)			
	pH			
	3,0	5,0	7,0	9,0
IPAPDHex	162,52 (±8,79)	82,00 (±9,0)	153,13 (±5,0)	264,66 (±8,16)
IPADEtOH	54,63 (±2,99)	17,03 (±1,4)	50,97 (±2,16)	82,87 (±2,56)
IPPDEtOH	64,53 (±3,24)	16,10 (±1,22)	116,43 (±1,34)	151,20 (±1,59)
IPCA	16,37 (±0,98)	0,00	25,67 (±2,12)	166,87 (±2,82)
IPS	40,17 (±0,86)	13,40 (±0,85)	106,87 (±12,28)	99,90 (± 1,65)

IPAPDHex: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com hexano

IPADEtOH: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com etanol

IPPDEtOH:: Isolado proteico da semente de Pinhão-Manso desengordurada por prensagem e seguidamente com etanol em planta piloto.

IPS: Isolado Proteico de Soja

IPCA: Isolado Proteico de Caseína

Espuma pode ser definida como um sistema de duas fases ar / água, constituído de câmaras de ar separadas por uma camada fina e contínua. A função básica das proteínas em espumas é diminuir a tensão interfacial, elevando as propriedades viscoelásticas da fase líquida, formando películas fortes. Embora todas as proteínas sejam anfifílicas, elas diferem muito notavelmente em suas propriedades tensoativas (MAKRI et al., 2005). Os fatores que afetam a capacidade de uma proteína formar espuma e de mantê-la são o tipo de proteína, o grau de desnaturação, pH, temperatura além da técnica de bateção empregada.

A capacidade de formar espuma das proteínas isoladas de Pinhão-Manso oriundas de amêndoas descascadas e desengorduradas com hexano foi superior aos valores obtidos para as demais, sendo importante destacar que esta amostra apresentou melhores características de solubilidade,

confirmando a influencia desta propriedade sobre o desempenho das proteínas.

Por meio dos dados expressos na Tabela 14 e representados pelo Gráfico 7 é possível verificar ainda uma relação direta entre atividade espumante e pH. As condições de alcalinidade, neutralidade e acidez são determinantes para a solubilização de proteínas, que influencia diretamente as propriedades técnico-funcionais de soluções proteicas. Assim, os resultados confirmam a dependência da atividade espumante pela forma de obtenção das proteínas, além das condições de pH impostas.

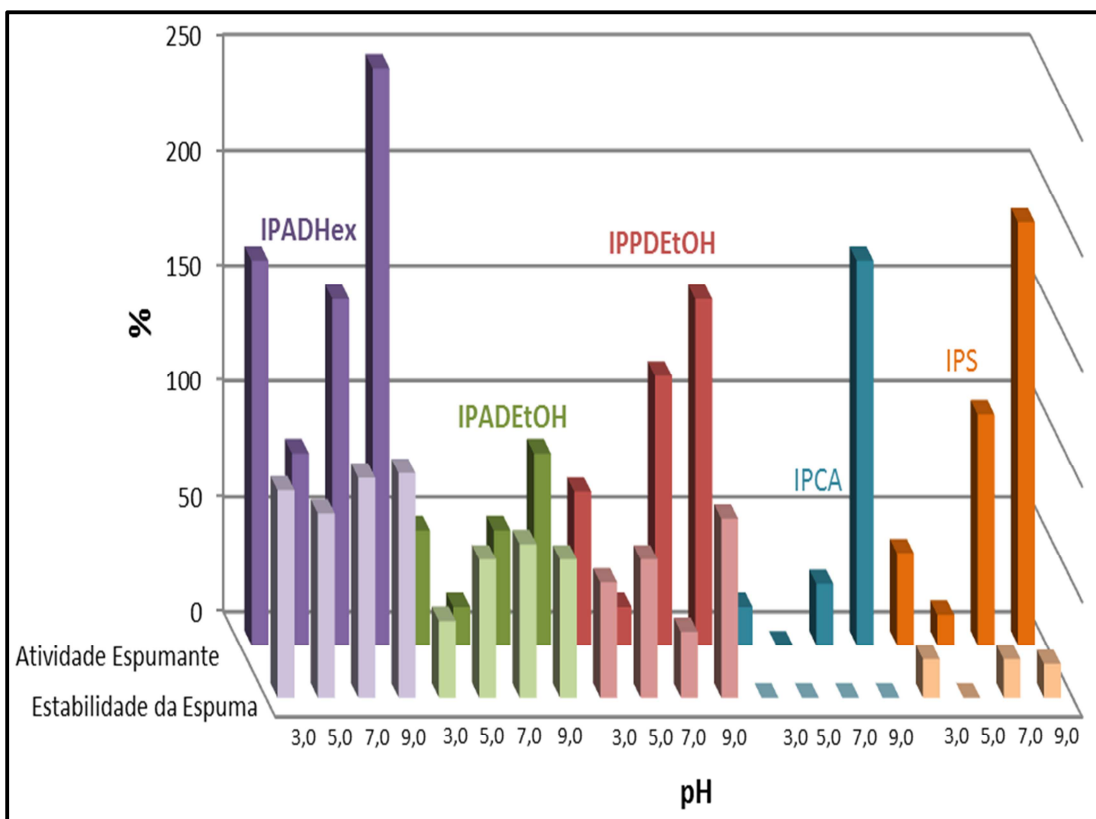


Gráfico 7 – Atividade espumante e estabilidade da espuma formada das proteínas isoladas de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos soja e caseína em diferentes condições de pH.

IPADHex: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com hexano

IPADetOH: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com etanol

IPPDEtOH: Isolado proteico da semente de Pinhão-Manso desengordurada por prensagem e seguidamente com etanol em planta piloto.

IPS: Isolado Proteico de Soja

IPCA: Isolado Proteico de Caseína

Saetae & Suntornsuk (2011) estudaram a composição tóxica e as propriedades funcionais de proteína isolada de torta de Pinhão-Manso desengordurada industrialmente por uma empresa asiática especializada. Os resultados desses autores são similares ao observado neste estudo, confirmando a relação direta existente entre a capacidade de formar espuma, pelas proteínas, e as condições de pH, sendo os menores valores de atividade espumante observados entre os valores de pH 4,0 e 6,0 e o valor máximo em pH 12.

Similarmente, Lestari, et al. (2011), realizaram um estudo das propriedades técnico funcionais das proteínas de acessos de Pinhão-Manso oriundos da Ásia. Os autores verificaram a capacidade de formação de espuma de diferentes amostras em diferentes condições de pH, sendo os melhores resultados obtidos em pH alcalino para isolado proteico de sementes desengorduradas por prensagem e subsequentemente por solvente orgânico.

A esse respeito, MAKRI et al. (2005), elaboraram isolados proteicos de leguminosas, por meio de precipitação isoelétrica e ultrafiltração e estudaram as propriedades funcionais desses isolados. Os autores verificaram a capacidade de formar espuma dessas proteínas e os melhores resultados foram observados para os isolados oriundos da ultrafiltração, que continham teores proteicos entre 80,0 e 100,0%, ou seja, produtos muito ricos em proteína.

4.4.4 Atividade emulsificante

A média dos valores de atividade emulsionante para os isolados proteicos de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos soja e caseína encontra-se na Tabela 15. O Gráfico 8 traz uma representação gráfica dos valores, em percentual, encontrados para atividade emulsionante e estabilidade da emulsão.

Tabela 15 - Atividade Emulsificante média dos isolados proteicos de Pinhão-Manso e dos padrões soja e caseína em diferentes condições de pH.

Amostras	Atividade Emulsificante média (λ)			
	pH			
	3,0	5,0	7,0	9,0
IPAPDHex	0,52 ($\pm 0,02$)	0,34 ($\pm 0,03$)	0,39 ($\pm 0,02$)	0,62 ($\pm 0,02$)
IPADEtOH	0,13 ($\pm 0,01$)	0,12 ($\pm 0,01$)	0,12 ($\pm 0,04$)	0,14 ($\pm 0,01$)
IPPDEtOH	0,16 ($\pm 0,01$)	0,10 ($\pm 0,01$)	0,27 ($\pm 0,03$)	0,38 ($\pm 0,04$)
IPCA	0,26 ($\pm 0,01$)	0,20 ($\pm 0,02$)	0,32 ($\pm 0,01$)	0,33 ($\pm 0,02$)
IPS	0,28 ($\pm 0,02$)	0,18 ($\pm 0,03$)	0,32 ($\pm 0,02$)	0,37 ($\pm 0,02$)

IPAPDHex: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com hexano

IPADEtOH: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com etanol

IPPDEtOH:: Isolado proteico da semente de Pinhão-Manso desengordurada por prensagem e seguidamente com etanol em planta piloto.

IPS: Isolado Proteico de Soja

IPCA: Isolado Proteico de Caseína

λ : Absorbância a 500nm

De acordo com Lestari et al. (2011), a atividade emulsionante está relacionada com a taxa de desdobramento das proteína nas interfaces óleo / água, ou seja, essa propriedade está diretamente ligada ao conteúdo proteico adsorvido. Com base na teoria para espalhamento de luz dispersa por partículas esféricas, o valor da absorbância da emulsão diluída pode oferecer informações sobre o diâmetro médio e a distribuição granulométrica dos glóbulos de gordura formados após a emulsificação, indicando parâmetros para a atividade emulsionante que pode ser afetada pela composição e estrutura da proteína também pelo pH e força iônica. Por meio da Tabela 15 percebe-se que os valores obtidos para atividade emulsificante foram superiores para o isolado proteico oriundo de amêndoas desengorduradas por hexano, em comparação às médias obtidas para as demais amostras teste. Ainda é possível perceber que, o isolado proveniente

de amêndoas desengorduradas por etanol, apresentou o menor índice de atividade emulsionante. As propriedades técnico-funcionais das proteínas são afetadas pela solubilidade proteica, neste sentido, os resultados obtidos para atividade emulsionante, ratificam os dados expostos no item 4.2.2, mais especialmente o Gráfico 4, em que se observa o baixo teor de proteína solubilizada do Isolado proteico de amêndoa desengordurada com etanol (IAPDEtOH).

Vale acrescentar que, em geral, as proteínas de Pinhão-Manso, apresentaram boa atividade emulsificante compatíveis ao observado para os padrões soja e caseína.

Proteínas, normalmente possuem propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas. A atividade emulsionante é uma importante propriedade das proteínas em alimentos emulsionados, tais como queijos, sorvetes, molhos para saladas e carnes processadas (PAGNO et al., 2009). Por meio do Gráfico 8 é possível observar o quanto a atividade emulsionante, assim como a estabilidade da emulsão, são diretamente dependentes do pH, sendo os melhores resultados observados em condições alcalinas. Saetae & Suntornsuk (2011) avaliaram as propriedades técnico funcionais de isolados proteicos de Pinhão-Manso e encontraram resultados similares para atividade emulsionante, obtendo baixos valores em condições ácidas, pois o percentual de proteína solubilizada é reduzido e elevados índices em condições alcalinas.

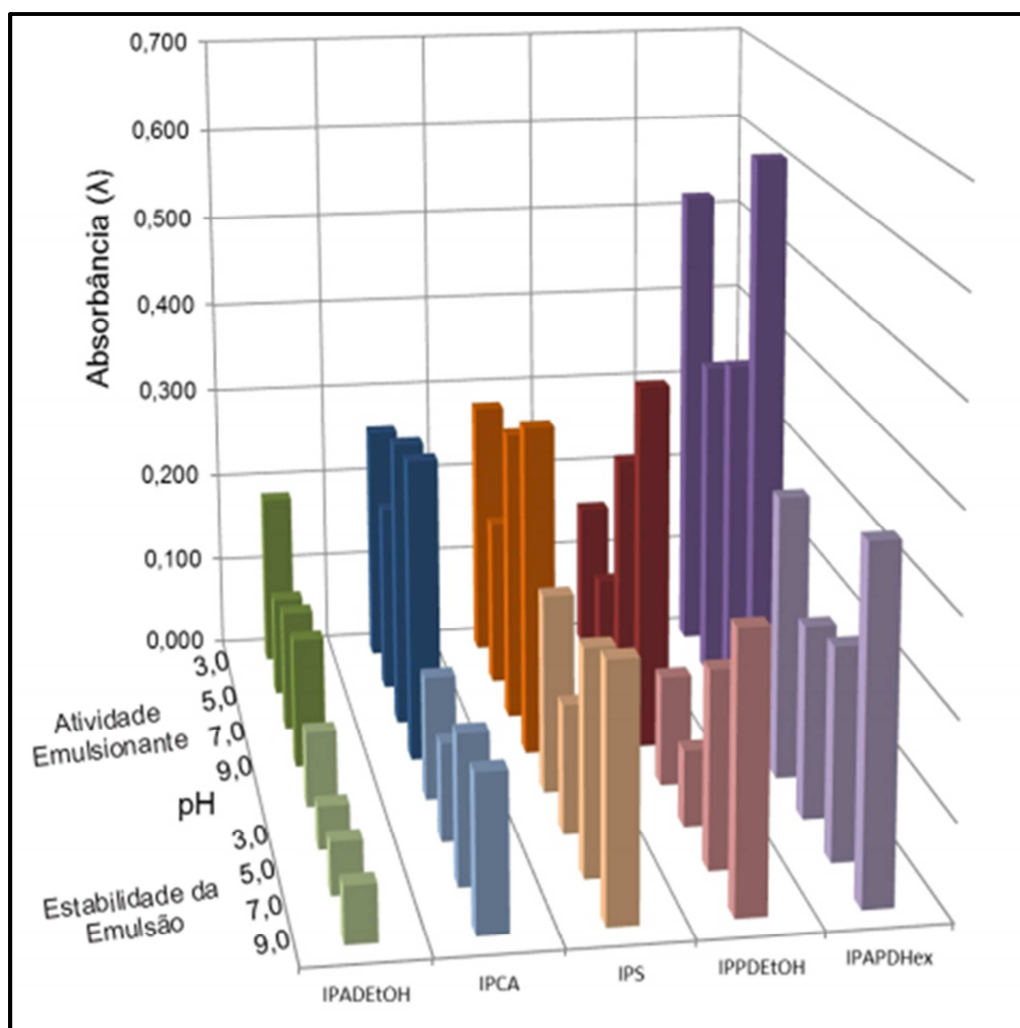


Gráfico 8 – Atividade emulsificante e estabilidade da emulsão das proteínas isoladas de Pinhão-Manso e dos padrões proteicos soja e caseína em diferentes condições de pH.

IPADHex: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com hexano

IPADeTOH: Isolado proteico das amêndoas de Pinhão-Manso desengordurada com etanol

IPPDeTOH: Isolado proteico da semente de Pinhão-Manso desengordurada por prensagem e seguidamente com etanol em planta piloto.

IPS: Isolado Proteico de Soja

IPCA: Isolado Proteico de Caseína

λ: Absorbância a 500nm

Similarmente ao observado neste estudo, Lestari e colaboradores (2011) estudaram as propriedades técnico-funcionais de proteínas isoladas de Pinhão-Manso e determinaram que a atividade emulsificante e a

estabilidade da emulsão formada foram similares ao obtido para caseinato de sódio e superiores ao observado para proteína de soja, obtendo-se os menores valores em pH 5,0.

Para formar uma emulsão, as proteínas devem ter boa capacidade para auxiliar a formação de pequenos e distintos glóbulos de gordura, que são simultaneamente distribuídos por toda a fase aquosa contínua. Glóbulos de gordura pequenos podem ser obtidos pela crescente entrada de energia, no sistema, e consequente diminuição da tensão interfacial. O papel das proteínas durante a emulsificação é diminuir a tensão interfacial, por meio da redução da energia interna livre do sistema, adsorvendo-se rapidamente nas interfaces óleo / água formando uma nova camada interfacial entre as interfaces (LESTARI et al., 2011).

A esse respeito, Pagno et al.(2009), desenvolveram concentrados proteicos de soro de leite obtidos por ultrafiltração e testaram a atividade emulsificante, os resultados demonstraram bom potencial de utilização desses produtos em formulações alimentares. Silva et al. (1996), estudaram as propriedades funcionais de isolado proteico de sementes de algaroba, apresentando pequenas variações entre a faixa de pH de 3,0 a 8,0, exceto em pH 5,0, correspondente ao ponto isoelétrico dessas proteínas.

5 CONCLUSÃO

O aproveitamento da torta e farelos de Pinhão-Manso para alimentação, da mesma forma como ocorre com a soja, geraria importante renda e contribuiria para viabilizar economicamente a cultura. Neste sentido, os resultados deste estudo demonstram que esta possibilidade existe, entretanto, deve-se considerar que as características do material proteico é diretamente dependente da forma de extração do óleo. Para utilização, em alimentos, dos produtos de Pinhão-Manso, seja em formulações ou mesmo alimentação animal, a destruição dos componentes tóxicos se faz necessária. Assim, realizar a desintoxicação do material durante a extração do óleo é uma alternativa bastante eficaz, no entanto, pode promover algumas alterações, sendo necessários mais estudos que permitam desintoxicar os produtos oriundos de Pinhão-Manso, sem grandes modificações ao material proteico potencialmente utilizável.

6 REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. L.; FILHO, J. C. S.; GODOI, A. R.; CARMO, C. A.; EDUARDO, J. L. P., **Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes**. *R. Bras. Zootec.*, v.37, Suplemento especial p.260-258, 2008.
- ALVES, J. M. A.; SOUSA, A. de A.; SILVA, S. R. G da, LOPES, G. N.; SMIDERLE, O. J.; UCHÔA, S. C .P. **Pinhão-Manso: uma alternativa para produção de biodiesel na agricultura familiar da Amazônia brasileira**. *Agroambiente On-line*, Boa Vista, v. 2, n. 1, p. 57-68, 2008
- ANP, **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**, Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Ministério das Minas e Energia, Rio de Janeiro-Brasil, 227p, 2011
- ARAÚJO, J. M., **Química de Alimentos: Teoria e prática**, Viçosa-MG, Ed. UFV, 601p, 2011
- BELTRÃO, N. E. M. **Considerações gerais sobre o Pinhão-Manso (*Jatropha curcas* L.) e a necessidade urgente de pesquisas, desenvolvimento e inovações tecnológicas para esta planta nas condições brasileiras**. Paraíba - Brasil, 2006.
- BICUDO, R. C.; BICUDO, T. C.; FORATO, L. M.; COLNAGO, L. A.; LANÇAS, F. M., **Análise de Zeínas α do milho por LC-ESI-Q/TOF**, Comunicado Técnico 77 / EMBRAPA, São Carlos – SP, 2006.
- BICUDO, T. C.; FREIRE, L. M. S.;ALBUQUERQUE, A. R.; DANTAS, M. B.; VASCONCELOS, A. F. F.; ROSENHAIM, R.;SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G., **Estabilidade e tempo de indução oxidativa do óleo de pinhão-manso para produção de biodiesel**. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL. Brasília. Anais. ABIPTI/SETEC-MCT, 2007
- BRASIL, RESOLUÇÃO RDC nº 91 de outubro de 2000. **Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos com Soja**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 20 de outubro de 2000.
- BRASIL, RESOLUÇÃO ANVISA nº 270 de setembro de 2005. **Aprova o Regulamento Técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 23 de setembro de 2005.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. E.; SANTOS, J. C.; **Modificação de óleos por biotransformação**. *Revista Química Nova*, v.27, p 146-156, 2004.

DENCH, J. E.; RIVAS, R. N.; CAYGIL, J. C. **Selected functional properties of sesame (*Sesame indicum* L) flour and two protein isolates.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 32, p. 557, 1981

DONADEL, M. E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H., **Propriedades funcionais de concentrado protéico de feijão envelhecido**, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol.19, n.3 Campinas, 1999.

ELDRIDGE, A. C., **A bibliograpy on the solvente extration of soybens and soyben products 1944-1968.** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 46, 458A, 460A, 462A, 464A, 496A, 498A, 500A, 502A, 1969.

FELIX, S. P.; MAYERHOFFER, R. O.; DAMATTA, R. A.; VERISSIMO, M. A.; NASCIMENTO, V. V.; MACHADO, O. L. T., **Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from Ricinus communis, by mast cell degranulation assay.** *Peptides*, New York, v. 29, p. 497-504, 2008.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L., **Química de Alimentos de Fennema**, Ed. Artmed, 900p, 2010

FERNANDES, R. N., **Valor nutritivo do farelo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*,** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2010

FERRARI, R. A.; CASARINI, M. B.; MARQUES, D. de A.; SIQUEIRA, W. J., **Avaliação da composição química e de constituinte tóxico em acessos de pinhão-manso de diferentes origens.** *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 12, n. 4, p. 309-314, 2009.

FLORES, M. E. L. P., **Characterization bioquímica de las proteínas de las semilla de *Jatropha curcas* L,** Dissertação (mestrado) – Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de produtos Bióticos, Yautepec, Morelos – México, 2004

FOLHA de São Paulo, Jornal diário. **Biocombustíveis-Biodiesel e Bioquerosene - Pinhão-Manso terá novo investimento**, 17 janeiro de 2012.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-d'ARCE M. A. B., **Concentrado e isolado proteico de torta de Castanha do Pará: Obtenção caracterização química e funcional.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Vol.20, nº.2, Campinas, 2000.

GOEL, G.; MAKAR, H. P. S.; GEORGE FRANCIS, K. BEKER. **Phorbol ester structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals.** *International Journal of Toxicology*, University of Hohenheim Stuttgart, Germany. 26: 279 - 288, 2007

GOMES, J. C.; ARAÚJO, M.; MOREIRA, M.; COELHO, D., **Caracterização funcional de isolados e de um concentrado proteico de soja produzido no Brasil: Solubilidade e capacidade de absorção de água.** *Revista Ceres*, v.34 (193), p 232- 249, 1987.

GONÇALVES, S. B.; MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G., **Substâncias Tóxicas, Alergênicas e Antinutricionais Presentes no Pinhão-manso e seus Derivados e Procedimentos Adequados ao Manuseio** – Circular Técnico, Brasília – DF, 2009.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M.; **Determination of serum proteins by means of the biuret reactions.** *Journal of biological Chemistry*, 751-756, 1948

GUERRERO, V. C.; FLORES, D. P.; ANCONA, B.; ORTIZ, D. G., **Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p 584-591, 2002

HAAS, W; MITTELBAACH, M., **Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L.** *J. Industrial Crops and Products* 12, 111 – 118, 2000.

HAGENS, R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J., **Pre-column Phenylisothiocyanate derivatization and Liquid-Chromatography of aminoacids in food.** *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 72 (6): 912-916, Nov – Dec, 1989

HETTIARACHCHY, N. S.; ZIEGLER, G. D., **Protein Functionality in Food Systems**, Editora Marcel Dekker, 519p, 1994.

LACERDA, L. D., **Avaliação das propriedades físico-químicas de proteína isolada de soja, amido e glúten e suas misturas.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre - RS, 2008

LESTARI, D.; MULDER, W.; SANDERS, J. **Improving *Jatropha curcas* seed protein recovery by using counter current multistage extraction,** *Biochemical Engineering*, v. 50, p 16–23, 2010

LESTARI, D.; MULDER, W.; SANDERS, J. P. M.; ***Jatropha* seed protein functional properties for technical applications,** *Biochemical Engineering*, vol. 53 297-304, 2011

LIMA, R. L. S. de; SEVERINO, L. S.; FERREIRA, G. B.; SOFIA, V.; SAMPAIO, L. R.; BELTRAO, N. E. de M., **Propagação de Plantas-Casca de mamona associada a quatro fontes de matéria orgânica para a produção de mudas de pinhão-manso,** *Rev. Ceres (Impr.)* vol.58 no.2 Viçosa, 2011

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de Alimentos**. Editora Funep, p 240 a 243, Jaboticabal – SP, 2000

LUIZ, D. F., **Expressão heteróloga e caracterização bioquímica da proteína recombinante GmSBP2/S64 (Glycine max)**, Dissertação de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa – MG, 2006

LUTZ, Instituto Adolfo Lutz, **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos** – São Paulo, 4ª edição, 2004.

MAIA, J. T. L. S.; GUILHERME, D. O.; PAULINO, M. A. O.; SILVEIRA, H. R. O.; FERNANDES, L. A., **Efeito da Omissão de Macro e Micronutrientes no crescimento de Pinhão-Manso**, *Revista Caatinga*, Mossoró, v. 24, n. 2, p. 174-179, 2011

MAKKAR, H. P. S.; ADERIBIGBE, A. O.; BECKER, K., **Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* L. for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors**. *Food Chemistry*, Vol. 62, No. 2, p. 207-215, 1998

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. **Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curca* L.** *Jour. Agric. Food Chem.* 45, 3152-3157, 1997

MAKRI, E.; PAPALAMPROU, E.; DOXASTAKIS, G., **Study of functional properties of seed storage proteins from indigenous European legume crops (lupin, pea, broad bean) in admixture with polysaccharides**. *Journal Food Hydrocolloids*, vol. 19, p 583-594, 2005

MARTINEZ-HERRERA, J.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G.; DAVILA-ORTIZ, G.; BECKER, K., **Chemical composition, toxic / antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico**, *Food Chemistry*, 96p, 80–89, 2006.

MARTINS, C. C.; MACHADO, C. G.; CAVASINI, R., **Temperatura e substrato para o teste de germinação de sementes de pinhão-manso**, *Ciência Agrotecnica*, vol.32, no.3, Lavras, 2008

MORETTO, E.; FETT, R., **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**, São Paulo, Livraria Varela, 150p, 1998

OLIVEIRA, G. F., **Desenvolvimento e caracterização de isolado proteico de soja modificado com hexametáfosfato de sódio**; Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa-MG, 2010

OPENSHAW, K. **A review of *Jatropha curcas* L.: an oil plant of unfulfilled promise**. *Biomass and Bioenergy*, n. 19, p. 1-15, 2000

OSBORNE, T. B., **The vegetable Proteins**, 1909 - Monographs on Biochemistry, Research Chemist in the Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, Connecticut Research Associate OP the Carnegie Institution of Washinton, D. C. Disponível em:
Universiry of Toronto - Gerstein Science Information Centre, Toronto, Canadá. <<http://archive.org/details/vegetableprotein00osbouoft>>
Acesso em 10 de março de 2012

OKAMOTO, S. **Studies on the alcoholic extraction of soybean oil**. Conteporary Mandchuria . p. 543-546. Darian, 1947.

PAGNO, C. H.; BALDASSO, C.; TESSARO, I. C.; FLORES, S. H.; JONG, E. V., **Obtenção de concentrado proteico de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas**, *Revista Alientos e Nutrição*, vol. 20, p 231-239, 2009

PLANTABIO.COM, **Pinhão-Manso e Mamona atraem estrangeiros na corrida pelo biodiesel**, Ed. Marinella Castro e Fabiano Lopes. Disponível em:
<http://plantabio.com.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=3%3Apinhao-manso-e-mamona-atraem-estrangeiros-na-corrida-pelo-biodiesel&catid=3%3Anews&Itemid=13&lang=pt> Acesso em 01 de fevereiro de 2012.

PURCINO, A. A. C.; DRUMMOND, O. A., **Pinhão-Manso**. Belo Horizonte: EPAMIG, 7p, 1986.

RAKSHIT, K. D.; DARUKESHWARA, J.; RATHINA RAJ, K.; NARASIMHAMURTHY, K.; SAIBABA, P.; BHAGYA, S., **Toxicity studies of detoxified Jatropha meal (*Jatropha curcas* L.) in rats**, *Journal. Food and Chemical Toxicology*, v.46, p 3621–3625, 2008

RAO, R. K.; ARNOLD, L. K., **Alcoholic extraction of vegetable oils. V. Pilot plant extraction of cottonseed by aqueous ethanol**. *Journal of the American oil chemist's society*, v 35, n 6, 277-281, 1958

SAETAE, D.; SUNTORNSUK, W., **Toxic compound, anti-nutritional factors and functional properties of protein isolated from detoxified *Jatropha curcas* L. seed cake**. *International Journal of Molecular Sciences*, v.12, p 66-77, 2011

SAMBROOK, J., E. F. **Fritsch e T. Maniatis - Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989

SANTOS, C. T., **Farinha de semente de Jaca: Caracterização físico-química e propriedades funcionais**, TCC- Universidade Estadual do Sudeste da Bahia – UESB, Itapetinga - Ba, 2009

SILVA, J. B.; BORA, P. S.; NETO, V. Q.; **Caracterização de propriedades funcionais do isolado proteico de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora*)**, B. CEPPA, v. 14, p 253 – 272, Curitiba, 1996

SILVA, M. T. C.; TURATTI, J. M. **Extração de óleo de soja com etanol**. Coletânea do ITAL, Campinas, v. 21 , n. 1, p. 73-89, 1991 .

SILVEIRA, J.C. **Contribution a l'étude du pulphère auxiles du Cap Vert**. In: Instituto Superior de Agronomia (Campinas,SP). Anais Campinas, v. 6, p. 116-126,1934

SPIRES, J. R. **Determination of tryptofhan in proteins**. *Analytical Chemists*, v. 39, p.1412-1415, 1967

USMAN, L. A.; AMEEN, O. M.; LAWAL, A.; AWOLOLA, G. V., **Effect of alkaline hydrolysis on the quantity of extractable protein fractions (Prolamin, Albumin, Globulin and Glutelin) in *Jatropha curcas* L. seed cake**. *Journal of Food Technology*, vol. 6, p 259 – 262, 2008

VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; PAULA, A. C. O., **Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana**, *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.34, n.7, p.1277-1283, 1999

VILLALVA, M. M. H., **Modificação química de um isolado proteico de soja com solubilidade semelhante à da caseína humana**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa – MG, 2008

WANI, A. A.; SOGI, D. S.; SINGH, P.; WANI, I. A., SHIVHARE, U. S., **Characterisation and functional properties of watermelon (*Citrullus lanatus*) seed proteins**, *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, v.91, p 113-121, 2011

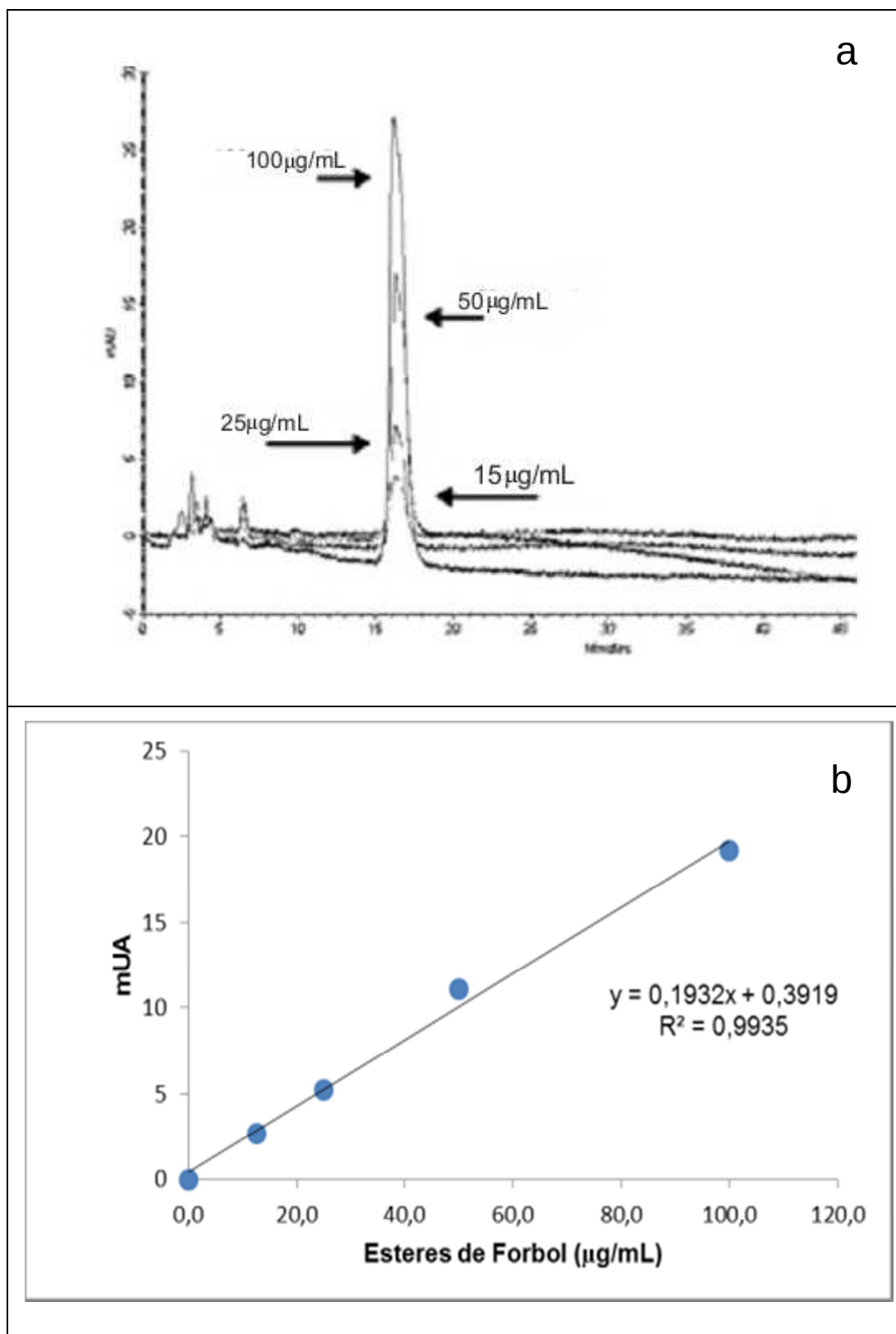
WAN, P. J., **Introduction to Fats and Oils Technology**, American Oil Chemists Society, New Orleans - USA, 1991

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C., **An evolution of the waters Pico-Tag System for the aminoacids analysis of food materials**. *Journal of Automatic Chemistry* 8(4): 170-177, Oct-Dec., 1986

ZARKADAS, C. G.; YU, Z.; ZARCADAS, G. C.; MINEIRO-AMADOR, A., **Assessment of the Protein Quality of Beefstock Bone Isolates for Use as an Ingredient in Meat and Poultry Products**. *J. Agric. Food Chem.*, v.43, p 77-83, 1995

ANEXO I

Cromatogramas e curva analítica para determinação dos Ésteres de Forbol



a) Cromatograma do padrão 12-Miristato 13-Acetato de forbol – sintético, em diferentes concentrações; b) Curva Analítica ($mUA = 0,1932[\text{concentração do éster de forbol}] + 0,3919$) $r^2 = 0,9935$