

**VINÍCIUS LOPES LESSA**

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÕES FÍSICO-QUÍMICA E TÉCNICO-FUNCIONAL DE  
ISOLADO PROTEICO DE AMÊNDOA DE MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*)**

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*.

Orientador: Frederico Augusto Ribeiro de Barros

Coorientador: Eduardo Basílio de Oliveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L638o  
2022  
Lessa, Vinicius Lopes, 1994-  
Obtenção e avaliações físico-química e técnico-funcional de  
isolado proteico de amêndoa de macaúba (*Acrocomia aculeata*) /  
Vinicius Lopes Lessa. – Viçosa, MG, 2022.  
1 dissertação eletrônica (76 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Frederico Augusto Ribeiro de Barros.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2022.

Referências bibliográficas: f. 65-76.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.384>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Acrocômia aculeata*. 2. Macaúba - Teor proteico.  
3. Macaúba - Composição. I. Barros, Frederico Augusto Ribeiro  
de, 1983-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 664.7204

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552

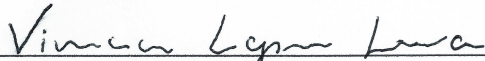
VINÍCIUS LOPES LESSA

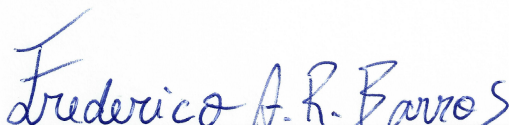
**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E TÉCNICO-FUNCIONAL  
DO ISOLADO PROTEICO DA AMÊNDOA DE MACAÚBA**

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: 09 de junho de 2022.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Vinícius Lopes Lessa  
Autor

  
\_\_\_\_\_  
Frederico Augusto Ribeiro de Barros  
Orientador

*Aos meus pais por todo afeto, dedicação e  
cuidado que me deram durante toda a minha  
existência*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marilene Lopes Lessa e Milton da Silva Lessa, por todo o esforço para me dar as melhores oportunidades, pelo amor incondicional, respeito, afeto e apoio.

Ao meu orientador, Dr. professor Frederico Augusto Ribeiro de Barros, por confiar sempre no meu potencial, por tudo que ele me ensinou e por me inspirar como pessoa.

Ao meu co-orientador, Dr. Professor Eduardo Basílio de Oliveira pelo apoio, contribuições e por, gentilmente, me permitir usar o Laboratório.

À minha querida amiga do laboratório, Michele Harumi Omura, por toda a ajuda durante o experimento.

Ao professor Gustavo Bressan por permitir a utilização de equipamentos e principalmente ao Éverton Barbosa por toda ajuda, supervisão e disponibilidade.

Aos amigos dos laboratórios de Operações e Processos (LOP) e Estudos de Materiais Alimentares (LEMA), pelo apoio e ótima convivência e por tornarem o trabalho prazeroso.

Aos meus queridos amigos com quem dividi momentos formidáveis durante minha estadia em Viçosa.

A empresa Soleá por, gentilmente, fornecer as amêndoas de macaúba, e por todo o apoio durante a execução do projeto.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos do Departamento Federal Universidade de Viçosa, por todo o aprendizado e momentos vividos durante meus estudos.

À Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade e pelos recursos investidos em minha formação. O presente trabalho foi realizado com apoio Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – BRASIL (CAPES) – Código de Financiamento 001, e das agências de apoio financeiro - CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) que me concedeu a bolsa de estudos, e a FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais). A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para minha carreira acadêmica e que foram presente em minha jornada.

## RESUMO

LESSA, Vinícius Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2021. **Obtenção e caracterização físico-química e técnico-funcional do isolado proteico da amêndoa de macaúba.** Orientador: Frederico Augusto Ribeiro de Barros. Coorientador: Eduardo Basílio de Oliveira.

O consumo de proteínas de origem vegetal está aumentando em todo o mundo. Estas proteínas desempenham um papel importante na nutrição humana, bem como nas propriedades físico-químicas e tecno-funcionais dos alimentos. Entretanto, há interesse em pesquisar e explorar novas fontes de proteínas vegetais. A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira tropical, nativa da região central do Brasil. Seus frutos são obtidos principalmente de forma sustentável e podem ser utilizados para diversos fins (alimentos, cosméticos e energia). O objetivo deste trabalho foi obter (por precipitação isoelétrica) e avaliar as propriedades físico-químicas e técnico-funcionais do isolado proteico da amêndoa de macaúba (pH 3,5 e 7,0). O isolado foi obtido da farinha desengordurada da amêndoa, farinha essa composta principalmente por proteínas (37,3%) e fibras (35,7%), além de alto conteúdo de cinzas (5,1%), o teor de lipídeos foi de 1,6% e o de umidade de 9,7%. Já o isolado proteico de amêndoa (IPAM) de macaúba apresentou elevado teor de proteínas (94,9%) e baixos teores de umidade (4,6%), lipídeos (1,9%) e fibras e o teor de cinzas foi de 1,8%. O pHi do isolado proteico foi estimado próximo ao pH 4,9 e apresentou baixa solubilidade na faixa de pH 4,0-6,0. O perfil SDS-PAGE identificou 6 bandas com peso molecular que variaram entre 7 e 58 kDa para as proteínas do isolado proteico. Em termos de qualidade nutricional, o isolado proteico não possui aminoácidos limitantes e possui alto teor de argirina e glutamato. O índice  $h_0$  em pH 3,5 foi menor que em pH 7,0, já os grupos sulfidrilas livres foram maiores em pH 7,0. O IPAM tem maior capacidade de reter óleo (1,53 g.g<sup>-1</sup>) do que água (0,97 g.g<sup>-1</sup>). Foi observado maior índice de atividade emulsificante (IAE) utilizando concentração de 0,25% que com 0,5 e 1% de IPAM em pH 7,0. Já em pH 3,5 emulsões com 1% de IPAM apresentaram maior IAE. Contudo, em ambos os valores de pH, as emulsões com concentração de IPAM de 0,25% não se mantiveram estáveis durante o período de armazenamento. É necessária concentração mínima de 14% de IPAM para formar um gel firme. Em conclusão, o IPAM apresentou elevado teor de proteínas que fornecem todos os aminoácidos essenciais em quantidade suficiente para satisfazer as necessidades do corpo humano, além de apresentar propriedades técnico-funcionais interessantes, apresentando, assim, um potencial para a indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** Isolado proteico. Ponto isoelétrico. *Acrocomia aculeata*.

## ABSTRACT

LESSA, Vinícius Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2022. **Physical-chemical and technical-functional characterization of protein isolate from macauba kernel.** Adviser: Frederico Augusto Ribeiro de Barros. Co-advisor: Eduardo Basílio de Oliveira.

The consumption of proteins of plant origin is increasing worldwide. These proteins have an important role in human nutrition as well as in the physicochemical and techno-functional properties of foods. Therefore, there is interest in researching and exploring new sources of plant proteins. Macauba (*Acrocomia aculeata*) is a promising tropical palm tree, native to the central region of Brazil. Its fruits are mostly obtained in a sustainable way and can be used for different applications (food, cosmetics and energy). The objective of this work was to obtain (by isoelectric precipitation) and to evaluate the physicochemical and technical-functional properties of protein isolate from macauba kernel (IPAM) (pH 3.5 and 7.0). The defatted almond flour is composed mainly by proteins (37.3%) and fibers (35.7%), besides high content of ashes (5.1%). The lipids content was 1.6% and the humidity was 9.7%. The IPAM stands out for its high protein content (94.9%), and also has low levels of moisture (4.6%), lipids (1.9%) and ash (1.8%). The isoelectric point of the proteins was estimated close to pH 4.9 and showed low solubility in the pH range 4.0-6.0. The SDS-PAGE profile identified 6 bands with molecular weight ranging from 7 to 58 kDa for the proteins of the protein isolate. In terms of nutritional quality, tryptophan was the only limiting amino acid in IPAM, which has a high argyirin and glutamate content. The  $h_0$  index at pH 3.5 was lower than at pH 7.0, while the free sulfhydryl groups were higher at pH 7.0. IPAM has higher capacity to retain oil (1.53 g.g<sup>-1</sup>) than water (0.97 g.g<sup>-1</sup>). Higher index of emulsifying activity was observed using concentration of 0.25% than with 0.5 and 1% of IPAM at pH 7.0. In pH 3.5, emulsions with 1% of IPAM presented higher EIA. However, at both pH values, emulsions with 0.25% concentration of IPAM did not remain stable during the storage period. A minimum concentration of 14% IPAM is required to form a firm gel. In conclusion, IPAM showed high protein content that provides most of the essential amino acids in sufficient quantity to meet the needs of the human body, besides presenting interesting technical-functional properties, thus presenting a great potential for the food industry.

**Keywords:** Protein isolate. Isoelectric point. *Acrocomia aculeata*.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>12</b>
2.1.	Proteínas de origem vegetal	12
2.3.	Macaúba ( <i>Acrocomia aculeata</i> )	18
2.3.1.	Composição química da macaúba .....	21
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
3.1.	Objetivo geral	27
3.1.	Objetivos específicos	27
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
4.1.	Locais de trabalho	28
4.2.	Reagentes	28
4.3.	Matéria prima	29
4.6.	Composição centesimal do isolado e da farinha desengordurada da amêndoa de macaúba	31
4.7.	Perfil de aminoácidos do isolado proteico da amêndoa de macaúba	31
4.8.	Caracterização físico-química do isolado proteico da amêndoa de macaúba	31
4.8.1.	Determinação do ponto isoelétrico médio (pHi) do IPAM .....	31
4.8.2.	Distribuição de massas molares (perfil SDS-PAGE) .....	32
4.8.3.	Perfil de turbidez e dispersibilidade do IPAM em meio aquoso .....	33
4.8.4.	Superfície hidrofóbica exposta (índice $h_0$ ).....	34
4.8.5.	Grupos sulfidril livres (SH) .....	34
4.9.	Propriedades técnico funcionais das proteínas da amêndoa da macaúba	35
4.9.1.	Capacidades de retenção de água e óleo (CRO e CRA) .....	35
4.9.2.	Propriedades espumantes .....	35
4.9.3.	Propriedades emulsificantes .....	36
<b>4.9.3.1.</b>	<b>Preparo das emulsões</b>	<b>36</b>
<b>4.9.3.2.</b>	<b>Índice da atividade emulsificante (IAE)</b>	<b>37</b>
<b>4.9.3.3.</b>	<b>Microestrutura</b>	<b>37</b>
<b>4.9.3.4.</b>	<b>Estabilidade macroscópica das emulsões</b>	<b>37</b>
4.9.4.	Propriedades gelificantes .....	38
<b>4.9.4.1.</b>	<b>Concentração mínima de gelificação</b>	<b>38</b>
<b>4.9.4.1.</b>	<b>Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)</b>	<b>38</b>

<b>4.9.</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
5.1.	Condições para a obtenção do isolado proteico de amêndoa de macaúba	40
5.1.1.	Obtenção do IPAM .....	41
5.2.	Composição centesimal da FDAM e do IPAM	42
5.3.	Perfil de aminoácidos do IPAM	43
5.4.	Caracterização físico-química do IPAM	45
5.4.1.	Ponto isoelétrico médio (pHi) do IPAM .....	45
5.4.2.	Distribuição de massas molares (perfil SDS-PAGE) .....	46
5.4.3.	Perfil de turbidez e dispersibilidade do IPAM em meio aquoso .....	47
5.4.4.	Superfície hidrofóbica exposta (índice $h_0$ ).....	49
5.4.5.	Grupos sulfidril livres (SH) .....	51
5.4.6.	Diâmetro hidrodinâmico médio .....	51
5.5.	Propriedades técnico funcionais das proteínas da amêndoa da macaúba	52
5.5.1.	Capacidade de retenção de água e de óleo (CRO e CRA) .....	52
5.5.2.	Propriedades espumantes .....	54
5.5.3.	Propriedades emulsificantes .....	55
5.5.3.2.	Microestrutura .....	57
<b>5.5.3.3.</b>	<b>Estabilidade macroscópica das emulsões</b>	<b>58</b>
5.5.4.	Propriedades do gel .....	61
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a demanda por proteínas de origem vegetal tem crescido por todo o mundo devido a mudanças nos hábitos alimentares das pessoas, seja motivada por questões religiosas ou pela busca de alimentos que causem menores impactos ambientais e preservação do bem-estar animal (Foods et al., 2020; Sá, Moreno & Carciofi, 2020; Omura et al., 2021; Oliveira et al., 2020). Além disso, sabe-se que uma alimentação à base de proteínas vegetais traz benefícios à saúde e possui baixo custo (Alves et al., 2020). As proteínas são nutrientes essenciais para a nutrição humana pois são fontes de aminoácidos essenciais e não essenciais e a qualidade nutricional desses nutrientes varia com a sua biodisponibilidade, digestibilidade, perfil de aminoácidos, presença de fatores antinutricionais e efeitos do processamento (ex: tratamento térmico) (Sá, Moreno & Carciofi, 2019).

Além do seu valor nutricional, as proteínas possuem propriedades técnico-funcionais que são essenciais para a produção e processamento de alimentos, pois são capazes de formar estruturas complexas e, assim, fornecer base estrutural para os alimentos, além de influenciar suas características sensoriais (Omura et al., 2021; Oliveira et al., 2020). As propriedades técnico-funcionais das proteínas alimentares são importantes no processamento de alimentos e incluem capacidade de retenção de água e de gordura, capacidade de formar espumas e emulsões e formação de gel (Boye et al., 2010). Essas propriedades estão fortemente relacionadas às suas características físico-químicas, como o balanço hidrofílico/hidrofóbico de sua superfície molecular (Omura et al., 2021). De forma geral, as proteínas de origem vegetal não têm o mesmo desempenho técnico-funcional que aquelas de origem animal, mas são preferíveis por um nicho de mercado já grande e ainda em expansão, pelas razões já comentadas no parágrafo anterior. Além disso, já foi demonstrado que há diferentes abordagens tecnológicas para melhorar as propriedades técnico-funcionais de proteínas e que são aplicáveis também àquelas de fontes vegetais, como por exemplo processamento ultrassônico, tratamentos enzimáticos e a utilização de calor (Nasrabadi, Doost & Mezzenga, 2021, Sá, Moreno & Carciofi, 2019; Sá, Moreno & Carciofi, 2020).

Algumas fontes de proteínas vegetais já vêm sendo amplamente utilizadas na produção de alimentos para o consumo humano. As proteínas da soja são um grande exemplo de proteínas de fonte vegetal que já são extensivamente processadas e consumidas, fazem parte da formulação de um grande portfólio de alimentos e possuem ótima qualidade nutricional e características técnico-funcionais (Sá, Moreno & Carciofi, 2020). As proteínas da ervilha também têm ganhado destaque da indústria devido a sua composição aminoacídica e suas

propriedades técnico-funcionais, além de possuir baixa alergenicidade (Stone, et al., 2015a; Oliveira et al., 2020). Outra fonte de proteínas vegetais é o arroz, que é uma das principais culturas destinadas à produção de alimentos no mundo, com alta produção, tornando disponível uma grande quantidade de proteínas com boas características nutricionais, porém com características técnico-funcionais limitadas, principalmente devido a sua baixa solubilidade (Omura et al., 2021; Amagliani et al., 2017). Há uma tendência na pesquisa por novas fontes vegetais que têm demonstrado potencial para produção de proteína de alta qualidade nutricional e tecnológica, como leguminosas, cereais, sementes, folhas, nozes entre outras (Sá, Moreno & Carciofi, 2020).

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira nativa do Brasil com alta produtividade de óleo (Ciconini et al., 2013). O fruto da macaúba é obtido principalmente pelo extrativismo e sua parte comestível é composta pela polpa e amêndoa. Alguns componentes que se destacam na composição da macaúba são os minerais, a fibra alimentar e proteínas (Munhoz et al., 2018; Coimbra e Jorge, 2011; Hiane et al., 2006a). A amêndoa da macaúba possui um alto valor nutricional e a torta obtida na extração do seu óleo é rica em fibra alimentar e proteínas, além de possuir compostos bioativos como os compostos fenólicos e os tocoferóis (Andrade, et al., 2020). De acordo com Andrade et al. (2020), a torta da amêndoa da macaúba apresenta alta capacidade antioxidante e é capaz de favorecer o crescimento de microrganismos probióticos e como consequência a produção de ácidos graxos de cadeia curta como ácido láctico, propiônico, butírico e acético, capazes de promover benefícios à saúde. Portanto, a utilização da torta da amêndoa da macaúba pode ter grande potencial para aplicações em formulações alimentícias, podendo melhorar seu valor nutricional, como foi demonstrado por Silveira et al. (2014). Os autores substituíram parcialmente (30% e 70%) a farinha de trigo pela torta de amêndoa de macaúba na fabricação de biscoito tipo cookie e observaram que houve aumento do teor de fibras, minerais e proteínas nas novas formulações. Além disso, os cookies tiveram melhor aceitação sensorial e maior intenção de compra.

As proteínas da amêndoa da macaúba apresentam digestibilidade *in vitro* semelhante à caseína, e ainda, essas proteínas são fontes dos aminoácidos essenciais, pois são ricas em metionina, cisteína, valina e leucina (Hiane et al., 2006b, Silva et al., 2021). Além disso, a amêndoa não apresenta níveis detectáveis de fatores antinutricionais (Hiane et al., 2006b). Devido ao potencial como fonte de proteínas demonstrado pela amêndoa de macaúba, é interessante conhecer suas propriedades técnico-funcionais para potencializar sua utilização na produção de alimentos, uma vez que não foram encontrados na literatura, até o momento em que se redige este trabalho, publicações relatando a obtenção e caracterização de isolado

proteico de amêndoa da macaúba. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é obter e avaliar, pela primeira vez, as propriedades físico-químicas e técnico-funcionais de isolado proteico da amêndoa de macaúba para promover seu uso na formulação de alimentos, contribuindo assim para a valorização da macaúba, uma palmeira nativa do Brasil e potencial fonte de proteínas.

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Proteínas de origem vegetal**

A alimentação humana adequada depende da ingestão de diversos nutrientes, como as proteínas. Esses nutrientes são fontes dos aminoácidos essenciais, que são os principais elementos que contêm nitrogênio e compostos estruturais das proteínas do corpo humano. Portanto, a qualidade nutricional das proteínas é caracterizada pela sua capacidade de satisfazer as necessidades metabólicas de aminoácidos, que por sua vez está relacionada com a sua composição de aminoácidos, digestibilidade e, ainda, a biodisponibilidade desses aminoácidos (Sá, Moreno & Carciofi, 2019, Sá, Moreno & Carciofi, 2020).

A busca por novas fontes de proteínas para a utilização em alimentos exige que essas proteínas tenham características importantes para a sua utilização, como ser facilmente digeridas, não possuir toxicidade, tenham utilidade funcional e possam ser obtidas em abundância (Damodaran, 2005). As proteínas animais, tradicionais fontes dos aminoácidos essenciais, apresentam alta qualidade nutricional (Pires, et al., 2006). Apesar disso, existem desvantagens em relação a elas, como custos crescentes, associação com mudanças climáticas, alto consumo de recursos naturais e impactos na biodiversidade (Alemayehu, Bendevis & Jacobsen, 2015; Cam & Mejia, 2012; González, Frostell & Carlsson-Kanyama, 2011).

O mercado global das proteínas vegetais é segmentado por três principais produtos: os isolados, concentrados e farinhas proteicas (Foods, et al., 2020). É esperado que esse mercado cresça a taxa anual composta de 6,2% durante o período de 2019 a 2027 devido à crescente procura por alimentos à base de plantas e ricos em proteínas por parte do aumento do estilo de vida vegano (Foods et al., 2020). Com isso o mercado das proteínas atrai investimentos de grandes empresas no setor como na produção de proteína da ervilha, um dos principais ingredientes de hambúrgueres veganos e outros substitutos da carne (Fernandes, 2019). Além da produção de extratos hidrossolúveis vegetais, que são alternativas importantes para intolerantes à lactose ou com alergia à proteína do leite de vaca (Alejandro et al., 2011).

A digestibilidade juntamente com a composição dos aminoácidos essenciais são considerados fatores determinantes para avaliar a qualidade nutricional das proteínas. A digestibilidade é um indicador geral de sua qualidade nutricional e está relacionada com a sua estrutura química e a presença de compostos antinutricionais (Millward, et al., 1999 & Pires et al., 2006). A digestibilidade das proteínas vegetais é geralmente menor quando comparada às dos animais devido a presença de inibidores de protease, fitatos, taninos, etc., que podem reduzir a digestibilidade das proteínas no corpo humano. Essa menor digestibilidade pode ser vantajosa quando se busca alimentos com maior saciedade, mas com restrições calóricas. Além disso, a presença de taninos ligados às proteínas, por exemplo, aumenta a capacidade antioxidante do alimento consumido (Velickovic & Stanic-Vucinic, 2018; Sá, Moreno & Carciofi, 2020). A conformação da proteína também tem influência em sua digestibilidade, uma vez que pode dificultar o acesso de enzimas digestivas que realizam sua hidrólise (Sá, Moreno & Carciofi, 2019; Sá, Moreno & Carciofi, 2020).

As proteínas de fontes vegetais apresentam limitações em relação à composição nutricional por não possuir todos os aminoácidos essenciais em sua composição se tornando o fator que mais limita seu uso como única fonte de proteína para nutrição humana (Pires, et al., 2006). Apesar de serem reconhecidas como nutricionalmente inferiores às de fontes animais, ainda sim desempenham um papel muito valioso na nutrição humana e com uma alimentação balanceada e diversificada é possível satisfazer as necessidades de consumo de aminoácidos do corpo humano (Alves et al., 2020).

Por outro lado, as proteínas de fontes vegetais estão acompanhadas de fibras, carboidratos, oligossacarídeos e ácidos graxos poliinsaturados, enquanto as proteínas animais, principalmente provenientes de carne vermelha, estão associadas ao consumo de gorduras saturadas (Pires et al., 2006). Além disso, o consumo de proteínas derivadas de plantas está associado com a diminuição de doenças cardiovasculares, diabetes Mellitus tipo II, obesidade e colesterol de baixa densidade, pois essas proteínas podem estar ligadas com taninos e outros compostos fenólicos, que possuem propriedades bioativas, enquanto as proteínas animais tendem a aumentar o risco dessas doenças devido ao perfil lipídico (Guasch-Ferré et al., 2019).

Com a finalidade de explorar as propriedades nutricionais, potenciais de utilização, benefícios nutricionais e aplicações tecnológicas das potenciais fontes de proteínas vegetais existem diversas pesquisas envolvendo legumes, cereais, pseudocereais, sementes, folhas e brotos, amêndoas e nozes e subprodutos agroindustriais (Sá, Moreno & Carciofi, 2020).

A produção de óleos a partir de sementes gera coprodutos ricos em carboidratos e proteínas que quando processadas adequadamente podem ser utilizados para a alimentação

humana. Dentre essas sementes, as principais são soja, canola, algodão, amendoim e girassol que quando processados disponibilizam uma proporção bastante elevada de farinhas proteicas. Existem também culturas oleaginosas alternativas de uso crescente na produção de óleos especiais que têm sido registradas como: semente de sésamo, uva, abóbora, cannabis, avelãs e nozes. Com o crescimento da produção de oleaginosas para a produção de óleos vegetais torna disponível um grande volume de subprodutos com grande potencial para produção de proteínas vegetais (Rodrigues, Coelho & Carvalho, 2012; Kochhar, 2011)

A soja é uma semente oleaginosa com alto teor de proteínas (~40%) e já é extensivamente processada e utilizada na alimentação humana. Sua digestibilidade é considerada boa já que se iguala as proteínas provenientes do leite, ovo e carne e os produtos produzidos a partir da proteína de soja consistem em produtos com alto teor de proteínas de boa qualidade quando comparado com outras fontes vegetais, já que possuem em sua constituição todos os aminoácidos essenciais requeridos para o corpo humano (Singh et al., 2008). Além disso, devido às suas propriedades tecno-funcionais é possível produzir produtos com boas características sensoriais, como os produtos análogos a carne, pães, bebidas, molhos, sopas e o extrato de soja conhecido popularmente como “leite de soja” que é uma alternativa importante para pessoas com intolerância à lactose ou alergia à proteína do leite de vaca (Alejandro, et al., 2011).

A ervilha, que também é uma leguminosa, é uma interessante fonte de proteínas pois possui alto teor desses nutrientes com perfil de aminoácidos essenciais complementares aos dos cereais (Lam et al., 2016). Os ingredientes alimentares que utilizam a ervilha em sua composição também são atraentes para a indústria devido à sua baixa alergenicidade, valor nutritivo e status de não geneticamente modificado. Os isolados proteicos da ervilha também são capazes de estabilizar emulsões e possuir propriedades de formação de espuma semelhante à soja, portanto, as aplicações desses isolados na indústria alimentar pode incluir bebidas, molhos, molhos para salada e produtos assados (Stone, et al., 2015b).

Já os cereais são cultivados em grandes quantidades e muito importantes para o consumo humano, além de serem, também, fontes de proteínas, como o arroz e o milheto. No caso do arroz, apesar de possuir baixo teor de proteínas, aproximadamente 7%, sua produção é consideravelmente elevada o que resulta em uma grande quantidade de proteínas disponíveis (Sá, Moreno & Carciofi, 2020; Kawakatsu & Takaiwa, 2019). O arroz faz parte da alimentação básica e importante fonte de proteínas em diversos países e devido ao interesse no processamento de proteínas vegetais nos últimos anos, ingredientes enriquecidos com proteínas

do arroz se tornaram disponíveis, apesar de que a aplicação das proteínas intactas do arroz ser limitada devido à sua baixa solubilidade em água (Amagliani, et al., 2017).

As nozes também são promissoras fontes de proteínas que podem ser utilizadas na produção de bebidas e emulsões devido a seus perfis nutricionais favoráveis à saúde do consumidor, assim como as castanhas, amêndoas e avelã (Qamar, et al., 2019). De acordo com o trabalho de Sze-Tao & Sathe (2000) isolado proteico da amêndoa (*Prunus dulcis* L.) possui características de formação de espuma, capacidade de absorção de óleo e de formar emulsão maior que os isolados proteicos de soja. Além disso, segundo os mesmos autores, o isolado proteico da amêndoa apresenta baixa viscosidade em altas concentrações, característica ideal para produção de bebidas ricas em proteínas sem alterar drasticamente sua viscosidade.

Como já foi discutido, existem diversas fontes alternativas de proteínas com diversas vantagens em relação às proteínas animais como: preço, sustentabilidade e benefícios à saúde. Esses fatores evidenciam o potencial para aplicação na produção de alimentos que utilizem essas proteínas (Fasolin et al., 2019). Além de seu efeito nutricional, as proteínas também podem atuar como agentes emulsificantes, gelificantes, espumantes, entre outras aplicações tecnológicas em alimentos. Todas essas características têm despertado o interesse de pesquisadores, empresas e de consumidores em relação a utilização e consumo dessas proteínas (Pedrosa et al., 2020; Menegotto et al., 2019).

O aumento do teor de proteínas vegetais em alimentos pode ser realizado por meio da incorporação em farinhas. As massas são tidas como interessantes para a incorporação de farinhas de leguminosas, uma vez que a associação desses produtos em um único alimento aumenta seu conteúdo de proteína e se beneficia de seus perfis de aminoácidos essenciais complementares (Boire et al., 2018). Os isolados ou concentrados proteicos são utilizados em diversos alimentos com finalidades de melhorar suas propriedades funcionais ou como substitutos da proteína animal em formulações (Boye, et al., 2010; Garcia-Vaquero, Lopez-Alonso & Hayes, 2016).

## **2.2. Propriedades físico-químicas e técnico-funcionais das proteínas em alimentos**

As proteínas desempenham papel fundamental na nutrição humana, mas para a produção de alimentos existem outras funções que vão além do seu papel como nutriente. Os alimentos possuem variadas proporções de proteínas com diferentes propriedades, portanto, além de fornecer os aminoácidos essenciais ao funcionamento do organismo humano, as proteínas fornecem a base estrutural para vários alimentos (Sá, Moreno & Carciofi, 2020). As

propriedades técnico-funcionais das proteínas alimentares são importantes no processamento de alimentos e incluem capacidade de retenção de água e de gordura, capacidade de formar espumas e emulsificação, espessamento e formação de gel (Omura et al., 2021; Amagliani et al., 2017). Estas propriedades influenciam nas características sensoriais dos alimentos, que são fundamentais na fabricação de alimentos como produtos de confeitaria, bebidas, molhos e produtos de carne (Boye, et al., 2010).

As características físico-químicas desempenham papel fundamental nas propriedades técnico funcionais das proteínas, sendo a solubilidade uma das características mais importantes, já que muitas das suas propriedades funcionais dependem de sua capacidade de inicialmente entrar em solução (Chiang, Shih & Chu, 1999). De acordo com o trabalho realizado por Chiang, Shih & Chu (1999), o isolado proteico de soja apresenta baixa solubilidade entre o pH 4 e 5 e à medida que os valores de pH se afastam dessa faixa, a solubilidade das proteínas aumenta. No trabalho de Menegotto et al. (2019), foi encontrado perfil de solubilidade semelhante para o concentrado proteico *Spirulina platensis*, que apresentou solubilidade mínima (3,23%) a pH 3 e máxima (98,07%) ocorreu a pH 9. A baixa solubilidade das proteínas nessa faixa de pH é pelo fato que esses valores estão próximos do ponto isoelétrico, demonstrando sua dependência do pH do meio (Omura et al., 2021).

O ponto isoelétrico das proteínas é o valor de pH no qual, quando em solução, o somatório algébrico das cargas elétricas é igual a zero e é utilizado na obtenção de isolados a partir de farinhas desengorduradas ricas em proteínas. Nesse processo, a farinha é dispersa em solução aquosa, o pH ajustado para alcalino, a solução é então centrifugada e os carboidratos são separados por diferença de solubilidade. O pH do sobrenadante é ajustado para o ponto isoelétrico da proteína, que minimiza sua dispersibilidade em meios aquosos, e então é centrifugado e se obtém o isolado proteico (Pedrosa, et al., 2020). Utilizando esse método, Karki, et al., (2009) obtiveram um produto com 89% de proteínas de soja. Também utilizando esse método, Pedrosa et al. (2020), obtiveram material proteico de feijão com concentração de 75,42% de proteínas.

De modo geral, as proteínas possuem grupos hidrofóbicos e hidrofílicos e esses grupos estão espalhados aleatoriamente por toda a sua estrutura. A quantidade dos grupos hidrofóbicos pode ser quantificada pelo índice de superfície hidrofóbica exposta, que está diretamente correlacionado à proporção de grupos na superfície das moléculas de proteínas em contato com o ambiente aquoso. Esse índice também está relacionado com a capacidade de interação com água e com óleo das proteínas e afeta várias de suas propriedades técnico funcionais (Omura et al., 2021, Téllez-Morales, et al., 2020).

A capacidade das proteínas de interagir com água ou com óleo é um fator importante para a indústria de alimentos, pois afeta propriedades de sabor e textura. A interação com a água ou óleo está relacionada com fatores intrínsecos das proteínas, como a composição de aminoácidos, conformação e hidrofobicidade (Chiang, Shih & Chu, 1999; Karki et al., 2009). Alta capacidade de retenção de água ajuda a manter o frescor e a sensação de umidade na boca e têm sido associados a redução da perda de umidade em alimentos, além de ser desejável em alimentos viscosos como carnes, molhos e produtos assados pois agem como espessantes e mantêm a viscosidade. Já a capacidade de interação com óleo está relacionada com retenção de flavor e melhor a palatabilidade dos alimentos, além disso, a capacidade da proteína de ligar a óleos é muito importante quando se substitui a carne e é um requisito na produção de salsichas maionese e molhos para saladas (Chandi, & Sogi, 2007; Garcia-Vaquero, Lopez-Alonso & Hayes, 2016). No trabalho de Amirshaghghi et al. (2017), foi observado que uma grama de isolado proteico de amêndoa selvagem foi capaz de absorver 2,3 g de água e 3,5 g de óleo.

As emulsões são formadas devido a presença dos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos e a atividade emulsificante depende da natureza e concentração dessas proteínas, mas também pode ser afetado por outros fatores como pH, tamanho da gotícula formada, tensão superficial, viscosidade, tipo de óleo, presença de sais e temperatura do pré-tratamento (Chandi & Sogi, 2007). No trabalho realizado por Karki et al. (2009), o isolado proteico de soja extraído por precipitação isoelétrica obteve capacidade de formar emulsões de 445 g de óleo/g proteína em pH 7.0. No trabalho realizado por Omura et al., (2020), o isolado proteico de soja alcançou índice de atividade emulsificante de  $122.9 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  enquanto o concentrado proteico de ervilha foi de  $135.9 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  e o isolado proteico de arroz foi o que apresentou os menores valores de atividade emulsificante, de  $58.7 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ . A maior atividade emulsificante observada para algumas proteínas, como as proteínas da ervilha e da soja, ocorre devido a capacidade delas estabilizarem, à curto prazo a emulsão por ações interfaciais uma vez que possuem uma maior concentração de aminoácidos hidrofóbicos na superfície da molécula e estrutura mais flexível (Pedrosa, et al., 2020).

As espumas alimentares, assim como as emulsões também são dispersões, mas que envolvem gases, geralmente ar, em uma fase contínua, geralmente água. Elas fornecem estruturas e textura para uma variedade de alimentos como chantilly, sorvetes, bolos, mousses e marshmallows (Damodaran, 2005). As proteínas podem ser utilizadas como agentes espumantes contribuindo para a formação e estabilidade da estrutura através da redução da tensão superficial entre as duas fases, mas o mais importante é a capacidade de diminuir essa tensão rapidamente, o que contribui para uma maior espumabilidade (Foegeding & Davis,

2011). De acordo com o Boye et al. (2010), a capacidade de formar espumas de concentrados proteicos de lentilha, grão de bico e ervilha variaram de 98% a 106% (v/v). Já Pedrosa et al. (2020) encontraram menor capacidade de formar espumas para os isolados proteicos de ervilha (74%) e de feijão (47%) (v/v). Os mesmos autores destacaram que essas proteínas poderiam ser utilizadas como agentes espumantes na elaboração de sorvetes, merengues, bolos e sobremesas.

A capacidade das proteínas alimentares de formar géis ao passarem por aquecimento é uma propriedade funcional importante no processamento e produção de alimentos. A gelificação ocorre quando as proteínas formam uma rede tridimensional que é resistente ao fluxo sob pressão (Boye, et al., 2010). O processo de formação de gel por proteínas pode ser induzido por tratamentos físicos (calor e pressão), enzimáticos e químicos. Na maioria das vezes, a gelificação ocorre, pois as proteínas sofrem desdobraimento e exposição dos grupos sulfídricos e da região interna não polar e a formação de agregados através de interações moleculares que retém água nos interstícios de sua estrutura. Essa estrutura se mantém estável através de interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio ou por ligações covalentes (Le, Rioux & Turgeon, 2017, Téllez-Morales, et al., 2020).

Para que seja formado gel é necessária uma concentração mínima de proteínas e tal concentração é específica para cada material proteico, sendo influenciado pelas suas características estruturais e condições de gelificação (Omura, et al. 2020). De acordo com o trabalho realizado por Omura, et al. (2020), para que seja formado gel a partir do isolado proteico de soja e do concentrado proteico de ervilha é necessária uma concentração mínima de 15% (m/v), já para o isolado proteico de arroz essa concentração é bem mais alta, de 35% (m/v) para que fosse formado gel. As características funcionais desses géis, como a elasticidade e capacidade de retenção de água, dependem de vários fatores. Dentre eles, podemos citar, as características intrínsecas das proteínas, a concentração, pH da solução e o tipo e condições do processo realizado para se obter o gel (Le, Rioux & Turgeon, 2017).

### **2.3. Macaúba (*Acrocomia aculeata*)**

A macaúba é uma palmeira arborescente (Figura 1) pertencente à família *Arecaceae*. Nativa de florestas tropicais, pode atingir alturas superiores a 20 m, o estipe varia de 20 a 30 cm de diâmetro (Mota et al., 2011; Teles et al., 2011). O caule apresenta variações em suas características, como a presença ou ausência de pecíolos e espinhos. Os espinhos são normalmente encontrados nas palmeiras mais jovens, entretanto algumas palmeiras possuem espinhos devido a fatores genéticos (Ciconini et al., 2013). A inflorescência ocorre entre as

folhas em cachos que chegam a medir 130 cm de comprimento, onde são formados os frutos (Mota et al., 2011).

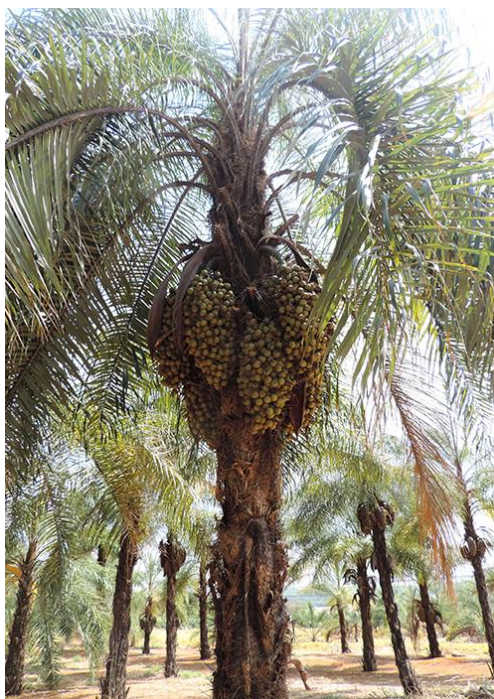


Figura 1: Palmeira de macaúba. Fonte: [www.douradosagora.com.br](http://www.douradosagora.com.br)

A macaúba apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo na América tropical e subtropical, desde o sul do México e Antilhas até o sul do Brasil, chegando ao Paraguai e Argentina (Henderson et al., 1995; Scariot et al., 1995). No Brasil sua espécie é encontrada nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e regiões centro oeste, nordeste e norte do Brasil (Amaral et al., 2011), ocorrendo uma grande variabilidade nas características genótípicas das plantas, que sugere um forte efeito do ambiente e do solo sobre suas características (Ciconini et al., 2013).

Os frutos da macaúba são dispostos em cachos e cada planta produz uma quantidade variável com alto coeficiente de variação, produzindo em média de 3 a 4 cachos por ano, mas pode chegar a 7. O desenvolvimento de seus frutos ocorre normalmente no fim do período chuvoso, completando seu desenvolvimento no período da seca. A safra ocorre entre os meses de setembro e março (Mota et al., 2011; Ciconini et al 2013).

Sanjinez-Argandoña et al. (2011) verificaram que a produtividade da macaúba pode alcançar média anual por planta de 44,24 kg de mesocarpo e 9,25 kg de amêndoa e por hectare de 8848 kg e 1904 kg de mesocarpo e de amêndoa respectivamente, sugerindo que a exploração da macaúba de maneira sustentável pode ser economicamente viável por sua característica de alta produtividade e com alto rendimento de polpa quando comparado com a produção de outras

palmeiras. Ciconini et al. (2013) concluíram que plantas provenientes do bioma cerrado tem maior produção, em relação ao peso dos frutos, que plantas do bioma pantanal.

Como uma das principais palmáceas com potencial para produção de óleo vegetal, no Brasil, o fruto da macaúba é principalmente obtido do extrativismo (Teles et al., 2011), contudo, existem vários autores que mencionam haver plantações com intuito de produção de frutos. A alta qualidade do seu óleo inclusive para fins alimentícios, faz com que a demanda cresça acima da oferta, evidenciando seu baixo risco associado ao investimento (Pimentel et al., 2011).

O fruto da macaúba é caracterizado como uma drupa comestível de formato globular que apresenta coloração que pode variar de amarelada a amarronzada quando maduro, e diâmetro varia de 2,5 a 5 centímetros, além disso, são constituídos por epicarpo cartáceo que é a casca, mesocarpo que representa a polpa e o endocarpo que contém a amêndoa (Almeida et al., 1998; Ciconini et al., 2013). É possível visualizar na figura 2 as características do fruto de das partes que o compõem.

O mesocarpo apresenta coloração que varia de amarelo a esbranquiçado e é comestível, caracterizado como fibroso e mucilaginoso com alto teor de lipídeos estando intimamente ligada ao endocarpo, estrutura essa rígida e de cor negra que por sua vez abriga a semente, uma amêndoa oleaginosa recoberta por tegumento (Ciconini et al., 2013; Farias et al., 2010). A porção comestível do fruto é representada por 48% de sua massa total que compõe em conjunto o mesocarpo e a amêndoa sendo consumido, principalmente em sua forma *in natura* (Ramos et al., 2008; Ciconini et al., 2013).

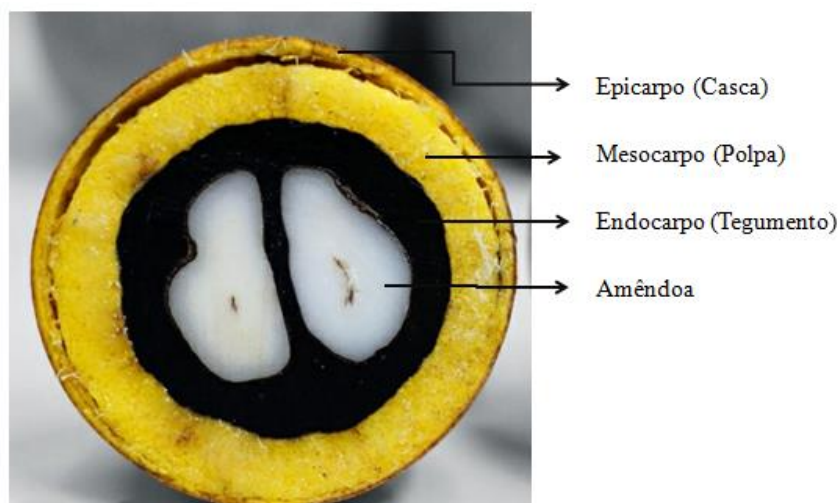


Figura 2. Fruto da *Acrocomia aculeata*. Fonte: Adaptado de <http://www.portalmacauba.com.br>

Os frutos da macaúba possuem características variadas de acordo com sua região de cultivo, espécies, características do solo e clima (Ciconini et al., 2013). Farias et al. (2010) ao

analisar frutos encontrados no cerrado Piauiense verificaram que frutos de macaúba possuem em média de peso de 21,5 gramas. Já Ciconini et al. (2013) ao analisarem frutos dos biomas do cerrado e pantanal mato grossenses encontraram peso médio de 19,21 gramas, foi observado também que o peso dos frutos variou de 12,7 a 58,3 g evidenciando a grande variação dessa característica. Os mesmos autores verificaram que frutos provenientes do cerrado do Mato Grosso mostram maior proporção de mesocarpo do que frutos do pantanal desse mesmo estado e com proporções inversas para a amêndoa. Os frutos da macaúba são compostos por cerca de 21% de epicarpo (casca), 38% de mesocarpo (polpa carnosa), 34% de endocarpo e 7% de endosperma (amêndoa), podendo variar conforme o local da produção (Gargnin et al., 2008; Nucci et al., 2008).

### *2.3.1. Composição química da macaúba*

A polpa destaca-se pelo alto valor nutricional, alto teor de açúcares, lipídios, carotenoides e minerais, com isso pode ser usada para enriquecimento de dietas e assim valorizar espécies nativas do Brasil (Aguilera et al., 2018). Descrita com características sensoriais agradáveis, gosto doce e saboroso, além das características relacionadas com potencial antioxidante, anti-inflamatório e antidiabética (Ramos et al., 2008). Essa polpa pode ser utilizada para várias finalidades na produção de alimentos, como ingredientes em doces, geleias, bolos, biscoitos e barras de cereais resultando em produtos ricos em  $\beta$ -caroteno, fibras e com características de um produto de baixa acidez, com excelentes níveis de compostos bioativos, especialmente o  $\beta$ -caroteno e vitamina A (Coimbra & Jorge 2012).

A composição da polpa apresenta grande variação, sendo os teores de umidade e de lipídeos como os de maior variabilidade (Ciconini et al., 2010). Deve-se destacar que o teor de água varia de acordo com o tempo da coleta ou se o fruto passou por processo de secagem (Pimenta et al., 2012). A polpa da macaúba caracteriza-se como rica em lipídios, principalmente os insaturados, portanto com alto potencial para a produção de óleo para diversas finalidades, como a indústria de alimentos, cosméticos, farmacêutica e de combustíveis. Além disso, esse óleo apresenta em sua composição alto teor de compostos bioativos como os carotenóides e tocoferóis (César et al., 2015). A polpa apresenta alto teor de fibras alimentares e de acordo com Coimbra e Jorge (2012) o consumo de 100 g corresponde, em média, a 80% da ingestão diária de fibras indicada, demonstrando que o consumo regular desse alimento pode trazer benefícios à saúde humana. Além disso, é rica em lipídios e carboidratos e pode fornecer aproximadamente 21% das necessidades calóricas de um adulto quando consumidos 100

gramas diariamente (Munhoz et al., 2018). A composição centesimal da polpa e da amêndoa de macaúba está indicada na tabela 1.

Tabela 1: Faixas de composição centesimal da polpa e amêndoa da macaúba (base úmida).

	<b>Polpa</b>	<b>Amêndoa</b>
<b>Umidade (%)</b>	5,98 - 49,20	4,97 - 12,10
<b>Lipídeos (%)</b>	28,49 - 30,38	46,06 - 55,55
<b>Cinzas (%)</b>	2,17 - 3,26	1,99 - 2,08
<b>Proteínas (%)</b>	3,34 - 6,72	17,60 - 28,61
<b>Fibra alimentar (%)</b>	20,26 - 24,30	5,81 - 7,59
<b>Carboidratos (%)</b>	32,96 - 36,22	12,49 - 17,23

Fonte: Monhoz et al., 2018; Coimbra e Jorge, 2011, Hiane et al., 2006a, Hiane et al., 2006b.

Como pode-se observar na tabela 1, a amêndoa da macaúba se destaca pelo conteúdo de proteínas, lipídeos, fibras e minerais (Grande & Cren, 2016; Munhoz et al., 2018). A torta pode ser triturada, transformada em farinha e utilizada diretamente para enriquecer formulações alimentares, pois possui alta qualidade nutricional já que é rica em fibras e proteínas, podendo também melhorar as características sensoriais desses produtos (Dessimoni-pinto et al., 2010). Com isso pode ser usada como fonte de matéria-prima para a extração de óleo e de proteínas e ao contrário das sementes de leguminosas, não possui em sua composição inibidores de proteases, característica importante e vantajosa em termos de digestibilidade (Hiane et al., 2006b).

De acordo com Hiane et al. (2006b), as proteínas da amêndoa da macaúba são compostas principalmente de globulinas e glutelinas compondo 53,5% e 40,0% da concentração total de proteínas respectivamente. Ainda segundo os autores, as proteínas da amêndoa da macaúba apresentam bom nível de digestibilidade *in vitro* em comparação com o padrão de caseína, e ainda essas proteínas são fontes de alguns dos aminoácidos essenciais, pois são ricos em metionina, cisteína, valina e leucina, o que aumenta o valor nutricional delas. Além de sua

composição em nutrientes, a amêndoa não apresenta níveis detectáveis de fatores antinutricionais, que quando ingeridos causam efeitos fisiológicos adversos (Hiane et al., 2006b).

A partir do fruto da macaúba são obtidos dois tipos de óleos, o óleo do mesocarpo que é caracterizado pela alta concentração de ácido oleico e cor laranja intensa que indica uma alta concentração de carotenóides, e o óleo extraído da amêndoa, que possui aspecto transparente e predominância dos ácidos graxos láurico e oléico. (Ciconini et al., 2013; Munhoz et al., 2018). A composição dos ácidos graxos dos óleos extraídos da polpa e da amêndoa da macaúba está indicada na tabela 2. O óleo extraído da polpa é caracterizado por predominância de ácidos graxos insaturados, que de acordo com a literatura representa de 56,84% a 75,00% do total, portanto, pode ser classificado como monoinsaturado já que é composto por mais de 50% de ácidos graxos dessa classe (56,84% a 75,00%) (Coimbra & Jorge, 2012; Lescano et al., 2015).

Tabela 2: Faixas de composição dos ácidos graxos em óleos extraídos do mesocarpo e da amêndoa dos frutos da *Acrocomia aculeata*. Teores máximos e mínimos encontrados na literatura.

Ácidos Graxos	Óleo da polpa	Óleo extraído da amêndoa
<b>C8:0</b>	-	3,10 - 5,22
<b>C10:0</b>	-	2,79 - 4,56
<b>C12:0</b>	0,10 - 1,56	32,58 - 44,14
<b>C14:0</b>	0,10 - 0,49	8,45 - 13,40
<b>C16:0</b>	12,18 - 24,60	6,57 - 9,20
<b>C16:1</b>	1,36 - 4,80	-
<b>C18:0</b>	1,08 - 3,30	2,11 - 3,40
<b>C18:1n-9</b>	52,57 - 67,07	18,70 - 36,27
<b>C18:2n-6</b>	2,70 - 13,80	3,00 - 3,82
<b>C18:3n-3</b>	1,40 - 2,60	-

Fonte: Lieb et al., 2019; Amaral, et al., 2011; Coimbra e Jorge, 2011.

O óleo extraído da polpa da macaúba caracteriza-se como um perfil considerado ideal para óleos comestíveis pois apresenta o ácido oleico (18:1 n-9) como componente mais abundante (52,57 a 67,07% (Coimbra & Jorge, 2012; Lieb et al., 2019)). O óleo extraído da amêndoa macaúba é composto predominantemente por ácidos graxos saturados (59,92-77,80%), com o ácido láurico (C12:0) como o componente mais abundante (32,58 e 44,14%). Devido à composição, o óleo da amêndoa da macaúba apresenta valor econômico no mercado dos óleos insaturados para as indústrias de cosméticos e farmacêuticas (Amaral, et al., 2011).

Além do alto conteúdo de óleo e proteínas, a amêndoa também se destaca pelo elevado conteúdo de magnésio, cobre e zinco com concentrações iguais a 24.3, 11.1 e 30.9 µg/g respectivamente (tabela 3), além disso as amêndoas da macaúba são mais ricas em cálcio (94,3

mg / 100 g), fósforo (537,5 mg / 100 g) e manganês (24,3 µg / g) do que as castanhas de caju ou coco fresco (Hiane et al., 2006a). A polpa da macaúba apresenta em sua composição uma grande quantidade de minerais, podemos destacar como um alimento com alto teor de cálcio, magnésio, zinco e cobre, além disso, pode ser considerada como fonte de ferro e manganês (Munhoz et al., 2018). A biodisponibilidade desses nutrientes é importante, já que a porcentagem bio acessível pode ser aumentada ou diminuída de acordo com as interações durante a digestão (Gonçalves et al., 2020).

Tabela 3: Composição de minerais (base úmida) da polpa e da amêndoa do fruto da macaúba

<b>Minerais (mg/100g)</b>	<b>Polpa</b>	<b>Amêndoa</b>
<b>Cálcio (mg/100g)</b>	61,96	94,30
<b>Magnésio (mg/100g)</b>	-	207,00
<b>Fósforo (mg/100g)</b>	36,78	537,5
<b>Potássio (mg/100g)</b>	766,37	377,2
<b>Cobre (µg/g)</b>	2,43	11,13
<b>Manganês (µg/g)</b>	1,38	24,33
<b>Ferro (µg/g)</b>	7,81	-
<b>Zinco (µg/g)</b>	6,02	30,93
<b>Sódio (µg/g)</b>	-	21,41
<b>Iodo (µg/g)</b>	-	32,91
<b>Iodo (µg/g)</b>	-	32,91

Fonte: Hiane et al.,2006a, Ramos et al.,2008.

Em relação aos compostos bioativos, o óleo de polpa é mais rico em carotenóides (300,01 mg/kg) e tocoferóis (212,95 mg/kg), enquanto o óleo da amêndoa se destaca pelo maior teor de compostos fenólicos (4,38 mg EAG/g) (Coimbra & Jorge, 2012). Os dados referentes à

composição de compostos bioativos de óleos extraídos da polpa e amêndoa de macaúba estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Composição de compostos bioativos presente nos óleos da polpa e da amêndoa do fruto de macaúba

<b>Compostos bioativos</b>	<b>Polpa</b>	<b>Amêndoa</b>
Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	2,21	4,38
Carotenóides totais ( $\mu\text{g/g}$ )	300,01	1,82
Tocoferóis totais (mg/kg)	212,95	23,10
$\alpha$ – Tocoferol (mg/kg)	143,70	14,35
$\beta$ – Tocoferol (mg/kg)	3,25	0,85
$\gamma$ – Tocoferol (mg/kg)	57,85	-
$\delta$ – Tocoferol (mg/kg)	8,15	7,90

Fonte: Coimbra & Jorge, 2011, Coimbra & Jorge, 2012.

O consumo dos óleos extraídos da macaúba pode trazer efeitos diuréticos e natriuréticos, como propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anticarcinogênicas, anti degenerativas e retardadoras de envelhecimento que estão relacionados com a presença de compostos bioativos em sua composição (Lescano et al. 2015). Como, por exemplo, o  $\beta$ -caroteno que é convertido em vitamina A, desempenhando importante papel nutricional, além da conhecida ação antioxidante desses compostos (Coimbra e Jorge, 2011).

Como foi discutido anteriormente, a macaúba pode ser utilizada com diversas finalidades, mas a sua principal utilização é como fonte de óleo vegetal, devido a sua alta produtividade. Além de fonte de óleo, a amêndoa também demonstra grande potencial como fonte de proteínas vegetais, contudo há poucas informações sobre as proteínas da amêndoa, principalmente suas características físico-químicas e tecno-funcionais, que são essenciais para sua utilização em alimentos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Obter isolado proteico de amêndoa de macaúba, bem como avaliar propriedades físico-químicas e técnico-funcionalidades deste material para fins alimentares, à temperatura de 25°C, a valores de pH 3,5 e 7,0, e sem ajuste na força iônica do meio.

#### **3.1. Objetivos específicos**

- Obter e determinar a composição centesimal da farinha desengordurada de amêndoa de macaúba;
- Obter o isolado proteico da farinha desengordurada da amêndoa de macaúba, pela técnica de precipitação isoelétrica;
- Realizar uma caracterização físico-química do isolado proteico obtido (ponto isoelétrico, perfil de distribuição de massas molares, superfície hidrofóbica e grupos sulfidrilas livres);
- Avaliar propriedades técnico-funcionais do isolado proteico obtido (capacidade de retenção de óleo e de água, propriedades espumantes, emulsificantes e gelificantes), à temperatura de 25°C, a pH 3,5 e 7,0, e sem ajuste na força iônica do meio nos valores de pH 3,5 e 7,0.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Locais de trabalho

As etapas de desenvolvimento deste estudo foram realizadas na empresa Soleá Brasil (obtenção e despêliculamento das amêndoas de macaúba), nos laboratórios do DTA-UFV: Laboratório de Química de Alimentos (obtenção da farinha desengordurada da amêndoa), Laboratório de Estudos de Materiais Alimentares (obtenção e caracterização físico-química e técnico-funcional do isolado proteico da amêndoa de macaúba), Laboratório de Embalagens de Alimentos (análises de potencial  $\zeta$ ), e do DNS-UFV: Laboratório de Análise de experimental (composição centesimal).

### 4.2. Reagentes

O HCl, NaOH, SDS, ácido bórico, ácido sulfúrico, 5.5-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid) e 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), 5.5-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid) (ID 218200) e foram todos utilizados sem purificação adicional. Tampão Tris-HCl  $0,187 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  a pH 6,8; glicerol 50% (v/v), 6,0% (m/v) SDS, 1,0% (m/v) azul de bromofenol, 15,0% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, TrueColor High Range Protein Marker, cromassie azul brilhante, ácido acético, metanol, azida sódica . O óleo de soja (lote: 05 U, Bunge Alimentos, Brasil) de qualidade alimentar, foi comprado em um mercado local. Água deionizada (electrical resistivity next to  $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$ , at  $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Reference A+, Millipore, USA) foi utilizada em todos os experimentos.

### 4.3. Matéria prima

A amêndoa de macaúba utilizada no experimento foi fornecida pela Empresa Soleá Brasil e colhida em Araponga – MG. Após a colheita, os frutos ficaram armazenados durante 10 dias com o objetivo de aumentar o conteúdo de lipídios (Goulart, 2018). Em seguida, foram submetidos ao processo de secagem natural ao sol por 30 dias. O fruto seco passou por processos de separação da casca e mesocarpo em um moinho de martelos desenvolvido especialmente para essa finalidade (Figura 3a). Então foi realizada a separação manual do endocarpo e da amêndoa (Figura 3b).

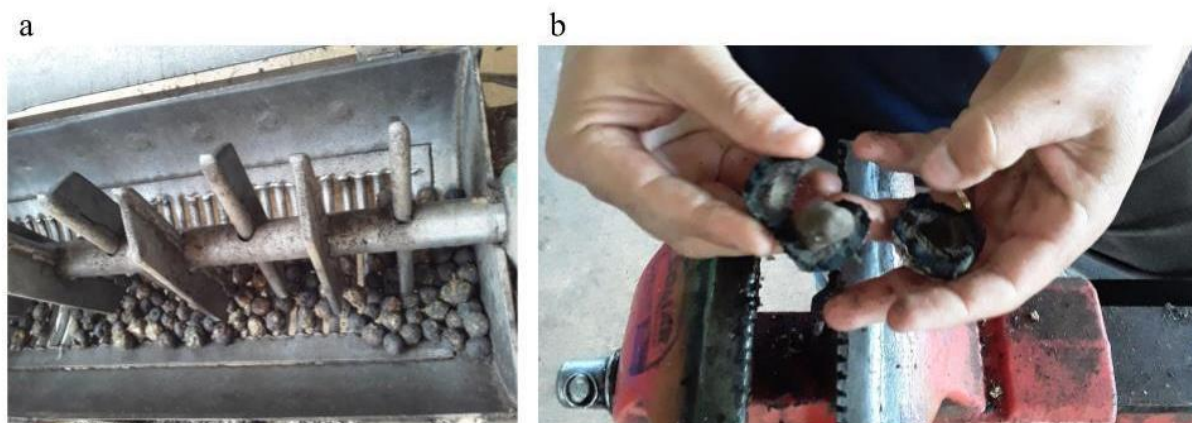


Figura 3: (a) Descascador e despoldador de macaúba e (b) separação manual do mesocarpo e da amêndoa.

### 4.4. Obtenção da farinha desengordurada de amêndoa de macaúba (FDAM)

As amêndoas de macaúba foram parcialmente despeliculadas em descascador elétrico de tubérculo (Figura 4) e em seguida foram submetidas ao branqueamento em água a 80°C, por 10 minutos. Em seguida, foi realizado o resfriamento em água até atingir 18°C. As amêndoas branqueadas foram secas em estufa de circulação de ar a 40°C por 12 h e, após resfriamento, foram armazenadas em freezer a -20°C em recipientes plásticos herméticos até utilização. As amêndoas foram trituradas em Triturador Turratec e passadas em peneiras com tamanho de 60 mesh, constituindo a farinha-base integral (FAI).

O processo de extração dos lipídeos, para a obtenção da FDAM, foi realizado em dois passos, primeiramente a FAI passou por prensagem hidráulica (Laboratory Press, Fred S.

Carver Inc- Summit, New Jersey-USA) e o óleo residual da torta obtida da prensagem foi retirado por extração química utilizando o soxhlet por 8 h e hexano como solvente, de acordo com procedimento padrão descrito pela AOAC (2005).



Figura 4: Descascador de tubérculos industrial elétrico

#### 4.5. Condições para obtenção do isolado proteico da amêndoa de macaúba

Para obtenção do isolado proteico de amêndoa de macaúba (IPAM), foi preparada uma dispersão da farinha desengordurada de amêndoa de macaúba (FDAM) com água Milli-Q na proporção de 1:15, com essa mistura mantida sob agitação magnética (Magnetic Stirrer BS-2H, Lab Science, China) por 1 hora a  $25,0 \pm 0,5$  °C. Em seguida o pH foi ajustado para 9,0 (usando NaOH  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$  ou  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ), seguindo-se a centrifugação do material a 1500g por 30 minutos, a  $25,0 \pm 0,5$  °C (Centrifuge 5430, Eppendorf, Germany). Após a extração alcalina, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e seu pH ajustado de 9,0 até 2,0 de uma em uma unidade de pH (utilizando HCl  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$  ou  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e, em seguida, foi realizada nova centrifugação do material a 1500g por 30 minutos, a  $25,0 \pm 0,5$  °C. O teor de proteínas do sobrenadante foi determinado utilizando a metodologia de Bradford (1976).

Após determinar o valor de pH no qual as proteínas da FDAM são menos solúveis, foi realizada a concentração nas seguintes condições: extração alcalina em pH 9,0 e precipitação isoelétrica em valores de pH próximos a 5. Também foram avaliadas as condições de centrifugação 1500g por 30 minutos e 5000g por 15 minutos, ambas a  $25,0 \pm 0,5$  °C. Além disso, foi utilizada uma peneira (mesh 60) para a retirada de partículas suspensas no material obtido da extração alcalina que poderia aumentar o teor de proteínas no material final. Após a precipitação isoelétrica o material obtido foi lavado por três vezes com água Milli-Q, congelado à -40 °C, liofilizado (Liotop-L101, Liobras, Brazil) e armazenado em potes plásticos opacos

sob refrigeração ( $7,0 \pm 1,0$  °C) até as análises subsequentes. Do material obtido, foram determinados o ponto isoelétrico, por medições do valor do potencial  $\zeta$  das proteínas dispersas em diferentes valores de pH, e o teor proteico, pela técnica de Kjeldahl, utilizando o fator de conversão de 6,25 (Silva et al., 2021).

#### **4.6. Composição centesimal do isolado e da farinha desengordurada da amêndoa de macaúba**

A composição centesimal foi determinada de acordo com procedimento padrão descrito pela AOAC (2005). A umidade foi determinada em estufa a 105°C (AOAC 925.09, 2005). O conteúdo total de nitrogênio foi quantificado pelo método de Kjeldahl e o conteúdo de proteína foi calculado multiplicando-se o resultado encontrado de nitrogênio pelo fator 6,25 (Silva et al., 2021, AOAC 930.29, 2005). O conteúdo de lipídios foi determinado por diferença gravimétrica após extração em Soxhlet utilizando éter de petróleo como solvente extrator (AOAC 920.85, 2005). O conteúdo de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550°C (AOAC 923.03, 2005). O conteúdo de carboidratos foi obtido pela diferença entre o total da amostra (100%) e os conteúdos de proteína, lipídio, umidade e cinzas.

#### **4.7. Perfil de aminoácidos do isolado proteico da amêndoa de macaúba**

A composição de aminoácidos do IPAM foi determinada de acordo com metodologia oficial da AOAC 994.12/2000) e Liu et. al. (1995).

#### **4.8. Caracterização físico-química do isolado proteico da amêndoa de macaúba**

##### *4.8.1. Determinação do ponto isoelétrico médio (pHi) do IPAM*

A determinação do pHi foi feita conforme descrito por Omura et al. (2020) com algumas modificações. Inicialmente, foi feita uma dispersão do isolado proteico em água Milli-Q com concentração de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  e mantida sob agitação magnética (BS-2H, Lab Science, China) a  $25,0 \pm 0,5$  °C, durante 24 h. Em seguida, o pH foi medido (pH/conductometer 914, Metrohm, Suíça) e a dispersão separada em duas partes. Em uma das partes, o pH foi aumentado de 5,0 para 11,0 (utilizando NaOH  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$  ou  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ). Na outra, o pH foi reduzido de 5,0 para 2,0 (utilizando HCl  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$  ou  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ). Alíquotas da dispersão, cujos valores de pH

encontravam-se entre 2,0 e 11,0 (com incrementos de 1,0 unidade) foram submetidas à análise de potencial  $\zeta$ , em equipamento sizer (sizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Reino Unido) a  $25,0 \pm 0,1$  °C. Para tal, as amostras foram colocadas em uma célula capilar (DTS1070; Malvern Instruments, Reino Unido). Medições adicionais foram realizadas para cada incremento de pH de 0,1 unidade para a faixa de pH entre 4,4 e 5,4.

#### 4.8.2. *Distribuição de massas molares (perfil SDS-PAGE)*

O IPAM foi caracterizado no que diz respeito à distribuição peso molecular de suas proteínas por metodologia SDS-PAGE em condições redutoras de acordo com Laemmli (1970) com adaptações. Inicialmente, foi preparado uma dispersão de proteínas 3,0% m/v e mantida sob agitação magnética por 24 h. Em seguida, foi ajustado seu pH para 7,0 e então centrifugada a 7000g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o teor de proteínas foi determinado por metodologia de Bradford (1976). A dispersão foi diluída até alcançar teor de proteínas de 3 mg.mL<sup>-1</sup>. Foi utilizado um gel de separação à 15,0% (m/v) e um gel de empilhamento de 4,0% (m/v). 10 µL da amostra (3 mg.mL<sup>-1</sup>) foram adicionados a 5 µL de tampão amostra (tampão Tris-HCl 0,187 mol.L<sup>-1</sup> a pH 6,8; glicerol 50% (v/v), 6,0% (m/v) SDS, 1,0% (m/v) azul de bromofenol, 15,0% (v/v) β-mercaptoetanol); depois, as amostras foram aquecidas a 90 °C durante 5 min, resfriadas a 21-23 °C e inseridas nos espaços do gel de empilhamento. Utilizou-se 5 µL do marcador (TrueColor High Range Protein Marker, Sinapse Inc, Brasil) de peso molecular 10-245 kDa. A corrida da eletroforese foi realizada inicialmente a 80 V e, após atingido o gel de separação, teve sua voltagem aumentada para 120 V/220 min. Ao término da corrida, o gel foi corado em uma solução contendo cromassie azul brilhante (0,1% (m/v), 10,0% (m/v) ácido acético e 40,0% (v/v) de metanol), mantido sob agitação suave, durante 2 h. Depois,

o gel foi imerso em uma solução descolorante constituída por 10,0% de ácido acético (v/v), 40,0% de metanol (v/v) e 50,0% de água a fim de remover o excesso de corante do gel.

#### 4.8.3. Perfil de turbidez e dispersibilidade do IPAM em meio aquoso

Os perfis de turbidez e de dispersibilidade do isolado proteico foram avaliados conforme metodologia de Omura, et al., (2020) entre 2,0 e 11,0, com análises de 1,0 em 1,0 unidade. Inicialmente foram preparadas dispersões 0,5% (m/v) de isolado proteico em água Milli-Q e mantidas sob agitação magnética durante 24 horas a  $25 \pm 0,5$  °C. Após agitação, a suspensão que apresentava pH próximo a 5 foi dividida em duas partes. Na primeira dispersão, o pH foi ajustado até atingir 11,0 (utilizando NaOH 1,0 mol.L<sup>-1</sup> ou 0,1 mol. L<sup>-1</sup>), ao passo que a outra teve seu pH ajustado até atingir 2,0 (utilizando HCl 1,0 mol. L<sup>-1</sup> ou 0,1 mol.L<sup>-1</sup>). Para determinar o perfil de turbidez, foram realizadas leituras das suspensões em espectrofotômetro UV-Vis a 600 nm (Abs<sub>600</sub>) (Cary 50, Varian, Austrália), a  $25,0 \pm 1,0$  °C. A seguir, os valores de absorbância foram expressos como turbidez usando a equação 1.

$$T = \frac{2,303 \cdot Abs_{600}}{l} \quad Eq.1$$

Na equação 1,  $T$  é a turbidez e  $l$  corresponde ao caminho óptico da luz, que corresponde a largura da cubeta.

O perfil de dispersibilidade foi avaliado de acordo com a metodologia de Ladjal-Ettoumi et al. (2015) com modificações. Os mesmos sistemas, com valores de pH ajustados, foram centrifugadas a 7.000g durante 10 min e a concentração de proteínas no sobrenadante foi medida pela metodologia de Bradford (1976). Uma curva analítica padrão foi previamente construída usando concentrações de 0,00; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00 e 3,00 mg de BSA .mL<sup>-1</sup> (Mæhre et al., 2018).

#### 4.8.4. Superfície hidrofóbica exposta (índice $h_0$ )

O índice de hidrofobicidade superficial das proteínas do IPAM foi avaliado utilizando o marcador fluorescente 8-anilino-1-naftalenossulfônico (ANS), de acordo com o método de Oliete et al. (2018b) com alterações. Foram preparadas dispersões do IPAM com concentração de 1,0% (m/v) em tampão fosfato (pH 7,0) ou benzoato (pH 3,5) ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), mantidas sob agitação a  $25,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 24 h. Em seguida, as dispersões foram centrifugadas a  $10.000g$  durante 25 minutos. O sobrenadante foi coletado e o conteúdo de proteínas foi medido por metodologia de Bradford (1976) e ajustado para  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  utilizando o mesmo tampão. Foi realizada diluição seriada em uma placa de Elisa escura sobre a dispersão até atingir 0,001% (m/v). Em seguida,  $6 \text{ }\mu\text{L}$  solução de ANS ( $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) foi adicionada a  $300 \text{ }\mu\text{L}$  de cada dispersão e mantidas no escuro durante 15 min. A intensidade de fluorescência foi medida utilizando um espectrofotômetro de fluorescência (SpectraMax M5, dispositivos moleculares, EUA) a 380 nm (excitação) e 460 nm (emissão). A inclinação inicial do gráfico que relaciona a intensidade de fluorescência em função da concentração de proteínas ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) foi tomada como o índice  $h_0$ .

#### 4.8.5. Grupos sulfidrilas livres (SH)

O conteúdo dos grupos sulfidrilas livres foi determinado pelo método do reagente Ellman (5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico), DTNB), segundo a metodologia descrita por Oliveira et al. (2020) com modificações. Foram preparadas dispersões de IPAM com concentração de 1,0% (m/v) em água Milli-Q. As dispersões foram mantidas sob agitação magnética durante 24 horas a  $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após a agitação, o pH das dispersões foi ajustado para 3,5 ou 7,0 (utilizando NaOH ou HCl  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$  ou  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e então centrifugada a  $7100g$  durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e o valor de pH novamente ajustado, em seguida, a concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada utilizando a metodologia de Bradford (1976). Amostras de  $2,0 \text{ mL}$  foram coletadas e  $80 \text{ }\mu\text{L}$  DTNB foram adicionadas e a mistura resultante foi agitada durante 15 minutos no escuro. Posteriormente, a absorbância foi determinada a 412 nm. O "branco" é composto por DTNB em água Milli-Q. O conteúdo de grupos sulfidrilas ( $-\text{SH}$ ) livres foi calculado de acordo como descrito por Oliete et

al. (2018) e Chen et al. (2019), com um coeficiente de extinção de  $13,425 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Xiong et al., 2016; Xiong et al., 2018).

#### 4.9. Propriedades técnico funcionais das proteínas da amêndoa da macaúba

##### 4.9.1. Capacidades de retenção de água e óleo (CRO e CRA)

As capacidades de retenção de água e óleo (CRO e CRA) foram determinadas de acordo com Omura, et al. (2020) com modificações. Resumidamente, 0,1 g de isolado proteico (peso inicial ou PI) foi pesado em um tubo de centrífuga de 1,5 mL e adicionado 1 g de água Milli-Q ou óleo de soja. Em seguida, foram misturadas usando um agitador de vórtice durante 10 s, a cada 5 min durante um total de 30 min. Depois disso, foram centrifugadas a  $10.000 \cdot g$  durante 15 min. Os sobrenadantes correspondentes (água ou óleo) foram cuidadosamente descartados e os tubos foram mantidos invertidos por 5 minutos, o material restante foi pesado em relação ao peso da água ou do óleo retido no isolado proteico (peso ganho = PG). A CRO e CRA foram calculados de acordo com a equação 2:

$$CRO \text{ ou } CRA (\%) = \frac{PG}{PI} \cdot 100\% \quad \text{Eq. 2}$$

Na equação 2, *PG* é a massa em gramas de água ou de óleo retido pelo material e *PI* é o sua massa inicial de IPAM em gramas.

##### 4.9.2. Propriedades espumantes

Para verificar as propriedades espumantes das IPAM, foram preparadas dispersões com concentração de 1,0% (m/v) e mantidas sob agitação magnética por 24 horas. Após agitação, o pH foi ajustado para 3,5 e 7,0 (utilizando HCl  $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ou  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e então, 7,5 mL foram transferidos para um cilindro graduado (capacidade = 50 mL) e homogeneizadas (Ultra-Turrax T25, IKA-Werke GMBH & CO., Alemanha) a  $25.000 \text{ rpm}$  durante 1 minuto para a preparação das espumas de acordo com o método descrito por Omura et al., (2020). A capacidade de formação de espuma (FE) foi calculada utilizando a equação 3:

$$\% FE = \frac{V_0}{7,5} \cdot 100\% \quad \text{Eq. 3}$$

Na Equação 3:  $V_0$  é volume de espuma em mL no tempo 0 (zero) e 7,5 foi o volume de suspensão de IPAM utilizados no experimento.

#### 4.9.3. *Propriedades emulsificantes*

##### 4.9.3.1. *Preparo das emulsões*

As dispersões de IPAM de foram preparadas em água Milli-Q e mantidas sob agitação magnética por 24 horas. Foi utilizado  $0,0001 \text{ g.mL}^{-1}$  de azida sódica para que não ocorresse desenvolvimento microbiano. Após a agitação, o pH das dispersões foi ajustado para 3,5 e 7,0 (usando HCl ou NaOH a  $0,1$  ou  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ). As emulsões consistiram em 95% (p/p) de dispersão com concentrações de  $0,0025$ ,  $0,005$  e  $0,01 \text{ g.mL}^{-1}$  de IPAM (fase contínua) e 5% (p/p) de óleo de soja (fase dispersa). O processo de emulsificação foi realizado em duas etapas, como descrito por Soares et al (2019) com modificações. Resumidamente, foi realizada uma pré-emulsificação utilizando Ultra-Turrax (Ultra-Turrax T25, IKA-Werke GMBH & CO., Alemanha) a 25.000 rpm durante 1 minuto. Após isso, foram produzidas emulsões utilizando um homogeneizador ultrassônico (Viber Cell 750, Sonics, USA), operando a 20 kHz, com uma potência de 500 W, durante 4 min. Durante os processos de emulsificação, os tubos foram mantidos em banho de gelo para evitar o sobreaquecimento.

#### 4.9.3.2. Índice da atividade emulsificante (IAE)

As emulsões preparadas foram avaliadas em termos de Índice de Atividade Emulsificante de (IAE), de acordo com a metodologia descrita por Oliveira et al. (2020) com modificações. Em resumo, 50 µL das emulsões foram coletados, imediatamente após a produção das emulsões, a 2 cm da superfície e diluídos (1:200) em dodecilsulfato de sódio (SDS) a 0,1%. Então, a absorbância das amostras foi medida a 500 nm em espectrofotômetro UV-vis usando cubeta de plástico (comprimento do percurso 1 cm). O IAE foi calculado através da equação 4.

$$IAE \left( \frac{m^2}{g} \right) = \frac{2 \cdot 2.303 \cdot A_0 \cdot DF}{C \cdot \varphi \cdot 10000} \quad Eq. 4$$

Na Equação 4,  $A_0$  é a absorbância da emulsão diluída imediatamente após sua produção,  $DF$  é o fator de diluição,  $C$  é concentração de proteína em fase aquosa (m/v) antes da formação da emulsão e  $\varphi$  é fração de óleo da emulsão.

#### 4.9.3.3. Microestrutura

A microestrutura das emulsões foi estudada utilizando um microscópio óptico (CX40, Olympus, EUA), similarmente ao descrito por Soares et.al (2019), com algumas modificações. Alíquotas de emulsão (5 µL) foram colhidas 0,5-1,0 cm abaixo da superfície e vertidas em lâminas de microscópio. As lâminas de microscópio foram então cobertas com lamínulas de vidro e observadas a uma ampliação de 100x. Para cada emulsão, pelo menos dez imagens foram tiradas utilizando uma câmera fotográfica (8 megapixels). As fotomicrografias de cada emulsão foram tiradas imediatamente após a preparação e em diferentes períodos de armazenamento (0, 7, 14, 21 e 28 dias).

#### 4.9.3.4. Estabilidade macroscópica das emulsões

A estabilidade cinética macroscópica das emulsões foi avaliada em termos de valores de índice de cremeação (IC), conforme descrito por Oliveira et al. (2020) com modificações. Em resumo, 10 mL de cada emulsão fresca foram transferidos para tubos falcon de 12 mL, que foram armazenados verticalmente, à temperatura ambiente. A altura inferior do soro (Hs) e a

altura total da emulsão (Ht) foram registradas durante 28 dias. Logo após o preparo e nos dias 7, 14, 21 e 28 após a produção das emulsões. O índice de cremeação foi calculado de acordo com a equação 5.

$$IC (\%) = \frac{Hs}{Ht} \cdot 100\% \quad Eq. 5$$

#### 4.9.4. *Propriedades gelificantes*

##### 4.9.4.1. *Concentração mínima de gelificação*

A menor concentração de gelificação (MCG) do isolado proteico foi avaliada de acordo com metodologia descrita por Omura, et al. (2020) com modificações. Para isso, foram preparadas 3 mL de dispersões proteicas com concentrações de 12,0; 13,0; 14,0; 15,0 e 16,0 (m/v) em tubos de vidro (capacidade = 8,0 mL) e mantidos sob agitação magnética por 24 horas. Em seguida, o pH das dispersões foi ajustado para 7,0 e levadas a banho termostático a temperatura de 95 °C durante 15 minutos e em seguida, os sistemas foram imediatamente resfriados à 4 °C por 24 horas para induzir a gelificação. Depois disso, os frascos de vidro foram invertidos a fim de determinar a concentração mínima em que as dispersões formaram gel autossustentável, que não escorresse pelo frasco.

##### 4.9.4.1. *Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)*

A Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) foi utilizada para estudar as microestruturas do gel de acordo com o método descrito por Andoyo, Guyomarc'h, Cauty, & Famelart (2014). A dispersão foi preparada na concentração 14% (m/v), conforme mencionado na seção anterior, e marcada usando 0,2 g/kg de isotiocianato de rodamina B (RITC). As dispersões foram agitadas durante 5 min à temperatura ambiente para assegurar a solubilização da RITC. Após o processo térmico, a dispersão foi colocada em placas de petri (MatTek Corporation, Ashland, EUA). Após a formação do gel, as amostras foram estudadas utilizando um laser Helion-Neon (excitação a 543 nm e emissão a 625 nm) num microscópio Zeiss LSM 510 Meta Confocal.

#### **4.9. Análise estatística**

Todas as análises foram realizadas em 3 repetições. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o software Minitab. Foi utilizada a análise de variância unidirecional (ANOVA), o teste de Tukey (com um nível de probabilidade de 5%) e o teste t foram usados para avaliar diferenças estatísticas entre os tratamentos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Condições para a obtenção do isolado proteico de amêndoa de macaúba

O gráfico da concentração de proteínas que permanecem no sobrenadante após a precipitação isoelétrica das proteínas da farinha desengordurada de amêndoa de macaúba na faixa de pH de 2,0 a 9,0 está indicado na figura 5. A pH igual a 5, observa-se solubilidade mínima do material, sugerindo que o pHi das proteínas nele contidas é próximo a esse valor de pH.

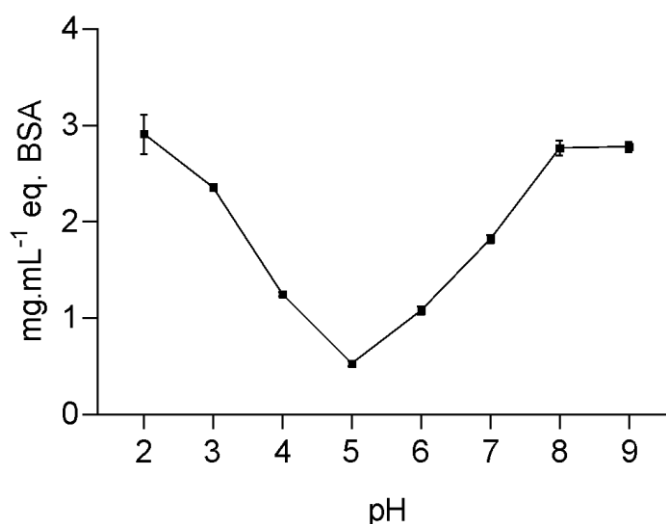


Figura 5: Teor de proteínas nos sobrenadantes após a precipitação isoelétrica em diferentes valores de pH.

Os resultados foram apresentados como médias e as barras indicam o desvio padrão (n=3).

Conhecendo-se o pH em que as proteínas da amêndoa de macaúba apresentam solubilidade mínima, foi realizada a precipitação isoelétrica em valores de pH entre 4,6 e 5,5 e, para cada precipitado, foi determinado o teor de proteínas do material obtido. Foram obtidos materiais com concentrações de proteína maiores que 82% em todas as condições testadas. Em pH 4,9 foi obtido o material com maior concentração de proteínas (93,87%), o que permite caracterizá-lo como um isolado proteico (Brasil, 2005). Por essa razão, doravante o material será referido no texto como IPAM (isolado proteico de amêndoas de macaúba).

Além da influência do pH no teor de proteínas, a retirada de partículas de maior granulometria, possivelmente com alto conteúdo de carboidratos, presentes no sobrenadante obtido da extração alcalina, contribuiu na obtenção de um produto com maior concentração de

proteínas. Além disso, não houve diferença significativa na concentração de proteínas dos materiais obtidos realizando a centrifugação a 5000g por 15 minutos ( $93,32 \pm 1,25\%$ ) comparado com 1500g por 30 minutos ( $93,38 \pm 1,10\%$ ).

Os resultados de medidas de potencial  $\zeta$  são mostrados na figura 6. Observa-se que em valor de pH 4,9, as proteínas apresentaram carga elétrica líquida próxima a zero, indicando que o pHi das proteínas da amêndoa de macaúba encontra-se neste valor de pH.

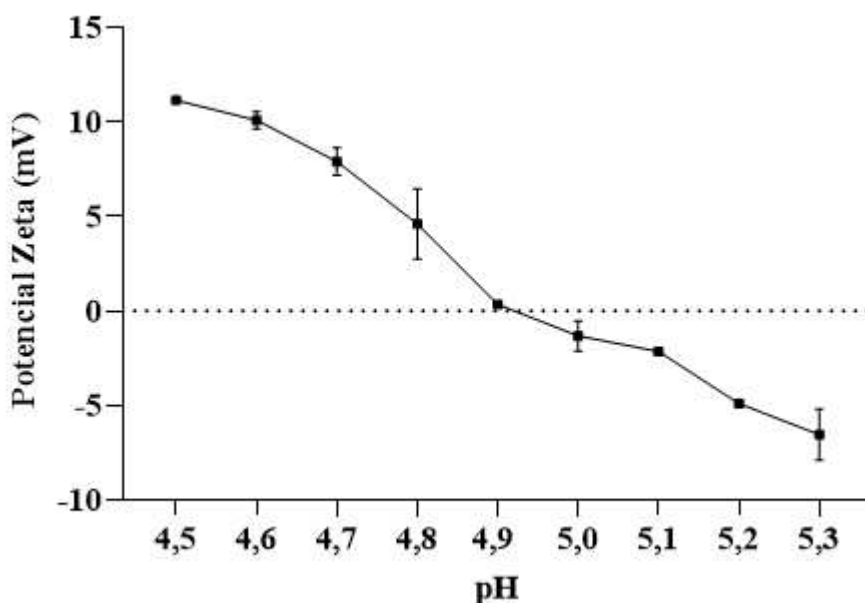


Figura 6: Potencial dos isolados proteicos 4,9 e 4,7 P na faixa de pH entre 4,5 à 5,3. Os resultados foram expressos como média e as barras indicam o desvio padrão (n=3).

A determinação do pHi das proteínas é de grande importância para a sua purificação, já que a obtenção de isolados e concentrados proteicos é realizada por solubilização em meio alcalino para extração proteica, com posterior precipitação em meio ácido (Lima, et al., 2019). Além da purificação das proteínas, conhecer o pHi é extremamente importante para definir quais valores de pH essas proteínas expressam com maior intensidade suas propriedades técnico-funcionais para a produção de alimentos (Damodaran 2005; Foegeding, et al., 2011).

Logo, a partir dos resultados encontrados no presente trabalho, pode-se sugerir que as melhores condições para obtenção do IPAM são: extração alcalina em pH 9,0 e precipitação isoelétrica em pH 4,9.

### 5.1.1. Obtenção do IPAM

Para obtenção do IPAM, foi preparada uma dispersão da FDAM com água Milli-Q na proporção de 1:15 e mantida sob agitação magnética por 1 hora a  $25,0 \pm 0,5$  °C. Em seguida o

pH da dispersões foi ajustado para 9,0 (usando NaOH 1,0 mol.L<sup>-1</sup> ou 0,1 mol.L<sup>-1</sup>) seguido de centrifugação do material (5000g por 15 minutos a 25,0 ± 0,5 °C). Após a extração alcalina, o sobrenadante foi coletado e seu pH ajustado para 4,9 (utilizando HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> ou 0,1 mol L<sup>-1</sup>) e em seguida foi realizada centrifugação do material (5000g por 15 minutos a 25,0 ± 0,5 °C). Após a precipitação isoelétrica o material obtido foi lavado por três vezes com água Milli-Q e em seguida liofilizado (Liotop-L101, Liobras, Brazil) e armazenado em potes plásticos opacos sob refrigeração (7,0 °C ± 1,0) até as análises subsequentes. Com esse processo foi possível obter rendimento de 12,61 ± 0,22% (m/m) de IPAM a partir da FDAM.

## 5.2. Composição centesimal da FDAM e do IPAM

Verificou-se que a FDAM é composta principalmente por proteínas (37,3 ± 0,8% m/m) e fibras insolúveis (33,2 ± 0,2% m/m), o que a torna um ingrediente estratégico para indústria de alimentos, tanto em termos nutricionais (Hiane et al., 2006a, Hiane et al., 2006b, Dessimoni-Pinto, et al., 2010), quanto como matéria-prima para obtenção de isolados e concentrados proteicos (Grande e Crenn, 2016). O baixo teor de lipídios (1,6 ± 0,1% m/m) encontrado na FDAM demonstra a eficácia do procedimento de extração dos lipídeos empregado neste estudo. Resultados semelhantes quanto aos teores de proteínas e lipídeos foram reportados nos trabalhos de Hiane et al. (2006b), e Silva et al. (2021) que obtiveram farinhas desengorduradas de amêndoa de macaúba com 1,23% e 5,23% de lipídeos e 37,95% e 36,23% de proteínas, respectivamente. A FDAM apresentou teor de cinzas igual a 5,1 ± 0,2% m/m. Os principais minerais presentes na amêndoa de macaúba são fósforo, potássio e magnésio (Hiane et al., 2006a). Além disso, a umidade, concentração de fibra solúvel e carboidratos totais da FDAM foram 9,7 ± 0,1% m/m, 2,5 ± 0,4% m/m e 46,3 ± 0,7% m/m, respectivamente.

Já em relação ao IPAM, destaca-se o elevado teor de proteínas (94,9 ± 0,9% m/m). Este resultado indica que utilizando somente a precipitação isoelétrica, que é um método para concentração de proteínas simples e facilmente escalonável na indústria (Stone, et al., 2015b), é possível obter um ingrediente de elevado valor comercial, em virtude de suas propriedades técnico-funcionais (abordados adiante). Lima et al., 2019 obtiveram um produto final com aproximadamente 86% de proteínas de amêndoa de castanha-de-caju, utilizando precipitação isoelétrica. Karki et al., 2009 obtiveram um produto final com 72,9% de proteínas utilizando essa mesma técnica a partir da soja. Estes trabalhos confirmam a eficiência da aplicação da técnica de precipitação isoelétrica para a concentração das proteínas da FDAM, já que com a

mesma técnica é possível obter um produto com elevadíssimo conteúdo proteico, o que não ocorreu facilmente nas outras matérias primas.

Assim como a FDAM, o teor de lipídios do IPAM foi baixo ( $1,9\% \pm 0,1$ ), bem como o teor de cinzas ( $1,8\% \pm 0,2$ ) e umidade ( $4,6 \pm 0,1$ ). O baixo teor de cinzas indica que a lavagem do material final foi eficiente para a remoção do excesso de sal formado durante o processo de precipitação isoelétrica. Os baixos teores de lipídeos encontrados tanto na FDAM, quanto no IPAM, indicam que a combinação dos métodos de prensagem seguido por extração com solvente foram altamente eficientes para a extração dos lipídios.

### 5.3. Perfil de aminoácidos do IPAM

A composição de aminoácidos das proteínas do IPAM é apresentada na tabela 5. Observa-se a incidência de elevados teores dos aminoácidos arginina ( $16,21 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) e glutamato ( $20,84 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ). A arginina e o glutamato também são os aminoácidos mais abundantes da FDAM, podendo estar relacionados com a função de armazenamento das proteínas da amêndoa de macaúba (Hiane et al., 2006b, Silva et al., 2021). A concentração de triptofano e cisteína foi menor no IPAM que na FDAM, já os outros aminoácidos apresentaram concentração similar (Hiane et al., 2006a, Silva et al., 2021).

A qualidade nutricional da proteína depende geralmente da sua composição em aminoácidos, em particular, dos aminoácidos essenciais (Menegotto et al., 2019). As proteínas do IPAM são ricas nos aminoácidos essenciais fenilalanina, histidina e valina. Além disso, é capaz de fornecer os aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína), que são aminoácidos limitantes da soja e da ervilha, e lisina, que geralmente é um aminoácido limitante em cereais (Lam et al., 2016, Pires et al., 2006). O triptofano foi o único aminoácido limitante das proteínas do IPAM, de acordo com os padrões recomendados pela FAO (2013) para crianças acima de 2 anos. A baixa concentração desse aminoácido pode ser contornada por meio da ingestão de proteínas de outras fontes, como soja e arroz, que são ricos em triptofano (Kalman, 2014).

O IPAM pode ser utilizado para complementar ou enriquecer dietas nos quais cereais ou leguminosas são as principais fontes de proteínas, já que é capaz de suprir as demandas de aminoácidos limitantes desses alimentos (Silva et al., 2021 Millward, 1999). Além disso, Hiane et al., (2006b) observaram que o valor biológico da proteína da amêndoa de macaúba foi semelhante ao da caseína. Portanto, o IPAM é fonte de proteínas nutricionalmente valiosas devido ao alto conteúdo de aminoácidos essenciais e, portanto, possui grande potencial para aplicação na formulação de alimentos.

Tabela 5: Composição de aminoácidos do IPAM

<b>Aminoácidos essenciais</b>	<b>g.100g<sup>-1</sup></b>	<b>Aminoácidos não essenciais</b>	<b>g.100g<sup>-1</sup></b>
Histidina	2,89 ± 0,13	Alanine	3,83 ± 0,17
Isoleucina	2,94 ± 0,18	Arginina	16,21 ± 1,09
Leucina	6,29 ± 0,28	Aspartato	8,85 ± 0,21
Lisina	4,89 ± 0,14	Cisteína	0,80 ± 0,02
Metionina	1,93 ± 0,08	Glutamato	20,84 ± 0,82
Fenilalanina	5,59 ± 0,24	Glicina	4,60 ± 0,21
Treonina	2,76 ± 0,21	Prolina	3,70 ± 0,14
Triptofano	0,46 ± 0,01	Serina	4,91 ± 0,22
Valina	4,88 ± 0,19	Tirosina	2,51 ± 0,12
<b>Total g.100g<sup>-1</sup></b>	<b>98,90</b>		

Os resultados foram expressos como média de gramas de aminoácidos por 100 gramas de IPAM ± desvio padrão (n=2).

Espera-se que a soma das concentrações de aminoácidos coincida com a concentração total de proteínas do material. Nota-se que a soma dos conteúdos de aminoácidos individuais do IPAM alcançou um valor próximo a 98,9 g.100g<sup>-1</sup> de proteínas. Esse resultado é satisfatório, por ser muito próximo ao encontrado na quantificação de proteínas pelo método de Kjeldahl (seção 5.2.).

## 5.4. Caracterização físico-química do IPAM

### 5.4.1. Ponto isoelétrico médio (pHi) do IPAM

O pHi das proteínas presentes no IPAM é em pH 4,9 conforme mostrado na figura 7. O pHi encontrado para proteínas do IPAM foi maior que o das proteínas da amêndoa selvagem (*Amygdalus scoparia*) (pHi em pH 3,8) (Amirshaghghi, Rezaei & Habibi, 2017) e mais próximo ao pHi do isolado proteico de castanha de cajú (pH 5,0). Além disso, o pHi do IPAM foi maior que o pHi da soja (pH 4,6) e da ervilha (pH 4,3), principais isolados proteicos comercializados (Omura et al., 2021).

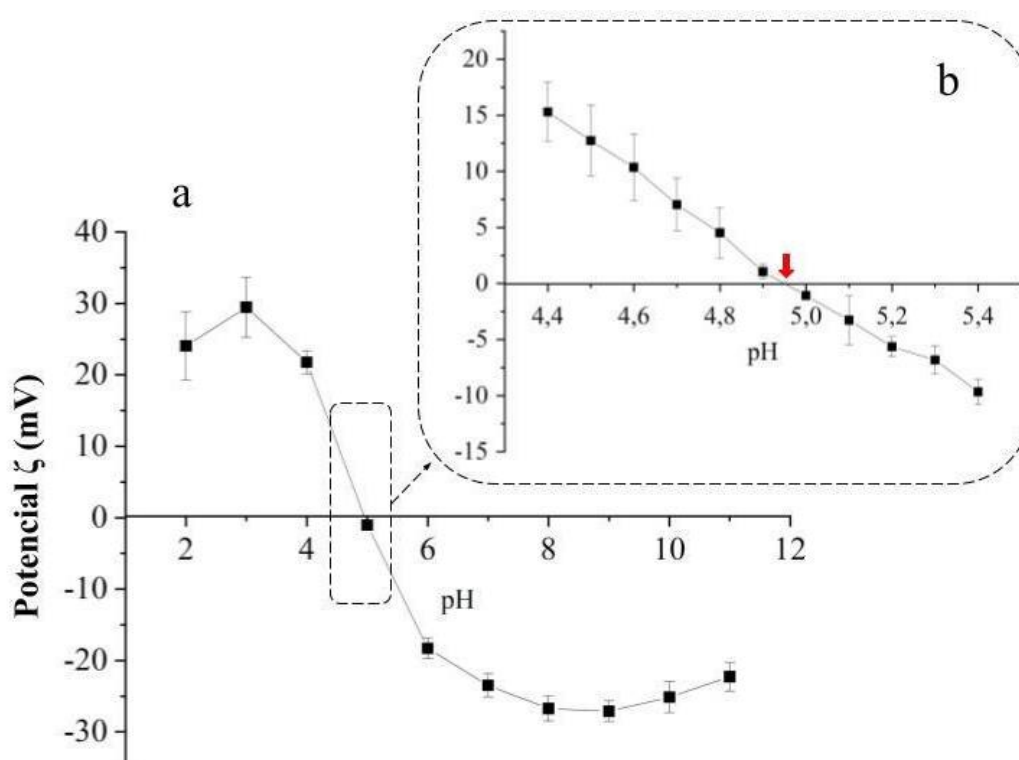


Figura 7: (a) potencial  $\zeta$  médio (mV) do isolado proteico de amêndoa de macaúba (IPAM) disperso dentro da faixa de pH 2,0-11,0. Em (b), a figura mostrada (a) foi ampliada entre pH 4,4 e 5,4, a fim de indicar (seta vermelha) o valor de pH em que potencial  $\zeta$  era  $\sim 0$ , ou seja, a média do ponto isoelétrico do isolado proteico.

Os resultados foram expressos como média e as barras indicam o desvio padrão (n=3).

O pHi é definido como o valor de pH em que a carga elétrica líquida das proteínas é zero (pois o número de grupamentos com carga elétrica negativa e positiva se equiparam). Por sua vez, a carga elétrica das proteínas tem o mesmo sinal do potencial  $\zeta$  e é diretamente proporcional ao seu valor; portanto, o pHi de uma proteína é o pH em que seu potencial  $\zeta$  é zero

(Bhattacharjee, 2016). Quando uma proteína é suspensa em solução cujo pH é o seu pHi, suas moléculas têm repulsão eletrostática mínima entre si, de modo que essa proteína apresenta mínima solubilidade e com frequência sofre precipitação (Omura et al., 2021, Oliveira et al., 2020). Portanto, a determinação do pHi das proteínas é de grande relevância para a obtenção de isolados e concentrados proteicos por precipitação isoelétrica (Bhattacharjee, 2016).

#### 5.4.2. Distribuição de massas molares (perfil SDS-PAGE)

A distribuição das massas molares das proteínas do IPAM foi estudada pela técnica SDS-PAGE em condições de redução. O perfil eletroforético (figura 8) mostra uma variedade de pesos moleculares para as proteínas do IPAM, distribuídas em 6 bandas (<10-58 kDa) em condições redutoras. As globulinas são as principais proteínas da amêndoa de macaúba (53,5 a 58,5%) seguida da glutelina (22,4 a 40,0%) e com menores frações de albuminas (5,4 a 9,1%) e prolaminas (1,1 a 9,7%) (Silva et al., 2020, Hiane et al., 2006).

Devido a heterogeneidade de subunidades das proteínas de armazenamento, frequentemente, o perfil SDS-PAGE de proteínas de leguminosas e oleaginosas geralmente mostra uma maior diversidade de bandas de peso molecular (Silva, et al., 2021). A baixa diversidade de bandas de diferentes pesos moleculares pode estar relacionada a proteínas com massa molecular semelhante (Silva et al., 2021). Que é, provavelmente, o caso da banda mais intensa, com peso molecular de 45 a 58 KDa que é formada principalmente pela fração 7S das globulinas, mas possivelmente representa também a fração 11S (Silva et al., 2020, Hiane et al., 2006b).

Além disso, essa banda maior pode ser formada por polipeptídios ligados através de uma ou mais ligações de dissulfeto (Silva et al., 2021). O tratamento de proteínas sob pH alcalino, tal como aplicado durante a extração alcalina, pode resultar na ligação cruzada intra e intermolecular dos polipeptídios causando aumento da massa molecular aparente das proteínas (Kwon, Park & Rhee, 1996, Silva et al., 2021). Foi observado que as proteínas do coco são formadas principalmente por oligômeros (Kwon, Park & Rhee, 1996).

As bandas de 28 e 10 KDa, provavelmente, também correspondem a família 7S das globulinas. Já as bandas de 30 e de 17 KDa correspondem a família 11S de cadeia polipeptídica ácida e básica, respectivamente, das globulinas. É possível observar mais outras duas bandas, uma com 10 KDa, que provavelmente corresponde a família 7S das globulinas e outra abaixo de 10 KDa. Estas observações estavam em concordância com diferentes trabalhos da literatura (Silva et al., 2020, Hiane et al., 2006b).

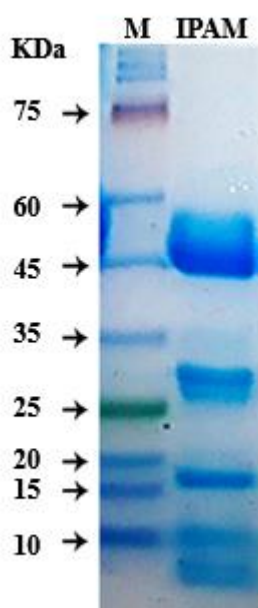


Figura 8: Padrão SDS-PAGE do isolado proteico da amêndoa de macaúba em condições de redução.

#### 5.4.3. Perfil de turbidez e dispersibilidade do IPAM em meio aquoso

Os dados do perfil de dispersibilidade e turbidez do IPAM são mostrados nas figuras 9a e 9b, respectivamente. Na faixa de pH entre 4,0-6,0, as proteínas apresentaram menor dispersibilidade ( $0,76 \text{ mg.mL}^{-1}$  eq. BSA em pH 4,0;  $0,09 \text{ mg.mL}^{-1}$  eq. BSA em pH 5,0 e  $0,39 \text{ mg.mL}^{-1}$  eq. BSA em pH 6,0). Em pH 7,0, as proteínas apresentam maior dispersibilidade ( $2,64 \text{ mg.mL}^{-1}$  eq. BSA), sofre pequeno aumento até pH 9,0 ( $3,46 \text{ mg.mL}^{-1}$  eq. BSA) e a partir desse valor de pH tende a permanecer constante. Em pH 3,0, a dispersibilidade das proteínas do IPAM também é maior ( $3,09 \text{ mg.mL}^{-1}$  eq. BSA). Esses resultados eram esperados, uma vez que corroboram os resultados do potencial  $\zeta$  determinado para as proteínas do IPAM (figura 7).

Já a turbidez apresenta comportamento contrário a dispersibilidade, ou seja, em valores de pH em que as proteínas são menos solúveis a turbidez é maior (próximo a  $5,8 \text{ cm}^{-1}$  nos valores de pH 4,0; 5,0 e 6,0) e à medida que o pH se afastou do pHi, a dispersibilidade das proteínas aumenta e a turbidez diminui (figura 9c).

Na faixa de pH de menor dispersibilidade as interações proteína-proteína são predominantes sobre as interações proteína-solvente, favorecendo a formação de agregados proteicos, com conseqüente aumento da turbidez e diminuição da dispersibilidade (Oliveira et al., 2020, Bhattacharjee, 2016). A baixa solubilidade e elevada turbidez na faixa de pH de 4,0 a 6,0 foi observada para as proteínas de ervilha e da soja (Oliveira et al., 2020; Omura et al.,

2021). Já para as proteínas da amêndoa selvagem (*Amygdalus scoparia*) a menor solubilidade está na faixa de pH de 3 a 5 (Amirshaghghi, Rezaei & Habibi Rezaei, 2017).

A solubilidade proteica é um índice termodinâmico do equilíbrio entre a interação proteína-proteína e proteína-solvente (Omura et al., 2021). Portanto, conhecer a faixa de pH em que as proteínas são mais ou menos solúveis é essencial para a elaboração de produtos pois tem grande influência nas propriedades sensoriais e técnico-funcionais dos alimentos e também para a concentração dessas proteínas (Lam et al., 2016). Portanto, a solubilidade proteica é a propriedade técnico-funcional chave para a expressão de eventuais propriedades interfaciais (emulsificantes e espumantes) e de textura (espessantes e gelificantes) de materiais proteicos (Sze-Tao et al., 2000, Du et al., 2017).

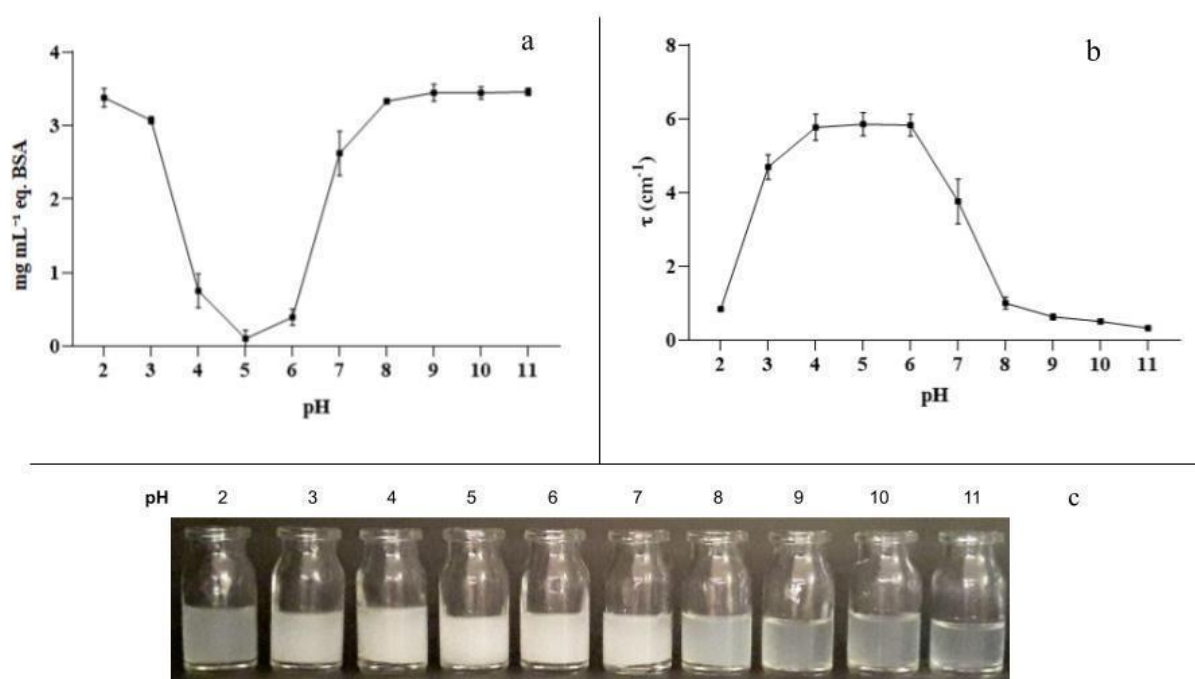


Figura 9: (a) perfil de dispersibilidade do IPAM (mg.mL<sup>-1</sup> equivalente BSA no sobrenadante das dispersões centrifugadas) na em pH de 2,0-11,0, em (b) o perfil de turbidez do IPAM em meio aquoso em pH de 2,0 a 11,0 e em (c) aspecto visual das dispersões do isolado proteico de amêndoa de macaúba a 0,5% (m/v) (25 ± 0.5 °C) na faixa de pH de 2,0 até 11,0.

Os resultados foram expressos como médias e as barras indicam o desvio padrão (n=3).

Com base no pHi e no perfil de dispersibilidade do IPAM, foram selecionados dois valores de pH para serem investigados no presente estudo: 3,5 e 7,0. Esta escolha foi estabelecida para trabalhar dentro de uma gama de pH tecnologicamente lógica, assegurar a dispersibilidade do IPAM para proceder às etapas subsequentes do estudo. Com efeito, a valores

de pH próximos ao pHi as proteínas alimentares são pouco solúveis, minimizando as forças eletrostáticas repulsivas, além de formarem emulsões que se desestabilizam muito rapidamente (Oliveira et al., 2020).

#### 5.4.4. Superfície hidrofóbica exposta (índice $h_0$ )

A hidrofobicidade das proteínas do IPAM foi estatisticamente maior que em pH 3,5 (2263) do que em pH 7,0 (931) (Figura 10). Estes resultados sugerem que o pH 3,5 proporcionou maior exposição em maior magnitude às regiões hidrofóbicas das proteínas presentes no IPAM. Em condições fisiológicas, os grupos hidrofóbicos estão majoritariamente presentes no “core” da estrutura das proteínas, e suas interações nas partes mais internas das moléculas proteicas é um dos fatores que impactam a estrutura terciária das mesmas. Mantidas as condições, os aminoácidos com cadeias laterais polares tendem a estar mais distribuídos em ambientes hidrofílicos, ou seja, na superfície da proteína (Jiang et al., 2014).

Quando alterações conformacionais ocorrem, alguns aminoácidos hidrofóbicos também podem se expor à superfície da proteína e afetar a hidrofobicidade de sua superfície. O índice  $h_0$  (adimensional) é proporcional à densidade de grupamentos hidrofóbicos expostos na superfície proteica, em uma dada condição de temperatura, pH e força iônica (Oliete et al., 2018). Portanto o maior índice  $h_0$  em pH 3,5 se correlaciona com mudanças conformacionais que esse valor de pH parece engendrar nas proteínas do IPAM. A verificação dessa hipótese necessitaria de análises estruturais, a exemplo de dicroísmo circular.

Um maior índice  $h_0$  pode ser associado à melhoria de algumas propriedades técnico-funcionais dos isolados proteicos, tais como capacidade de formar emulsões (Kato & Nakai 1980). O maior índice  $h_0$  em pH 3,5 sugere que o IPAM é mais adequado para a aplicação em alimentos ácidos. Atualmente, existem diversos estudos, com a aplicação de tratamentos de ultrassom e métodos de concentração de proteínas para aumentar a exposição desses grupos a fim de melhorar as técnico-funcionalidades dessas biomoléculas (Oliveira et al., 2020, Omura et al., 2021, Boye et al., 2010).

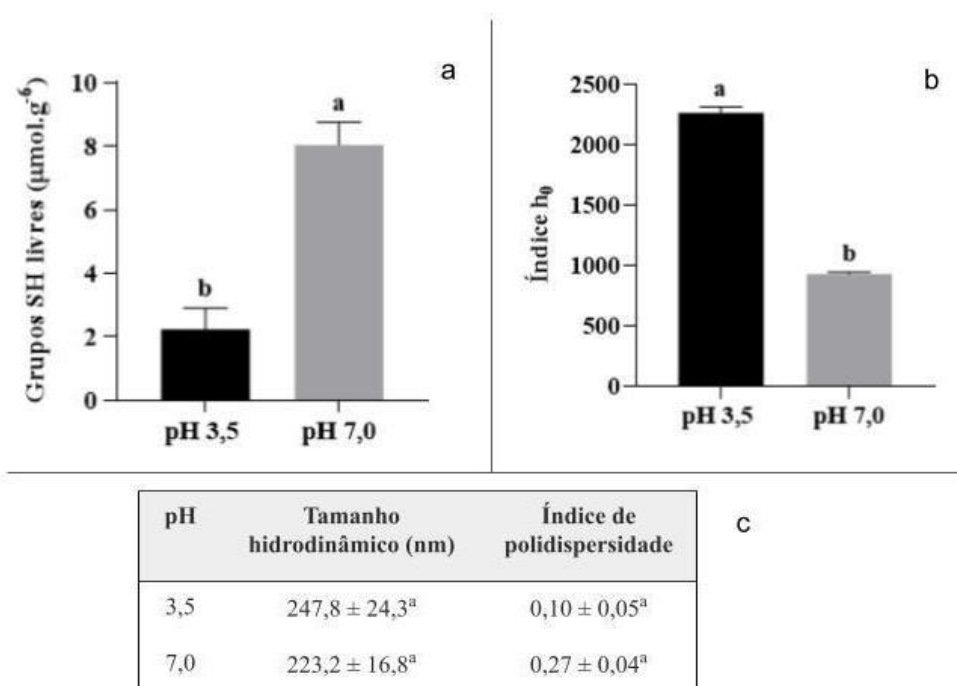


Figura 10: (a) superfície hidrofóbica (Índice  $h_0$ ), (b) grupos sulfidrila livres (SH) e (c) tamanho hidrodinâmico das proteínas do IPAM do isolado proteico de amêndoa de macaúba.

Os resultados do índice  $h_0$  e SH foram expressos como médias e as barras indicam o desvio padrão ( $n=3$ ). Os resultados de tamanho hidrodinâmico e índice de polidispersibilidade foram expressos como médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). O teste de T foi utilizado em todos os casos com um nível de significância de 5% ( $n=3$ ). As letras referem-se a comparações entre valores de pH das dispersões.

#### 5.4.5. Grupos sulfidrilas livres (SH)

O conteúdo de grupos sulfidrilas livres (SH) do IPAM nos valores de pH está indicado na figura 10b. Foi observado maior quantidade de grupos SH em pH 7,0 do que em pH 3,5. Os grupos SH indicam alterações nas pontes dissulfeto na estrutura proteica e estão intimamente relacionadas com mudanças na estrutura proteica que podem causar maior exposição desses grupos SH na superfície proteica, assim como a formação de novos grupos através da ruptura de ligações dissulfeto (Oliveira et al., 2020, Chen et al., 2019).

Portanto, os resultados sugerem que em pH 7,0, as conformações das proteínas do IPAM em dispersão aquosa tendem a apresentar significativamente mais grupamentos SH livres, do que em pH 3,5. Os resultados estão relacionados com mudanças mais intensas na estrutura das proteínas do IPAM que proporcionaram maior exposição de grupos sulfidrilas antes enterrados na estrutura proteica, além de possível a formação de novos grupos SH pela ruptura das pontes dissulfeto (Xiong, et al., 2018, Chen et al., 2019, Omura et al., 2021). Oliveira et al., (2020) encontraram resultados análogos para o concentrado proteico de ervilha, onde essas proteínas apresentaram maiores quantidades de grupos SH livres em pH 6,8 do que em pH 2,8.

#### 5.4.6. Diâmetro hidrodinâmico médio

Os diâmetros hidrodinâmicos médios das proteínas dispersas ( $D_h$ ) são representados figura 10c. Apenas uma população foi identificada nos dois valores de pH 3,5 (247,8 nm) e 7,0 (223,2 nm), ou seja, em ambos os casos as distribuições de tamanho são monomodais. Estes resultados mostram que o IPAM obtido se trata de um material monomodal. Em relação ao índice de polidispersidade, também não se observou diferença significativa entre as médias nos valores de pH analisados.

O  $D_h$  das partículas possuem efeito sobre as propriedades interfaciais, incluindo a formação de espuma e emulsificação, uma vez que está relacionado com o grau de agregação das partículas de proteínas, geralmente ligadas por pontes dissulfeto ou pontes de hidrogênio (Chen et al., 2019). Além disso, partículas menores de proteínas conseguem se organizar mais facilmente nas interfaces água-ar e O/A, com relação às suas regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, atuando de maneira mais eficaz na diminuição da tensão superficial de emulsões e espumas (Xiong et al., 2018).

Os resultados indicam que o valor de pH em que as proteínas se encontravam dispersas, entre os dois estudos, não afetou o tamanho de suas partículas em dispersão. De acordo com os resultados da seção 5.4.1, as proteínas do IPAM apresentam potencial  $\zeta$  semelhante nos valores

de pH analisados, o que indica que as forças atrativas e repulsivas relacionadas às cargas das proteínas também tinham valores próximos afetando de maneira semelhante o comportamento de agregação das estruturas proteicas (Xiong et al., 2018, Bhattacharjee, 2016).

## **5.5. Propriedades técnico funcionais das proteínas da amêndoa da macaúba**

### *5.5.1. Capacidade de retenção de água e de óleo (CRO e CRA)*

De acordo com a figura 11, o IPAM tem capacidade de reter maior quantidade de óleo (153,77%) do que de água (97,29%). A maior CRO em comparação com a CRA das proteínas da amêndoa de macaúba pode estar relacionada à presença em grandes quantidades de grupos apolares expostos na superfície das proteínas (Lam, et al., 2016). A maior exposição dos grupos apolares na superfície das estruturas proteicas pode estar relacionada com a proporção de aminoácidos apolares em relação aos apolares presentes nas proteínas do IPAM (Tabela 5) (Du, et al., 2017).

A CRO das proteínas tem efeito positivo nas propriedades sensoriais de muitos alimentos, já que muitos compostos aromáticos são lipídios (Amirshaghghi, Rezaei & Rezaei, 2017). Além disso tem grande relação com as propriedades emulsificantes pois geralmente está relacionada com maior exposição de grupos apolares na superfície proteica (Amirshaghghi, Rezaei & Rezaei, 2017, Pearce e Kinsella, 1978).

Proteínas com capacidade reduzida de reter água torna desejável a produção de pastas menos espessas. Enquanto uma maior capacidade de ligação ao óleo o torna mais viável em alimentos que requerem retenção de óleo (Mesa-Stonestreet, Alavi, Bean, 2010). Além disso, uma maior capacidade de interação com lipídeos está intimamente relacionada com maior índice de atividade emulsificante (Lam et al., 2016).

A CRA e CRO são propriedades importantes dos isolados proteicos para a produção de alimentos, pois afeta os fenômenos benéficos que se desenvolvem quando a molécula de proteína interage com moléculas de lipídios, como por exemplo as melhorias das características sensoriais (Menegotto et al., 2019). Os valores foram menores que os encontrados por Amirshaghghi et al. (2017) para o isolado proteico de amêndoa selvagem, que foi capaz de absorver 2,3 g de água e 3,5 g de óleo para cada grama de isolado proteico. Já Stone et al. (2015a) analisou diferentes cultivares de ervilha e observou que cada grama de isolado foi capaz de absorver entre 1,88 e 2,37 de água e 1,07 a 1,40 gramas de óleo.

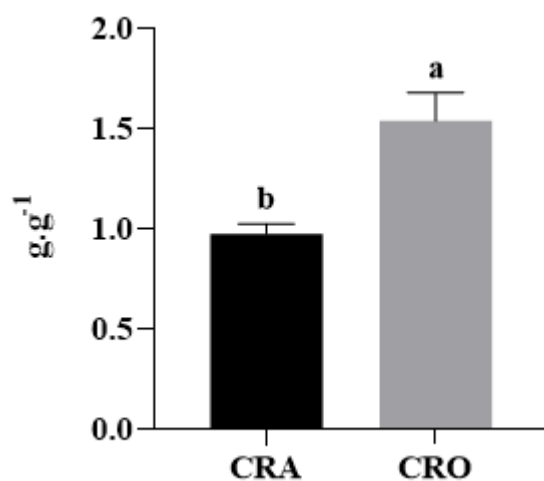


Figura 11: Capacidade de reter água (CRA) e óleo (CRO) do isolado proteico de amêndoa de macaúba

O eixo Y do gráfico indica a massa de água absorvida por grama de IPAM. Os resultados foram expressos como médias e as barras indicam o desvio padrão (n=3). O teste de T foi utilizado, com um nível de significância de 5%.

### 5.5.2. *Propriedades espumantes*

Os resultados referentes à capacidade de formar espuma (FE) do IPAM nos valores de pH 3,5 ( $71,5 \pm 3,52\%$ ) e 7,0 ( $65,9 \pm 3,39\%$ ) não diferiram significativamente (Figura 12), portanto, o índice  $h_0$  e a solubilidade não afetaram a FE. O tamanho médio das partículas dispersas, assim como a FE, não diferiram, o que pode indicar que esse é o fator que influencia essa propriedade técnico funcional do IPAM.

Quanto à estabilidade da espuma (EE) formada, não foi possível ser analisada, pois logo após a preparação, a espuma se desfez rapidamente, o que indica uma baixa estabilidade. As espumas são formadas por proteínas dispersas em meio aquoso que se difundem para a interface ar/água, abaixando a tensão interfacial e formando uma película fina e resistente, permitindo assim que a fase dispersa (ar) seja incorporada (Damodaran, 2005). Portanto, a baixa estabilidade da espuma pode estar relacionada com a estrutura de algumas das proteínas do IPAM que são formadas por diferentes oligômeros de aminoácidos. Além de existirem agregados proteicos ligados por pontes dissulfeto ou pontes de hidrogênio como foi observado nos resultados SDS-PAGE (seção 5.4.2.). Essas estruturas compactadas limitam a capacidade de adsorver e permanecer na interface ar-água formando um filme de proteínas com baixa resistência e alta permeabilidade a gases (Xiong et al., 2018).

Portanto, proteínas compostas por partículas menores geralmente proporcionam melhor FE e maior EE, uma vez que facilita a sua entrada e permanência por mais tempo na interface ar/água, geralmente, possuem maiores frações hidrofóbicas em sua superfície resultam numa redução da barreira energética para a adsorção na interface ar-água, aumentando assim a cinética de adsorção (Xiong et al., 2018)

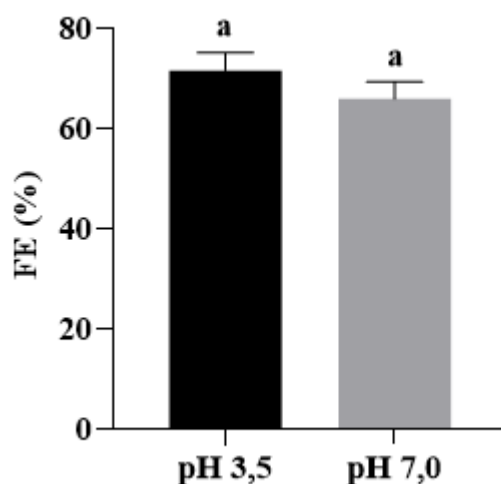


Figura 12: Capacidade de formar espuma do IPAM

Os resultados foram expressos como médias e as barras indicam o desvio padrão (n=3). O teste de T foi utilizado, com um nível de significância de 5% (n=3).

### 5.5.3. Propriedades emulsificantes

#### 5.5.3.1. Índice de Atividade Emulsificante (IAE)

As emulsões preparadas em pH 3,5 com 1% de IPAM na fase contínua apresentaram maior IAE ( $242,5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) que as emulsões com 0,25% ( $137,8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) (Figura 13). Em pH 7,0, o IAE foi maior em emulsões com 0,25% de IPAM na fase contínua ( $324,7 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) e menor para emulsões preparadas com 1,0% de IPAM ( $70,9 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ). O maior IAE obtido com a menor concentração de proteína pode estar relacionado com o menor grau de interação das proteínas entre si e tornando-as mais disponíveis para migrar para a interface óleo/água e atuar como emulsificante de forma mais eficaz. Portanto, esses resultados mostram que a menor concentração de IPAM pode cobrir uma maior área (superfície da gotícula de óleo emulsionada) nessas condições, o que corrobora os resultados do índice  $h_0$ . Contudo, as emulsões se desestabilizaram mais rapidamente (Figura 14).

Foi observado também que o pH teve efeito significativo no IAE em emulsões preparadas a partir das suspensões com diferentes concentrações de proteínas. Em emulsões preparadas a partir de dispersões com concentração de 1% e 0,5% de IPAM, o pH 3,5 proporcionou maior IAE que o pH 7,0, corroborando com os resultados do índice  $h_0$  maiores em pH 3,5. Já as emulsões preparadas a partir de dispersões com concentração de 0,25% de IPAM apresentaram maior IAE em pH 7,0 ( $324,7 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ).

O índice de atividade emulsificante é a quantidade de moléculas ativas de superfície para cobrir uma dada área da interface água/óleo, capaz de reduzir a tensão interfacial e permitir que a emulsão seja formada (Soares et al., 2019). A capacidade das proteínas de adsorver na

interface de gotas em emulsões pode estar associada a características físicas das proteínas, tais como equilíbrio lipofílico hidrofílico, carga elétrica líquida e diâmetro hidrodinâmico médio (que afeta a difusibilidade de moléculas no meio) (Oliveira et al., 2020, Soares et al., 2019). Portanto o maior índice  $h_0$  observado em pH 3,5 corrobora com os maiores IAE observados nesse pH do que em pH 7,0 das emulsões preparadas com dispersões com concentração de IPAM de 1% e 0,5%. Além disso, apesar das proteínas do IPAM não apresentarem solubilidade máxima nos valores de pH testados, foi possível obter emulsões com bons IAE e estabilidade.

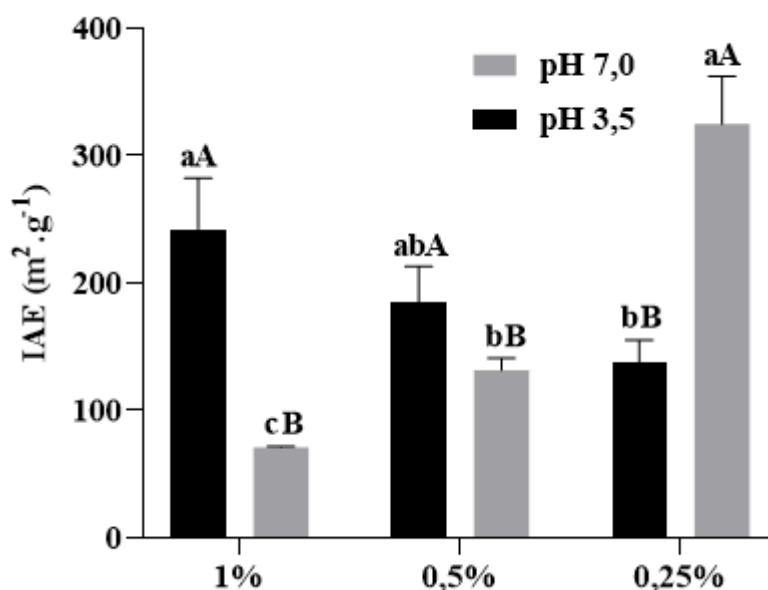


Figura 13: Índice da atividade emulsificante.

Os resultados foram expressos como médias e as barras indicam o desvio padrão ( $n=3$ ). As letras minúsculas referem-se à comparação entre média dos tratamentos no mesmo valor de pH pelo teste de Tukey (5% de probabilidade). As letras maiúsculas referem-se à comparação entre os tratamentos com mesma concentração proteica em diferentes valores de pH pelo teste T não pareado (5% de probabilidade).

### 5.5.3.2. Microestrutura

As microfotografias observadas com uma ampliação  $\times 100$  revelaram comportamentos das emulsões O/A preparadas com as diferentes concentrações de IPAM disperso na sua fase contínua em diferentes valores de pH. As microestruturas das emulsões contínuas são mostradas na figura 14. É possível observar nas micrografias correspondentes ao dia 0 que nas emulsões em pH 3,5 e fase contínua com concentração de IPAM de 1,0% e em pH 7,0 e fase contínua com concentração de 0,25% de IPAM (indicadas com a seta vermelha) apresentaram gotículas de lipídios menores que as demais no mesmo valor de pH. Essa observação corrobora os resultados do IAE já que, geralmente, quanto menor o tamanho das gotículas, melhor a capacidade emulsificante da proteína (Ladjal-ettoumi et al., 2015).

A figura 14 também mostra que o tamanho das gotículas de óleo é maior a partir do 14º dia de armazenamento em emulsões preparadas a partir de dispersões de IPAM a 0,25% (Setas verdes). O aumento do diâmetro das gotículas é resultado da coalescência, um processo irreversível que sucede a floculação em, que ocorre a fusão de duas ou mais gotículas de óleo formando uma só. A coalescência e a floculação são fatores que juntos levaram à desestabilização da emulsão (Soares et al., 2019, Oliveira et al., 2020).

A floculação ocorreu principalmente porque as interações hidrofóbicas possivelmente eram maiores que as forças repulsivas. As forças repulsivas das proteínas em suspensão podem ser fortemente correlacionadas com potencial  $\zeta$  (Soares et al., 2019, Bhattacharjee, 2016), e como pode ser observado na figura 7, nos valores de pH em que as emulsões foram preparadas é próximo a 25 mV, não sendo suficiente para evitar a cremação (figura 7).

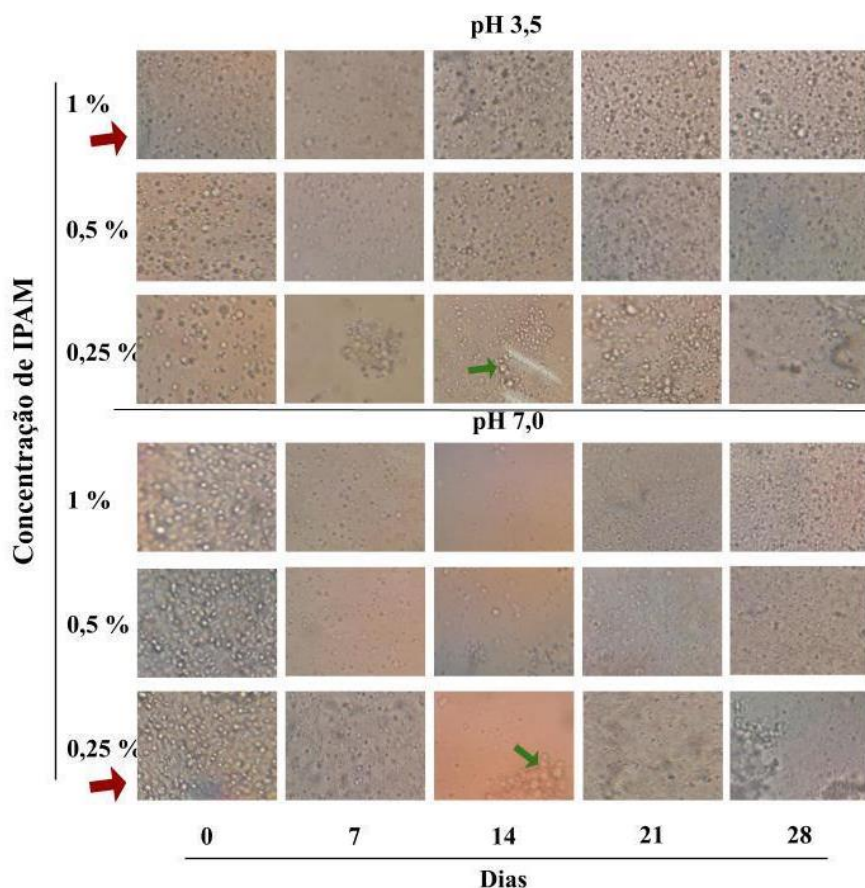


Figura 14: Microscopia óptica de emulsões produzidas a valores de pH 3,5 e 7,0 a partir de dispersões de isolado proteico de amêndoa de macaúba com diferentes concentrações.

### 5.5.3.3. Estabilidade macroscópica das emulsões

A extensão da cremação das emulsões O/A em diferentes valores de pH e contendo diferentes concentrações de IPAM na fase contínua foi avaliada através do índice de cremação (IC %). A desestabilização das emulsões foi avaliada através do monitoramento visual do desenvolvimento de uma fase superior durante vinte e oito dias de armazenamento à temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C).

A aparência visual das emulsões imediatamente após sua formação e armazenada por 28 dias está indicada na figura 15. Foi observado IC apenas nas emulsões preparadas a partir de dispersões de 0,25% de IPAM em pH 7,0 ( $45 \pm 5\%$ ). Além disso, apenas no dia 28 de armazenamento foi possível observar uma nítida separação de fases. Apesar de não ser possível identificar uma linha clara de cremeação nos outros sistemas, é possível observar que houve migração parcial das gotículas para a parte superior dos tubos nas emulsões com 0,25% de IPAM na fase contínua em pH 3,5 a partir do dia 14 de armazenamento (figura 15), que se intensificou até o fim do experimento.

A cremeação das emulsões é resultado da migração das partículas de óleo para a parte superior do tubo devido a menor densidade do óleo. A floculação e a coalescência podem contribuir para a cremeação, uma vez que o tamanho das gotículas influencia diretamente na sua migração para a parte superior dos recipientes (Soares et al., 2019). Além disso, a propriedade espessante que as proteínas possuem possivelmente influenciou positivamente para a estabilidade das emulsões com maiores concentrações de IPAM.

O aumento da viscosidade ocorre, pois, parte das proteínas permanecem dispersas na fase contínua após o processo de emulsificação. Portanto, emulsões com maiores concentrações de IPAM tendem a ter maiores concentrações de proteínas na fase contínua causaram o aumento da viscosidade, o que ajudou a impedir a aproximação das gotículas e conseqüentemente a coalescência e floculação (Damodaran, 2005, Sze-Tao & Sathe, 2000). Dessa maneira, é aconselhável utilizar maiores concentrações de IPAM formar emulsões que serão armazenadas por mais de 21 dias. Esses resultados indicam que apesar de ser possível formar emulsões a partir com baixas concentrações de proteínas, maiores concentrações de proteínas podem ser utilizadas para manter a emulsão estável por mais tempo.

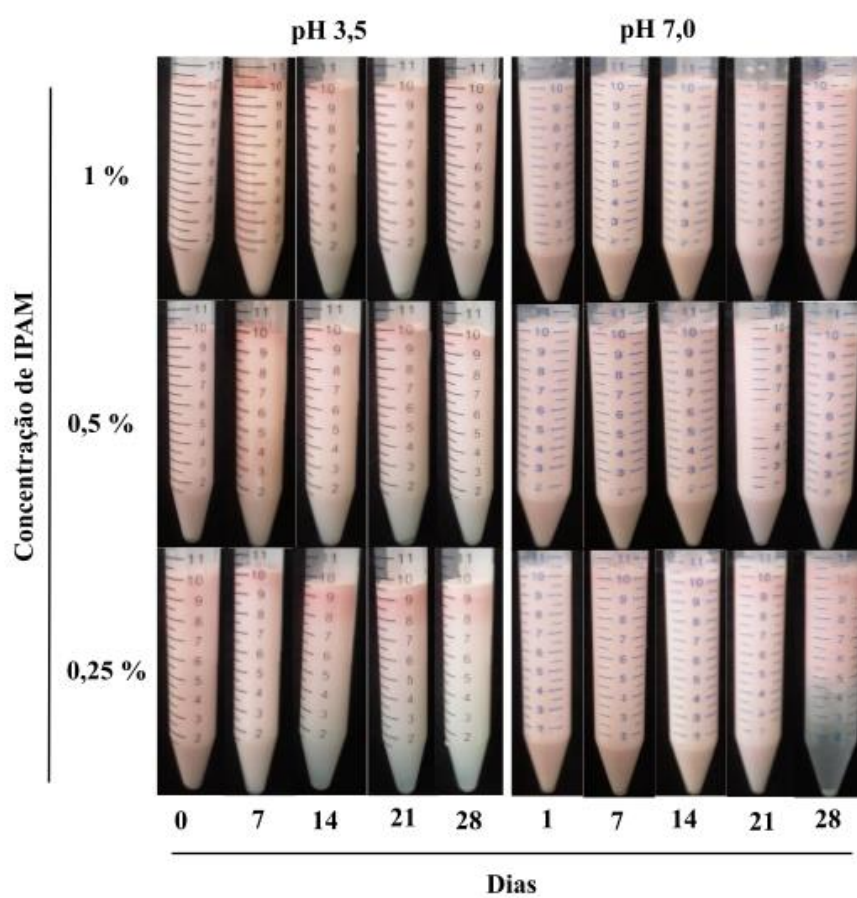


Figura 15: Aparência visual das emulsões nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 de armazenamento.

#### *5.5.4. Propriedades do gel*

Em concentrações maiores que 14% de IPAM foi possível formar um gel de proteínas firme a ponto de não escorrer do fundo dos recipientes (figura 16a). A menor concentração é frequentemente utilizada como uma indicação da capacidade de gelificação das proteínas alimentares. A formação de gel em baixas concentrações isolado indica uma melhor capacidade de gelificação do isolado para formar géis (Boye et al., 2010).

A gelificação de proteínas induzida pelo calor é um processo de múltiplos estágios que requer o desdobramento das moléculas nativas, desencadeado por temperaturas acima da temperatura de desnaturação da proteína que expõe locais de interação e assim formar novas interações intermoleculares (ou seja, ligação de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas) permitindo a formação de uma rede tridimensional (figura 16b) cujos interstícios são preenchidos por solvente (geralmente água) (Ahmed, 2015).

Uma vez que o grau de ligação intermolecular chega a um ponto onde se forma uma rede tridimensional contínua, a propriedade macroscópica de elasticidade é desenvolvida e o sistema é considerado um gel (Foegeding e Davis, 2011). Na figura 16b é possível observar essa rede tridimensional, representada pelas partes mais escuras, enquanto os interstícios vermelhos mais claros representam a água aprisionada nessa rede.

A quantidade mínima de gelificação do IPAM foi a mesma à requerida pelo isolado proteico de soja e o concentrado proteico de ervilha (Boye et al., 2010, Omura et al., 2021), o que é uma característica interessante, já que essas são algumas das principais proteínas utilizadas na indústria de alimentos (Lam et al., 2016). Contudo, existem diversos outros fatores, além da concentração de proteínas, que afetam a gelificação, como os fatores que afetam as interações intermoleculares e interações com outros componentes (Foegeding & Davis, 2011).

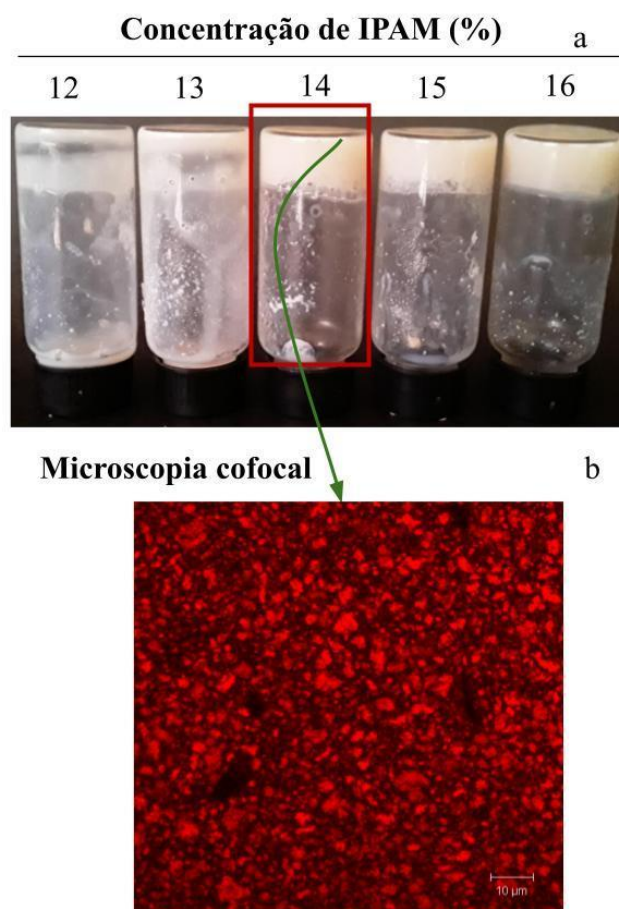


Figura 16: (a) menor concentração gelificante (destacado em vermelho) do isolado proteico de amêndoa de macaúba. (b) Microscopia cofocal do gel formado de 14% de IPAM.

## 6. CONCLUSÕES

Foi possível obter um isolado proteico de farinha de amêndoa de macaúba desengordurada com teor de proteínas de 94,9% utilizando somente a técnica de precipitação isoelétrica. O rendimento do processo foi de  $12,61 \pm 0,22\%$  de IPAM a partir da FDAM. O triptofano foi o único aminoácido limitante do IPAM, mas pode ser facilmente suprido através de uma alimentação diversificada. O IPAM apresentou maior capacidade de reter água do que óleo, o que pode ser positivo para suas propriedades técnico-funcionais. Além disso, o isolado foi capaz de formar emulsões e mantê-las estáveis em valores de pH 3,5 e 7,0, sendo que em pH 7,0 a concentração de 0,25% de IPAM proporcionou maior IAE e em pH 3,5 a concentração de 1,0% de IPAM foi a melhor. Além disso, maiores concentrações de proteínas proporcionam maior estabilidade às emulsões em todos os casos. O IPAM foi capaz de formar gel em concentração mínima de 14%. De forma geral, o IPAM demonstrou grande potencial para ser usado na produção de alimentos “plant based” como um ingrediente funcional.

## 7. REFERÊNCIAS

Aguilera, V., Viedma, S. E., Vega, C. N., & Cazzola, M. F. (2018). Propiedades fisicoquímicas y de procesamiento de la pulpa de coco (*Acrocomia aculeata*) para su aplicación como ingrediente en un producto alimenticio. *Investigación Agraria*, 20(1), 51-57. <http://dx.doi.org/10.18004/investig.agrar.2018.junio.51-57>.

Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.

Alemayehu, F. R., Bendevis, M. A., & Jacobsen, S. E. (2015). The potential for utilizing the seed crop amaranth (*Amaranthus* spp.) in East Africa as an alternative crop to support food security and climate change mitigation. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 201(5), 321–329. <https://doi.org/10.1111/jac.12108>.

Alezandro, M. R., Granato, D., Lajolo, F. M. & Genovese, M. I. (2011). Nutritional Aspects of Second Generation Soy Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5490–5497. <https://doi.org/10.1021/jf200061c>.

Almeida, S. P., Proença, C. E. B., Sano, S. M., & Ribeiro, J. F. (1998). Cerrado: espécies vegetais úteis. *Embrapa-CPAC*, 14-19.

Alves, E. da S., Saqueti, B. H. F., Artilha, C. A. F., da Silva, D. D. M. B., de Sousa, L. C. S., & Visentainer, J. V. (2020). Vegetable proteins as functional foods—review. *Brazilian Journal of Development*, 6, 5869–5879. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n2-043>.

Amagliani, L., O'Regan, J. K., Alan, L., & O'Mahony, J. A. (2017). The composition, extraction, functionality, and applications of rice proteins: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.008>.

Amaral, F. P. do, Broetto, F., Batistella, C. B., & Jorge, S. M. A. (2011). Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amêndoas de frutos de macaúba [*Acrocomia aculeata* (jacq) lodd. ex mart] coletada na região de Botucatu, SP. *Revista Energia na Agricultura*, 26(1), 12-20. <https://doi.org/10.17224/EnergAgric.2011v26n1p12-20>.

Amirshaghghi, Z., Rezaei, K., & Rezaei, M. H. (2017). Characterization and functional properties of protein isolates from wild almond. *Food Measure*, *11*, 1725–1733. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9553-y>.

Andoyo, R., Guyomarc'h, F., Cauty, C., & Famelart M., H. (2014). Model mixtures evidence the respective roles of whey protein particles and casein micelles during acid gelation. *Food Hydrocolloids*, *37*, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.019>.

Andrade, A. C., Marinho, J. F. U., Solza, A. G. de, Tavares, T. de S., Dias, D. R., Schwam, R. F., Nunes, C. A., & Bastos, S. C. (2020). Prebiotic potential of pulp and kernel cake from Jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and Macaúba palm fruits (*Acrocomia aculeata*). *Food Research International*, *136*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109595>.

AOAC (2005). Association of Official Methods Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association Chemists. 18th ed. Maryland.

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, *235*, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.

Bodily, H. L. (1956). Official methods of analysis of the association of official agricultural Chemists. *American Journal of Public Health and the Nation's Health*, *46*, 916–916. <https://doi.org/10.2105/ajph.46.7.916-a>.

Boire, A., Bouchoux, A., Bouhallab, S., Chapeau, A. L., Croguennec, T., Ferraro, V. Anton, M. (2018). Proteins for the future: A soft matter approach to link basic knowledge and innovative applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *46*, 18–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.012>.

Bora, P. S., & Neto, V. Q. (2004). Functionality of native and denatured cashew nut kernel protein isolates at isoelectric pH as a function of salt concentration. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*(15), 2022–2027. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1905>.

Bourne, M. C. (1978). Texture Profile Analysis. *Food Technology*, *32*, 62-66, 72.

Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein

concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>.

Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108, 183–211. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002309>.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Braga, J. M., & DeFelipo, B. V. (1974). Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. *Revista Ceres*, 21(113), 73–85.

BRASIL. Resolução RDC nº268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos proteicos de origem vegetal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 de setembro de 2005.

Cam, A., de Mejia E. G. (2012). Role of dietary proteins and peptides in cardiovascular disease. *Molecular Nutrition & Food Research*. 56(1), 53-66. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100535>.

Cangani, A., & Tavares, G. (2019). Mixing animal and plant proteins: Is this a way to improve protein techno-functionalities?. *Food Hydrocolloids*, 97. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.06.016>.

César, A. da S., Almeida, F. de A., de Souza, R. P., Silva, G. C., Atabani, A. E. (2015). The prospects of using *Acrocomia aculeata* (macaúba) a non-edible biodiesel feedstock in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 49(), 1213–1220.

Chandí, G. K., & Sogi, D. (2007). Functional properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Engineering*. 79(2), 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.018>.

Chen, L. Sheng, M., & Gouda, M. Ma. (2019). Studies on foaming and physicochemical properties of egg white during cold storage. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 582. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123916>.

Chiang, W., Shih, C. & Chu, Y. (1999). Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. *Food Chemistry*, 65(2), 189–194. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00193-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00193-9).

Ciconini, C., Favaro, S. P., Souza, C. F. T., Miyahira, M. A. M., Corrêa, A., Plein, G. S., Souza, J. L. C., & Santos, G. P. (2010). Óleo da polpa de macaúba: variabilidade das características físico-químicas em plantas do Mato Grosso do Sul. In: IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas.

Ciconini, G., Favaro, S. P., Roscoe, R., Miranda, C. H. B., Tapeti, C. F., Miyahira, M. A. M., Bearari, L., Galvani, F., Borsato, A. V., Colnago, L. A., & Naka, M. H. (2013). Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrados and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Industrial Crops and Products*, 45, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.008>.

Coimbra, M. C., & Jorge, N. (2012). Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleraceae*), jervivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 679–684. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4630>.

Coimbra, M.C. & Jorge, N. (2011). Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jervivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. *Food Research International*, 44, 2139–2142. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.032>.

Damodaran, S. (2005). Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *Journal of Food Science*, 70(3), 54-66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x>.

Dessimoni-Pinto, N. A. V., Silva, V. M. da, Batista, A. G., Vieira, G., Souza, C. R. D., Dumont, P. V., Santos, G. K. M. dos. (2010). Características físico-químicas da amêndoa de macaúba e seu aproveitamento na elaboração de barras de cereais. *Alimentos e Nutrição*, 21, 77-94.

Du, M., et al., 2018. Extraction, physicochemical characteristics, and functional properties of Mung bean protein. *Food hydrocolloids*, 76, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.003>.

FAO/WHO. (2013). Dietary protein quality evaluation in human nutrition Report of an FAO Expert Consultation (pp. 20–29). Rome: Food and Agriculture Organizations and the World Health Organization. *Food and Nutrition Paper no. 92*.

Farias, T. M. (2010). Biometria e processamento dos frutos da macaúba (*Acrocomia sp*) para a produção de óleos. FEQ – EE – UFMG. Belo Horizonte, MG. Brasil, 1(1), 0-93.

Fasolin, L. H., Pereira, R. N., Pinheiro, A. C., Martins, J. T., Andrade, C. C. P., Ramos, O. L., & Vicente, A. A. (2019). Emergent food proteins – Towards sustainability, health and innovation. *Food Research International*. *Food Research International*, 125, 108586. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108586>.

Fernandes, V. (2019). Cargill reforça aposta em mercado de proteínas vegetais.pdf. 843 <https://www.moneytimes.com.br/cargill-reforca-aposta-em-mercado-de-proteinas-vegetais/>

Foegeding, E. A., & Davis, J. P. (2011). Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocolloids*, 25, 1853–1864. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.008>.

Foods, A., Corporation, B. N., Nemours, E. I. D. P. De, Incorporated, I., & Group, K. (2020).

Garcia-Vaquero, M., Lopez-Alonso, M., & Hayes, M. (2016). Assessment of the functional properties of protein extracted from the brown seaweed *Himantalia elongata* (Linnaeus) SF Gray. *Food Research International*, 99, 971-978. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.023>.

Gargnin, A., Junqueira, N.T.V., Fogaça, C.M. (2008). Potencial da macaubeira como fonte de matéria-prima para produção de biodiesel. Planaltina, DF: *Embrapa Cerrados*.

Global Plant Protein Market (2018 to 2027) - CAGR of 6. 2 % Expected During the Forecast Period - ResearchAndMarkets. (2020). Retrieved from <https://www.businesswire.com/news/home/20200318005505/en/Global-Plant-Protein-Market-2018-2027-->. Acessado em 8 de janeiro de 2022.

Gonçalves, T., Filbido, G., Oliveira, A. P., Piereti, P., Villa, R., & Oliveira, A. (2020). In vitro bioaccessibility of the Cu, Fe, Mn and Zn in the baru almond and bocaiúva pulp and macronutrients characterization. *Journal of Food Composition and Analysis*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103356>.

González, A. D., Frostell, B., & Carlsson-Kanyama, A. (2011). Protein efficiency per unit energy and per unit greenhouse gas emissions: Potential contribution of diet choices to climate change mitigation. *Food Policy*, 36(5), 562–570. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2011.07.003>.

Grande, S. C., & Cren, E. C. (2016). Demanda de proteínas vegetais: potencialidades e o diferencial dos farelos de macaúba (revisão). *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 2, 190-214. <https://doi.org/10.18540/jcecvl2iss3pp190-214>.

Guasch-Ferré, M., Zong, G., Willett, W. C., Zock, P. L., Wanders, A. J., Hu, F. B., Sun, Q. (2019). Associations of monounsaturated fatty acids from plant and animal sources with total and cause-specific mortality in two US prospective cohort studies. *Circulation Research*, 124(8), 1266-75. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313996>.

Henderson, A., Galeano, G., & Bernal, R. (1995). Field guide to the palms of the Americas.

Hiane, P. A., Baldasso, P. A., Marangoni, S., & Macedo, M. L. R. (2006a). Chemical and nutritional evaluation of kernels of bocaiuva, *acrocomia aculeata* (jacq.) lodd. *Ciências Tecnologia de Alimentos*, 26, 683–689. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000300031>.

Hiane, P. A., Macedo, M. L. R., Silva, G. M., & Neto, J. A. B. (2006b). Avaliação nutricional da proteína de amêndoas de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., em ratos Wistar em crescimento. *B.CEPPA*, 24 (1), 191-206. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v24i1.5277>.

Jiang, L., Wang, Z., Li, Y., Meng, X., Sui, X., Qi, B., & Zhou, L. (2015). Relationship between surface hydrophobicity and structure of soy protein isolate subjected to different ionic strength. *International Journal of Food Properties*, 18(5), 1059–1074. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.865057>.

Kalman D. S. (2014). Amino Acid Composition of an Organic Brown Rice Protein Concentrate and Isolate Compared to Soy and Whey Concentrates and Isolates. *Foods*, 3, 394–402. <https://doi.org/10.3390/foods3030394>.

Karki, B., Lamsal, B.P., Grewell, D. Pometto, A. L., Khanal, S. M., Leeuwen, J. V., & Jung, S. (2009). Functional Properties of Soy Protein Isolates Produced from Ultrasonicated Defatted Soy Flakes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 1021–1028. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1433-0>.

- Kato, A., & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624, 13–20. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(80\)90220-2](https://doi.org/10.1016/0005-2795(80)90220-2).
- Kawakatsu, T., & Takaiwa, F. (2019). Rice proteins and essential amino acids. *Rice*, 4, 109–130. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811508-4.00004-6>.
- Kochhar, J. S., Zou, S., Chan, S. Y., & Kang, L. (2012). Protein encapsulation in polymeric microneedles by photolithography. *International journal of nanomedicine*, 7, 3143–3154. <https://doi.org/10.2147/IJN.S32000>.
- Kwon, K., Park, K. H., & Rhee, K. C. (1996). Fractionation and Characterization of Proteins from Coconut (*Cocos nucifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), 1741–1745. <https://doi.org/10.1021/jf9504273>.
- Ladjal-ettoumi, Y., Boudries, H., Chibane, M., & Romero, A. (2015). Pea, Chickpea and Lentil Protein Isolates: Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties. *Food Biophysics*, 11, 43–51. <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9411-6>.
- Laemmli, U. K. (1970). © 1970 Nature Publishing Group. *Nature Publishing Group*, 227, 680–685. <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-change-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certain-antibiotics/>
- Lam, A. C. Y., Can Karaca, A., Tyler, R. T., & Nickerson, M. T. (2016). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, 34, 126–147. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1242135>.
- Le, X. T., Rioux, L.-E., & Turgeon, S. L. (2017). Formation and functional properties of protein–polysaccharide electrostatic hydrogels in comparison to protein or polysaccharide hydrogels. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.04.006>.
- Lescano, C. H., Oliveir, I. P., Silva, L. R., Baldivia, D. S., Sanjinez-Argandona, E. J., Arruda, E. J., Moraes, I. C. F., & Lima, F. F. (2015). Nutrients contents, characterization and oil extraction from *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd fruits. *African Journal of Food Science*, 9(3), 113–119. <https://doi.org/10.5897/AJFS2014.1212>.

Lieb, V. M., Schex, R., Esquivel, P., Jiménez, V. M., Schmarr, H.-G., Carle, R., & Steingass, C. B. (2019). Fatty acids and triacylglycerols in the mesocarp and kernel oils of maturing Costa Rican *Acrocomia aculeata* fruits. *NFS Journal*, 14-15, 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.02.002>.

Lima, J. R., Lima, L. V. de, Araújo, I. M. da S., Rodrigues, M. do C. P. (2019). Obtenção de concentrado e isolado proteicos de amêndoa de castanha-de-caju. Embrapa, *Comunicado Técnico 249*. ISSN 1679-6535.

Liu, H. J., Chang, B. J., Yan, H. W., Yu, F. H., & Liu, X. X. (1995). Determination of Amino Acids in Food and Feed by Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate and Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 78(3), 736–743. <https://doi.org/10.1093/jaoac/78.3.736>.

Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O., & Jensen, I. J. (2018). Protein determination method matters. *Foods*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/foods7010005>.

Maltais A, Remondetto GE, Subirade M. Mechanisms involved in the formation and structure of soya protein cold-set gels: a molecular and supramolecular investigation. *Food Hydrocolloids*. 2008;22:550-9.

Menegotto, A. L. L., Souza, L. E. S. de, Colla, L. M., Costa, J. A. V., Sehn, E., Bittencourt, P. R. S., Flores, E. L. de M., Canan, C., & Colla, E. (2019). Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment. *LWT - Food Science and Technology*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108267>.

Mesa-Stonestreet, N. J. de, Alavi, S., & Bean, S. R. (2010). Sorghum Proteins: The Concentration, Isolation, Modification, and Food Applications of Kafirins. *Food Science*, 75(5), 90–104. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01623.x>.

Millward, D. (1999). The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58, 249–260. <https://doi:10.1017/S0029665199000348>.

Mota, C. S., Corrêa, T. R., Grossi, J. A. S., Castricini, A., Ribeiro, A. Da S. (2011). Exploração sustentável da macaúba para produção de biodiesel: Colheita, pós-colheita e qualidade dos frutos. *Informe demográfico, Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, (32), 265, 41-51.

Munhoz, C. L., Guimarães, R. de C. A., Nozaki, V. T., Sanjinez-Argandoña, E. J., & Macedo, M. L. R. (2018). Composição química e de fatores antinutricionais de frutos de bocaiuva. *Ambiência*, *14*, 212–224. <http://dx.doi.org/10.5935/ambiencia.2018.15.01>.

Nasrabadi, M. N., Doost, A. S., & Mezzenga, R. (2021). Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products. *Food Hydrocolloids*, *118*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106789>.

Nucci, S.M., Azevedo-Filho, J.A., Colombo, C.A., Priolli, R.H.G., Coelho, R.M., Mata, T.L. & Zucchi, M.I. (2008). Development and characterization of microsatellites markers from the macaw. *Molecular Ecology Resources*, *8*(1), 224–226. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01932.x>.

Oliete, B., Potin, F., Cases, E., & Saurel, R. (2018). Modulation of the emulsifying properties of pea globulin soluble aggregates by dynamic high-pressure fluidization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *47*, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.015>.

Oliveira, A. P. H., Omura, M. H., Barbosa, E. A., Bressan, G. C., Vieira, E. N. R., Coimbra, J. S. R., & Oliveira, E. B. (2020). Combined adjustment of pH and ultrasound treatments modify techno-functionalities of pea protein concentrates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *603*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125156>.

Omura, M. H., Oliveira, A. P. de, Soares, L. de S., Coimbra, J. S. dos R., Barros, F. A. R. de, Vidiga, M. C. T. R., Baracat-Pereira, M. C., & Oliveira, E. B. de. (2021). Effects of protein concentration during ultrasonic processing on physicochemical properties and techno-functionality of plant food proteins. *Food Hydrocolloids*, *113*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106457>

Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *26*(3), 716–723. <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>.

Pedrosa, M.M., Varela, A., Domínguez-Timón, F., Tovar, C. A., Moreno H. M., Baderías, A. J. & Días, M. T. (2020). Comparison of Bioactive Compounds Content and Techno-Functional Properties of Pea and Bean Flours and their Protein Isolates. *Plant Foods for Human Nutrition*, *75*, 642–650. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00866-4>.

- Pimenta, T. V., Andrade, M. H. C., & Antoniassi, R. (2012). Extração, neutralização e caracterização dos óleos do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata*). XIV Congresso Brasileiro De Engenharia Química, 2012. Escola de Engenharia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1, 4031-4040.
- Pimentel, L. D., Manfio, C. E., Motoike, S. Y., Paes, J. M. V., & Bruckner, C. H. (2011). Coeficientes técnicos e custos de produção do cultivo da macaúba. *Informe agropecuário*, 32(265), 61-9.
- Pires, C. V., Oliveira, M. G. de A., Rosa, J. C., & Costa, N. M. B. (2006). Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. *Food Science and Technology*, 26, 179–187. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000100029>.
- Qamar, S., Manrique, Y. J., Parekh, H., & Falconer, J. R. (2019): Nuts, cereals, seeds and legumes proteins derived emulsifiers as a source of plant protein beverages: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60 (16), 2742-2762. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1657062>.
- Ramos, M. I. L., Filho, M. M. R., Hiane, P. A., Neto, J. A. B., & Siqueira, E. M. de A.. (2008). Qualidade nutricional da polpa de bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Food Science and Technology*, 28, 90-94. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000500015>.
- Rodrigues, I., Coelho, J., & Carvalho, M.G. (2012). Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*, 109, 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.027>.
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2019). Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 3367-3386. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1688249>
- Sá, A. G., Moreno, Y. M., & Carciofi, B. A. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>
- Sanjinez-Argandona, E. J., & Chuba, C. A. M. (2011). Caracterização biométrica, física e química de frutos da palmeira bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(3), 1023-1028. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000300040>.

Sarruge, J. R., & Haag, H. P. (1974). *Análises químicas em plantas*. Piracicaba.

Scariot, A., Lleras, E., & Hay, J. D. (1995). Flowering and fruiting phenologies of the palm *Acrocomia aculeata*: patterns and consequences. *Biotropica*, 27(2), 168-173. <https://doi.org/10.2307/2388992>.

Silva, S. H. T., Bader-Mittermaier, S., Silva, L. B., Doer, G., & Eisnera, P. (2021). Electrophoretic characterization, amino acid composition and solubility properties of Macauba (*Acrocomia aculeata* L.) kernel globulins. *Food Bioscience*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100908>.

Silveira, A., Queiroz, L., Fonseca, R., Teixeira, N., Melo, A., Laboissière, L., & Andrade, M. (2014, October). *Aproveitamento da torta da amêndoa da macaúba (acrocomia aculeata) para produção de biscoito tipo “cookie”*. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 1, 4035-4043. <http://dx.doi.org/10.1016/chemeng-cobeq2014-0880-22877-176294>

Silveira, A., Queiroz, L., Fonseca, R., Teixeira, N., Melo, A., Laboissière, L., Andrade, M. (2014). *Aproveitamento da torta da amêndoa da macaúba (acrocomia aculeata) para produção de biscoito tipo “cookie”*. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 1. 10.5151/chemeng-cobeq2014-0880-22877-176294.

Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S.N., Bawa, A. S. (2008). Functional and edible uses of soy protein products.,7, 14–28. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00025.x>.

Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. *Meth Enzymology*, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).

Soares, L. de S., Milião, G. L., Tonole, B., de Souza, G. B., Soares, N. de F. F., Teixeira, A. V. N. de C., Coimbra, J. S. dos R., & de Oliveira, E. B. (2019). Chitosan dispersed in aqueous solutions of acetic, glycolic, propionic or lactic acid as a thickener/stabilizer agent of O/W emulsions produced by ultrasonic homogenization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104754> 973.

Stone, A. K., Avarmenko, N. A., Warkentin, T. D. & Nickerson, M. T. (2015a). Functional properties of protein isolates from different pea cultivars. *Food Science and Biotechnology*, 24(3), 827–833. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0107-y>.

Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2015b). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, 76, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.017>.

Sze-Tao, K. W. C., & Sathe, S. K. (2000). Functional properties and in vitro digestibility of almond (*Prunus dulcis* L.) protein isolate. *Food Chemistry*, 69(2), 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00244-7).

Teles, H. De F., Pires, L. L., Garcia, J., Rosa, J. Q. S., Farias, J. G., & Naves, R. V. (2011). Ambientes de ocorrência natural de macaúba. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 41(42), 595–601.

Tilahun, W. W., Grossi, J. A. S., Favaro, S. P., Sedyama, C. S., Goulart, S. de D., Pimentel, L. D., & Motoike, S. D. (2019). Increase in oil content and changes in quality of macauba mesocarp oil along storage. *Research Article*, 26. <http://dx.doi.org/10.1051/ocl/2019014>

Velickovic, T. D. C., & Stanic-Vucinic, D. J. S. (2018). The Role of Dietary Phenolic Compounds in Protein Digestion and Processing Technologies to Improve Their Antinutritive Properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 82–103. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12320>.

Xiong, T., Xiong, W., Ge, M., Xia, J., Li, B., & Chen, Y. (2018). Effect of high intensity ultrasound on structure and foaming properties of pea protein isolate. *Food Research International*, 109, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.044>

Xiong, W., Wang, Y., Zhang, C., Wan, J., Shah, B. R., Pei, Y., Zhou, B., Li, J., Li, B. (2016). High intensity ultrasound modified ovalbumin: Structure, interface and gelation properties, *Ultrason. Sonochem.* 31 (2016) 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.014>.

Zhang, L., Pan, Z., Shen, K., Cai, X., Zheng, B. & Miao, S. (2018). Influence of ultrasound-assisted alkali treatment on the structural properties and functionalities of rice protein. *Journal of Cereal Science*, 79, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.10.013>.

Télliez-Morales, J. A.; Hernández-Santo, B.; Rodríguez-Miranda, J. Effect of ultrasound on the techno-functional properties of food components/ingredients: A review. *Ultrasonics. Sonochemistry*, 61, September 2019, 2020.

Zhao, X. et al. Rheological and physical properties of O/W protein emulsions stabilized by isoelectric solubilization/precipitation isolated protein: The underlying effects of varying protein concentrations. *Food Hydrocolloids*, p. 1–10, 2018.