

SANDRA MARIA SILVEIRA DENADAI

**Estudo nutricional *in vivo* e *in vitro*,
com ênfase em proteínas antinutricionais e
tóxicas, de amêndoas de sapucaia
(*Lecythis pisonis*, Camb.)**

CAMPO GRANDE – MS

2006

SANDRA MARIA SILVEIRA DENADAI

**Estudo nutricional *in vivo* e *in vitro*,
com ênfase em proteínas antinutricionais e
tóxicas, de amêndoas de sapucaia
(*Lecythis pisonis*, Camb.)**

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA
MULTIINSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE - CONVÊNIO REDE CENTRO-
OESTE - UnB/UFG/UFMS, PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR
EM CIÊNCIAS DA SAÚDE.

Orientadora: Prof^ª Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

CAMPO GRANDE – MS

2006

Catálogo na Publicação

Denadai, Sandra Maria Silveira

Estudo nutricional *in vivo* e *in vitro*, com ênfase em proteínas antinutricionais e tóxicas, de amêndoas e sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.). Campo Grande-MS – 2006.

148p.

Tese de Doutorado – Pós-graduação em Ciências da Saúde – Convênio Rede Centro-Oeste – Universidade de Brasília – Universidade Federal de Goiás – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

1. composição química 2. proteínas 3. índices biológicos 4. amêndoas de sapucaia (*Lecythis pisonis*)

1. proximate composition 2. proteins 3. biological indices 4. sapucaia nuts (*Lecythis pisonis*).

“Permitida a reprodução total ou parcial deste documento, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte”

Sandra Maria Silveira Denadai

Estudo nutricional *in vivo* e *in vitro*, com ênfase em proteínas antinutricionais e tóxicas, de amêndoas de sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.).

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo - Presidente

Dra. Maria das Graças Machado Freire

Dra. Marize Terezinha Lopes Pereira Peres

Dra. Iandara Schettert Silva

Dr. José Antônio Braga Neto

Dra. Neli Kika Honda - Suplente

Campo Grande-MS, 20 de junho de 2006.

Dedico à

José Márcio, meu inesquecível esposo e companheiro,

que jamais deixou-me desistir dos sonhos.

Adriana, Amanda e Arielle, minhas filhas e

Gabrielle e Raolla, minhas netas,

seres que iluminam e dão significado a minha vida

e a quem devo a felicidade de amar e ser amada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo dom da vida e por serem responsáveis pela minha formação.

À Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo, pela amizade, confiança na minha capacidade, pelo apoio, oportunidade concedida, e orientação dedicada e competente.

À Priscila Aiko Hiane e José Antônio Braga Neto, pela amizade, apoio e assessoria constante.

À Rosa Maria Fernandes de Barros, pela amizade, dedicação, apoio e estímulo, principalmente nos momentos difíceis.

À Darli Castro Costa, Osmar Ferreira de Andrade e Kelly Cristina Neves dos Santos, pela importante contribuição técnica, e eficiência e capacidade com que desenvolveram seu trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela acolhida e assistência permanente.

Aos professores e funcionários do Departamento de Morfofisiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em especial aos professores da disciplina de Bioquímica, pelo apoio e incentivo.

À Dra. Ana Maria Rauen de Oliveira Miguel do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-

SP e ao Dr. Gustavo Eugênio Gerhard Barrocas do Laboratório de Nutrição Animal da EMBRAPA-Gado de Corte, Campo Grande-MS, pela colaboração técnica.

Ao Dr. Ricardo Aydos, coordenador, e à Vera Almeida, secretária do Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Convênio Rede Centro-Oeste – na UFMS, que procuraram sempre resolver os problemas que surgiram.

À PROPP/UFMS (Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul), FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FINEP-MCT (Financiamento de Estudos e Projetos-Ministério da Ciência e Tecnologia) pelo suporte financeiro nesta pesquisa.

E a todos, que não mencionei, mas que estiveram presentes nesta caminhada, o meu agradecimento.

“Não vou cantar em hinos o valor da sapucaia, mas... seu fruto é todo aproveitado: a caçamba é marmita, pote, vasilha, enfim; a polpa é comível, medicinal e altamente alimentícia; as sementes ou castanha de sapucaia têm bom paladar, dão magnífico óleo, é alimento substancial; a folha em cinzas emprega-se como bom adubo; as raízes têm aplicação terapêutica.”

Eurico Teixeira

RESUMO

As proteínas devem estar presentes na alimentação em quantidade adequada. Além do aspecto quantitativo deve-se levar em conta o aspecto qualitativo, isto é, seu valor nutricional, que depende de sua composição, digestibilidade, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, ausência de toxicidade e de fatores antinutricionais. Neste estudo amêndoas de sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.) foram analisadas para se determinar a sua composição centesimal, fatores antinutricionais, e o teor e o escore químico (EQ) de aminoácidos, digestibilidade *in vitro* e *in vivo* e os índices de aproveitamento biológico (Balanço Nitrogenado-BN, Coeficiente de Eficiência Alimentar-CEA, Razão de Eficiência Protéica-PER e Valor Biológico-VB) de suas proteínas, para se avaliar seu potencial como fonte alternativa de proteínas. As amêndoas apresentaram teores de aminoácidos, principalmente sulfurados (metionina + cisteína – 105 mg/g), acima dos recomendados, nenhum aminoácido limitante foi encontrado. O teor de ácidos graxos insaturados (ácido linoléico - 42,5%), foi maior que os recomendados e baixos teores de minerais e fibras foram observados. No presente estudo, a presença de lectinas ou inibidores de proteinases, quando detectados, apresentaram baixos níveis. A digestibilidade *in vitro* de globulinas, nativas ou aquecidas, por proteinases digestivas de mamíferos foi realizada utilizando-se tripsina + quimotripsina + peptidase, obtendo-se valores aproximados de 71,5% e 73,5%, respectivamente. Os indicadores de aproveitamento biológico, a digestibilidade verdadeira e a digestibilidade protéica corrigida escore de aminoácidos-PDCAAS de suas proteínas, foram estudados utilizando-se ratos e se apresentaram semelhantes aos índices da caseína. Estes resultados sugerem

que as amêndoas de sapucaia podem ser utilizadas como fonte alternativa de proteína de bom valor nutricional e de lipídeos, por humanos e animais.

Palavras-chaves: composição química, proteínas, índices biológicos, amêndoas de sapucaia (*Lecythis pisonis*)

ABSTRACT

Proteins must be present in diet, in appropriate amounts. Besides the quantitative aspect, the qualitative aspect should be taken into account, i.e. its nutritional value, which will depend on its composition, digestibility, bioavailability of essential amino acids, absence of toxicity, and of antinutritional factors. In this study sapucaia nuts (*Lecythis pisonis* Camb.) were analyzed to determine its proximate composition, antinutritional factors and the amino acid profile and score, *in vitro* and *in vivo* digestibility and biological utilization indices (Nitrogen Balance-NB, Alimentary Efficiency Coefficient-AEC, Protein Efficiency Ratio-PER and Biological Value-BV) of its proteins, in order to evaluate their potential as an alternative source of proteins. Nuts presented amino acids profile, principally sulfurized (methionine + cysteine - 105 mg/g) higher than the recommended, no limiting amino acids were found. Content unsaturated fatty acids (linoleic acid – 42.5%) were higher than the recommended and low amounts of minerals and fiber were observed. In the present study, lectins or proteinase inhibitors, when detected, showed low levels. *In vitro* digestibility of native and heated globulins by mammalian digestive proteinases were carried out utilizing trypsin + chymotrypsin + peptidase, with resulting values of approximately 71.5% and 73.5%, respectively. Biological utilization indices, the true digestibility and protein digestibility-corrected amino acid score of the proteins were analyzed utilizing rats and presented similar indices of the casein. Taken together, the results suggest that sapucaia nuts may provide alternative source of good nutritional value protein and fat, for use as a potential nutritional agent by humans and animals.

Keywords: proximate composition, biological indices, proteins, sapucaia nuts (*Lecythis pisonis*).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Conteúdo e escore químico de aminoácidos essenciais da caseína.....	41
Tabela 2	– Valores da digestibilidade verdadeira de proteínas no homem.....	51
Tabela 3	– Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos Essenciais (PDCAAS) de algumas proteínas alimentares.....	53
Tabela 4	– Valor da Razão de Eficiência Protéica (PER) para algumas proteínas alimentares.....	55
Tabela 5	– Valor biológico de algumas proteínas alimentares.....	56
Tabela 6	– Ingredientes necessários para o preparo de 100 g de ração.....	66
Tabela 7	– Composição centesimal em 100g da farinha integral de amêndoas de sapucaia (<i>Lecythis pisonis</i> Camb.).....	75
Tabela 8	– Teores de ácidos graxos das amêndoas de sapucaia (<i>Lecythis pisonis</i> , Camb.), expresso em g/100 g.....	77
Tabela 9	– Conteúdo de macro e microminerais das amêndoas de sapucaia (<i>Lecythis pisonis</i> , Camb.).....	80
Tabela 10	– Composição de aminoácidos das proteínas das amêndoas de sapucaia (<i>Lecythis pisonis</i> , Camb.), em mg/g de proteína.....	82
Tabela 11	– Escore químico de aminoácidos das proteínas das amêndoas de sapucaia (<i>Lecythis pisonis</i> , Camb.).....	84
Tabela 12	– Atividade de inibição de proteinases e de	

	hemaglutinação das proteínas de amêndoas de sapucaia (<i>Lecythis pisonis</i> , Camb.).....	86
Tabela 13 –	Digestibilidade <i>in vitro</i> das globulinas e caseína nativas e aquecidas das amêndoas de sapucaia (<i>Lecythis pisonis</i> , Camb.).....	88
Tabela 14 –	Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos para avaliação nutricional da farinha de sapucaia, expressas em g/100 g de ração.....	89
Tabela 15 –	Consumo de dieta, variação de peso e total de fezes produzidas pelos ratos alimentados com dieta aprotéica, controle e teste.....	90
Tabela 16 –	Digestibilidade verdadeira e digestibilidade protéica corrigida pelo escore de aminoácidos essenciais (PDCAAS) das proteínas de dietas contendo caseína e sapucaia.....	92
Tabela 17 –	Quantidade de proteína consumida (g) e percentagem de nitrogênio nas dietas ingeridas pelos ratos durante o período de teste.....	94
Tabela 18 –	Balanço de nitrogênio para ratos alimentado com dieta controle e teste.....	95
Tabela 19 –	Índices de aproveitamento biológico (PER, CEA, VB) da proteína de dietas contendo caseína e sapucaia.....	96

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Árvore da sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.)..... 26
- Figura 2** – Figura do fruto da sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.), ainda na árvore, mostrando as folhas rosa e flores roxas características da sapucaia na primavera..... 27
- Figura 3** – Fruto maduro da sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.), mostrando o opérculo aberto, a polpa e as amêndoas em seu interior. No detalhe amêndoas com casca e descascadas..... 28

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Equação para o cálculo do Escore Químico de Aminoácidos.....	64
Equação 2 – Equação para o cálculo da Digestibilidade Protéica Verdadeira.....	70
Equação 3 – Equação para o cálculo da Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos.....	71
Equação 4 – Equação para o cálculo do Balanço Nitrogenado.....	71
Equação 5 - Equação para o cálculo da Razão de Eficiência Protéica...	71
Equação 6 - Equação para o cálculo do Valor Biológico.....	72
Equação 7 - Equação para o cálculo do Coeficiente de Eficiência Alimentar.....	72

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	20
1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	21
2 – SAPUCAIA.....	24
3 – CONSTITUINTES QUÍMICOS DA DIETA.....	29
3.1 – Lipídeos.....	30
3.2 – Minerais.....	32
3.3 – Fibras.....	34
3.4 – Proteínas.....	35
4 – PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DAS PROTEÍNAS DOS ALIMENTOS.....	39
4.1 – MÉTODOS QUÍMICOS.....	40
4.1.1 – Escore Químico (EQ).....	40
4.1.2 – Digestibilidade Protéica <i>in vitro</i>	42
4.1.3 – Fatores Antinutricionais.....	43
4.1.3.1 – <i>Inibidores de Proteinases</i>	45
4.1.3.2 – <i>Lectinas ou Hemaglutininas</i>	46
4.2 – MÉTODOS BIOLÓGICOS.....	48
4.2.1 – Digestibilidade Protéica (DP)	48
4.2.2 – Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos Essenciais (PDCAAS).....	51
4.2.3 – Balanço Nitrogenado (BN).....	53
4.2.4 – Razão de Eficiência Protéica (PER).....	54
4.2.5 – Valor Biológico (VB).....	55
4.2.6 – Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA).....	56
OBJETIVOS.....	58
1 – GERAL.....	59
2 – ESPECÍFICOS.....	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	60
1 – MATERIAL.....	64
1.1 – Amêndoas.....	61
1.2 – Preparo da Farinha Desengordurada.....	61
2 – MÉTODOS.....	62

2.1 – Determinação da Composição Centesimal da Farinha.....	62
2.1.1 – Umidade.....	62
2.1.2 – Carboidrato Total.....	62
2.1.3 – Lipídios.....	62
2.1.4 – Cinzas.....	63
2.1.5 – Proteínas.....	63
2.2 – Conteúdo de Ácidos Graxos.....	63
2.3 – Teor de Minerais.....	64
2.4 – Composição de Aminoácidos.....	64
2.5 – Ensaio de Atividade de Hemaglutinação.....	65
2.6 – Ensaio de Atividade de Inibição.....	65
2.7 – Digestibilidade <i>in vitro</i>	65
2.8 – Preparo das dietas.....	66
2.9 – Determinação da Composição Centesimal das Dietas.....	67
2.9.1. – Amido e Sacarose.....	68
2.10 – Ensaio Biológico.....	68
2.10.1 - Digestibilidade Protéica Verdadeira (DP).....	70
2.10.2 - Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos.....	70
2.10.3 – Balanço Nitrogenado.....	71
2.10.4 – Razão de Eficiência Protéica (PER).....	71
2.10.5 – Valor Biológico (VB).....	72
2.10.6 – Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA).....	72
2.11 – Métodos estatísticos.....	73
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
1 - Composição Centesimal da Farinha das Amêndoas de Sapucaia.....	75
2 - Determinação de Ácidos Graxos.....	76
3 - Composição mineral.....	79
4 - Análise de aminoácidos.....	81
4.1 - Composição de aminoácidos.....	81
4.2 – Escore químico de aminoácidos.....	83
5 - Fatores antinutricionais.....	86
6 - Digestibilidade <i>in vitro</i> das globulinas das amêndoas da sapucaia.....	87
7 - Composição centesimal das dietas.....	89
8 - Ensaio Biológico.....	90

8.1 – Variação de Peso.....	91
8.2 – Digestibilidade Protéica Verdadeira.....	91
8.3 - Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos Essenciais (PDCAAS).....	93
8.4 - Balanço Nitrogenado (BN).....	94
8.5 - Razão de Eficiência Protéica (PER).....	96
8.6 - Valor biológico (VB).....	97
8.7 - Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA).....	98
CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS.....	100
ANEXO I.....	117
Texto Submetido para Publicação em Periódico Internacional Indexado - Qualis A.....	118
ANEXO II.....	147
Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS.....	148

INTRODUÇÃO

1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A nutrição é a necessidade básica mais importante dos seres humanos, sendo o principal determinante da saúde, produtividade laboral e desenvolvimento mental. Mas em muitos países em desenvolvimento a fome e a desnutrição estão aumentando, devido à explosão populacional, à falta de terras férteis e aos altos preços dos alimentos. Sendo que um grande segmento da população nestes países apresenta carência protéica (FAO, 1980).

Para suprir estas necessidades, a busca por fontes alternativas de alimentos tem se intensificado nos últimos anos. Entre os recursos alternativos as plantas oferecem uma enorme variedade de macro e micronutrientes necessários para os seres humanos.

Os cereais constituem-se em uma importante fonte de proteínas da dieta em todo o mundo, pois eles são utilizados como fonte primária de proteína e suplemento de energia em muitos países em desenvolvimento (Mossé e Pernollet, 1983; Macedo *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 2002; Bos *et al.*, 2005). Os cereais também contribuem significativamente, aproximadamente 20%, na ingestão diária de proteínas em países desenvolvidos, principalmente na forma de pães, macarrão, arroz, e cereais do desjejum (Volatier, 2000). No entanto, o trigo é pobre em lisina e treonina, que são aminoácidos essenciais (Bos *et al.*, 2005).

Os legumes ocupam o segundo lugar, depois dos cereais como fonte de calorias e proteínas na dieta humana, no entanto alguns legumes apresentam

fatores antinutricionais, como fenóis livres, taninos e inibidores de proteinases (Vadivel e Janardhanan, 2005).

Entre as leguminosas, encontra-se a soja que oferece a proteína vegetal de maior valor biológico, correspondendo a 40% de seus grãos (Silva Júnior e Demonte, 1997), no entanto, ela apresenta deficiência em aminoácidos sulfurados (Young, 1991) e possui fatores antinutricionais, como por exemplo os inibidores de proteases, lectinas e saponinas (Xavier-Filho e Campos, 1989).

A utilização de alimentos alternativos aos grãos de cereais e fontes protéicas vegetais e animais de elevada qualidade é uma opção econômica, ambiental e social; contudo, a possibilidade de incorporação de qualquer recurso alternativo como alimento depende do nível de segurança que traga sua utilização à saúde humana e animal e obviamente, de seu valor nutricional (Boucqué e Fiems, 1988).

Observou-se que, nos últimos 30 anos, o uso de proteínas vegetais, principalmente de sementes, aumentou na dieta humana na tentativa de minimizar as deficiências e devido, também, ao fato de que suas propriedades funcionais, processamento e valor nutritivo estarem sendo estudados (Rangel *et al.*, 2004). Além disso, o valor das proteínas de origem vegetal na suplementação das necessidades protéicas para o ser humano, em países em desenvolvimento, tem sido reconhecido nos últimos anos.

As populações nativas colhem frutos, sementes, nozes e amêndoas extraídas de plantas nativas da região, que são utilizados como complemento alimentar pelos humanos e alimentos para os animais (Araújo *et al.*, 2002), pois

são ricas em proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais, tanto quanto os grãos de legumes (Vadivel e Janardhanan, 2005).

Este fato foi observado por Ribas *et al.*, em 2001, estudando os hábitos alimentares dos índios Teréna, nativos do Estado de Mato Grosso do Sul, verificaram que os mesmos utilizam frutos nativos, coletados das matas como alimento. Foram identificados os seguintes frutos: bocaiúva (*Acrocomia aculeata*), araticum (*Annona dioica*), jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*), jenipapo (*Genipa americana*), coroa (*Mouriri elliptica*), buriti (*Mauritia vinifera*), pequi (*Caryocar brasiliense*), jurubeba (*Solanum paniculatum*), ingá (*Inga uruguensis*), guariroba (*Syagrus oleracea*), araçá (*Psidium guineense*), urucum (*Bixa orellana*) e caraguatá (*Bromelia balansae*).

Por isso, nos últimos anos, as sementes, castanhas e amêndoas de frutos nativos têm recebido atenção dos pesquisadores, no que diz respeito à possibilidade de serem utilizadas como fonte natural de proteínas, podendo contribuir significativamente para a composição da dieta humana e de animais, pois além de proteínas contém lipídeos, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras.

As principais nozes comestíveis nativas e comercializadas no Brasil são a castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) e a castanha do Pará (*Bertholletia excelsa* H.B.K) (Chaves *et al.*, 2004).

De acordo com Mello *et al.* (1998), a castanha de caju contém 22% de proteínas, 46% de gordura, 24% de carboidratos. Ela apresenta uma alta concentração de ácidos graxos insaturados, em torno de 82%, sendo que o ácido oléico representa 59,6% e o ácido linoléico 19,6%. Estas castanhas contêm, ainda, 5 mg/100 g de ferro (Ecazoo, 2006).

A castanha do Pará, apresenta 16% de proteínas e 69,3% de lipídeos, e contém vitamina B₁ e vitamina E. Quanto aos minerais, apresenta 3,4 mg/100 g de ferro, 198 mg/100 g de cálcio, 227,9 mg/100 g de magnésio e 3,0 mg/100g de selênio; também foram encontrados enxofre, zinco (Pressman, 1997).

No entanto, nas florestas brasileiras existem, ainda, inúmeras outras espécies nativas cujos frutos e sementes que podem ser utilizados como fonte de nutrientes. Mas, apesar desta variedade de espécies, a população brasileira carece da ingestão de nutrientes, em quantidades requeridas para a manutenção da saúde. Por isso é importante a busca de novas fontes de nutrientes, nutricionalmente adequadas e de baixo custo, que possam suprir as necessidades essenciais desta população.

Alguns frutos nativos do Brasil, que já foram estudados, mostraram ser excelentes fontes de nutrientes, tais como aminoácidos, carboidratos, lipídeos, vitaminas e fibras (Hiane *et al.*, 1992; Togashi e Sgarbieri, 1995; Hiane *et al.*, 2005). Mesmo assim, muitas espécies nativas de algumas regiões do Brasil, que são utilizadas pela população local como alimento, necessitam ser estudadas para se determinar a sua composição química, o valor nutritivo e a presença de fatores antinutricionais. Entre estas espécies nativas encontra-se a sapucaia.

2 - SAPUCAIA

As amêndoas de espécies como a sapucaia, que são consumidas pela população, somente algumas são conhecidas e estudadas.

As sapucaias e seus frutos já eram conhecidos e aproveitados pelas populações que habitavam o Brasil na época da chegada dos primeiros europeus, no século XVI, que se sentiram atraídos pelas qualidades da planta, útil, exótica e ornamental (Lorenzi, 1992; Tassara, 1996; Teixeira, 2006).

De acordo com Teixeira (2006), o viajante Pêro de Magalhães Gândavo descreveu os frutos da sapucaia como grandes cocos muito duros, contendo castanhas doces e extremamente saborosas. Para ele, esses frutos não pareciam criados pela natureza e sim por algum artifício da indústria humana, já que suas bocas, eram voltadas para baixo e cobertas por *capadoiras* que caíam sozinhas e permitiam que as castanhas caíssem e se dissipassem.

A palavra sapucaia tem origem tupi, e significa *sa* = olho, *puca* = que se abre e *ia* = cabaça, ou seja a *cabaça que abre o olho*. De fato, ao abrir o opérculo do fruto, tem-se a impressão de que ele tem um olho (Dalmau, 2006).

Pelo nome de sapucaia é conhecido, no Brasil, um grande número de árvores que pertencem à família das Lecythydaceae, a mesma a qual pertence a imponente castanheira do Brasil ou castanheira do Pará. Entre elas encontramos a *Lecythis pisonis*, Camb., que é conhecida por sapucaia ou castanha sapucaia (Lorenzi, 1992; Tassara, 1996; Teixeira, 2006).

A sapucaia é encontrada na mata Atlântica, ocorrendo desde o Ceará até o Rio de Janeiro, sendo freqüente no sul da Bahia e no norte do Espírito Santo. Podendo ser encontrada também, em estado nativo, na região amazônica (Lorenzi, 1992; Tassara, 1996; Teixeira, 2006).

É uma árvore de grande porte, podendo atingir 40m de altura (**Figura 1**). Seu tronco pode atingir 1m de diâmetro e sua madeira é utilizada em

construção de habitações e na confecção de objetos leves (Fouqué, 1972; Lorenzi, 1992; Villachica *et al.*, 1996; Teixeira, 2006).



Figura 1 – Árvore da sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.) (Plantarum, 2006).

Na primavera, após a queda das folhas, fica coberta de novas folhas da cor rosa e de flores roxas e brancas (**Figura 2**). Os frutos amadurecem entre 11–12 meses (Teixeira, 2006).

O fruto da sapucaia é um pixídio, ou seja, é um fruto seco e deiscente, com um tipo de abertura bastante particular: a parte superior do ovário destaca-

se do restante do fruto na maturação, como uma tampa (**Figura 2**). Usualmente esses frutos são pêndulos, e ao abrir o óperculo as sementes são liberadas pela força da gravidade, são comuns em papoulas e em alguns gêneros da família Lecythidaceae (Wikipedia, 2006).



Figura 2 – Figura do fruto da sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.), ainda na árvore, mostrando as folhas rosa e flores roxas características da sapucaia na primavera (Margherita Leoni, 2004).

Em sua maioria, as sapucaias caracterizam-se pela peculiaridade de seus frutos (**Figura 3**), que apresentam castanha grande arredondada, de 25cm de diâmetro, de casca rígida, espessa e de aparência lenhosa com 7-9Kg de peso e coloração castanha, apresentam entre 14-40 amêndoas por fruto, cada um com 5-8cm de comprimento, cobertas por um tegumento coriáceo fibroso (Fouqué, 1972; Villachica *et al.*, 1996).



Figura 3 – Fruto maduro da sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.), mostrando o opérculo aberto, a polpa e as amêndoas em seu interior (Árvores do Brasil, 2006). No detalhe amêndoas com casca e descascadas.

Um ditado popular diz que *macaco velho não mete a mão em cumbuca*, no caso, a cumbuca de macaco é o fruto da sapucaia, onde o macaco mete a mão para agarrar as sementes e ao retirá-la esquece de abri-la ficando com ela presa ao fruto. Segundo o ditado, somente os mais inexperientes acabam vítimas da sua afobação e são penalizados (Dalmau, 2006).

As amêndoas aromáticas, doces e oleaginosas da sapucaia (**Figura 4**) podem ser consumidas cruas, cozidas ou assadas, constituindo-se em excelente alimento. Seu sabor é semelhante às nozes da nogueira, podendo ser usadas como ingrediente para doces, confeitos e pratos salgados. Estas

amêndoas são muito apreciadas pelos animais silvestres e, especialmente pelos macacos, por isso, são também conhecidas como cumбуca de macaco ou marmita de macaco (Lorenzi, 1992; Tassara, 1996; Teixeira, 2006).

A polpa é comestível, altamente nutritiva e medicinal (Silva, 1991; Teixeira, 2006). A cabaça é utilizada como utensílio doméstico (Lorenzi, 1992; Tassara, 1996; Teixeira, 2006).

O fruto da sapucaia é usado, na medicina popular, no tratamento de diarreia e sífilis e o óleo extraído da casca da árvore é usado no tratamento da gota e sífilis (Plantas Brasileiras, 2002).

Apesar da utilização dos frutos e amêndoas da sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.) como alimento, em várias regiões do Brasil, praticamente nenhum estudo foi realizado para se verificar a composição química das amêndoas e seu valor nutricional. Portanto, para que ela possa ser indicada como fonte de proteínas para humanos e animais, deve ser determinada a composição química e perfil de aminoácidos de suas proteínas, sua qualidade nutricional e a presença de fatores antinutricionais.

3 – CONSTITUINTES QUÍMICOS DA DIETA

Dieta alimentar de boa qualidade deve conter proteínas, carboidratos, lipídeos, minerais, vitaminas e fibras em quantidade adequada para suprir as necessidades de humanos e animais.

Mas, para que um produto seja indicado como alimento é necessário que, além de se determinar o teor destes nutrientes, seja determinada a

composição em ácidos graxos dos lipídeos, principalmente os ácidos graxos essenciais, o teor de proteínas e sua composição em aminoácidos, bem como a qualidade nutricional destas proteínas nestes produtos.

Nos produtos de origem vegetal, é importante, também, se verificar a presença de fatores antinutricionais e/ou tóxicos que possam causar danos à saúde humana, quando ingeridos como por exemplo os fitatos, saponinas, lectinas, glicosídeos, inibidores de proteases, fenóis livres e gossipol.

3.1 – Lipídeos

Os lipídeos são biomoléculas, pouco solúveis em água. Os lipídeos formam um grupo heterogêneo de compostos relacionados aos ácidos graxos. São constituintes importantes da dieta, não só pelo seu elevado valor energético como também, pelas vitaminas lipossolúveis – A, D, E e K, e ácidos graxos essenciais, ácido linoléico ($C_{18:2\omega6}$) e alfa linolênico ($C_{18:3\omega3\alpha}$), encontrados nas gorduras dos alimentos (Champe e Harvey, 2000; Pratt e Corneley, 2006).

Os lipídeos da dieta podem influenciar os níveis de lipídeos do soro e a quantidade de gordura saturada, é o fator que mais influencia o colesterol plasmático (Champe e Harvey, 2000). Estudos clínicos demonstraram que as dietas ricas em gorduras saturadas aumentam o colesterol-LDL (*Lipoproteína de Baixa Densidade*) no sangue, enquanto dietas nas quais óleos vegetais insaturados substituem as gorduras saturadas têm efeito oposto (Pratt e Corneley, 2006).

Os ácidos graxos poliinsaturados denominados $\omega 6$, como o ácido linoléico, reduzem os níveis de colesterol plasmático, tanto o colesterol-LDL quanto o colesterol-HDL (*Lipoproteína de Alta Densidade*). Estes ácidos são encontrados em óleos vegetais, incluindo os óleos de milho, açafrão, soja e girassol (Champe e Harvey, 2000).

Já as dietas ricas em gorduras contendo ácidos graxos poliinsaturados denominados $\omega 3$, por exemplo o ácido linolênico, promovem uma redução nos níveis de triacilgliceróis plasmáticos e inibem a conversão de ácido araquidônico ($C_{20:4\omega 14}$) em tromboxano A_2 (TXA_2), que é trombogênico, e aumentam a síntese de tromboxano A_3 (TXA_3), que é menos trombogênico que o A_2 , pelas plaquetas. São encontrados em óleos de peixes, como o carapau, anchovas, salmão, sardinhas e arenque (Champe e Harvey, 2000).

Champe e Harvey (2000), relataram que as gorduras monoinsaturadas, encontradas nos óleos de oliva e canola, são tão efetivas quanto às gorduras poliinsaturadas em reduzir o colesterol no sangue. Estas gorduras diminuem o LDL, mas não alteram os níveis de HDL.

Os ácidos graxos insaturados na natureza estão na forma *cis*, no entanto, durante o processo de hidrogenação de óleos vegetais líquidos, por exemplo, na fabricação de margarina, podem ser transformados no isômero *trans*. Estudos clínicos recentes mostraram que altas concentrações de ácidos graxos *trans* podem diminuir os níveis de HDL e aumentar os níveis de LDL no sangue, tanto quanto os ácidos graxos saturados (Champe e Harvey, 2000; Pratt e Corneley, 2006).

No entanto, ainda não é conhecido o mecanismo de atuação dos ácidos graxos saturados ou insaturados, *cis* ou *trans* sobre o metabolismo das lipoproteínas (Champe e Harvey, 2000; Pratt e Corneley, 2006).

Vallilo *et al*, em 1998 e 1999, realizaram análise da amêndoa dos frutos da sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.), coletadas em quatro diferentes regiões do estado de São Paulo. As amostras apresentaram um alto teor de lipídeos variando entre 34,2-61,3% e a concentração de ácido linoléico (C_{18:2ω6}) variando de 38,9-56,3%. A concentração de ácido oléico (C_{18:1ω9}), encontrada nas amostras analisadas, variou de 27-43%, sendo que e a do ácido palmítico (C₁₆) e do ácido esteárico (C₁₈), ácidos graxos saturados, variou de 8,6-10,9% e 3,5-7,7% respectivamente. Demonstrando ser as amêndoas da sapucaia uma excelente fonte de lipídeos e de ácidos graxos insaturados principalmente de ácido linoléico, que é um ácido graxo essencial para os humanos.

3.2 – Minerais

A determinação do teor de minerais é importante, já que o fornecimento destes oligoelementos na dieta é indispensável, pois eles exercem função na nutrição e fisiologia dos animais e tanto a deficiência no seu fornecimento como as alterações na absorção e, ou no metabolismo podem ocasionar inúmeras patologias. Estes oligoelementos atuam como cofatores enzimáticos de inúmeras enzimas que participam do metabolismo.

Os elementos minerais presentes no corpo animal podem ser classificados como macronutrientes, que constituem 60-80% de todo material inorgânico do corpo, como o cálcio, sódio, magnésio, potássio, fósforo, ferro,

cloro, enxofre e silício; micronutrientes, tais como o cobre, zinco, manganês, molibdênio, iodo, selênio, cromo, cobalto, estrôncio e flúor; e os elementos traços, entre eles encontram-se o vanádio, estanho, níquel, chumbo, cádmio e mercúrio (De Angelis, 1977) .

O zinco é componente funcional de mais de 100 enzimas, que participam de diversos processos metabólicos, como crescimento e multiplicação celular, cicatrização e funcionamento dos macrófagos e linfócitos e sua deficiência afeta a acuidade gustativa (Waitzberg, 2000). Os níveis de zinco apresentam-se baixos em pacientes portadores de câncer de laringe (Niedzielska, Caruk e Pasterna, 2000).

O magnésio e o selênio parecem aumentar a resistência imunológica e prevenir infecções (Waitzberg, 2000). O magnésio também atua na transmissão neuromuscular e como cofator enzimático (De Angelis, 1977).

O selênio é considerado um antioxidante de primeira linha, como cofator da glutathione peroxidase, e muitos estudos o recomendam para a prevenção do câncer (Marxs e Mason, 1993 e Waitzberg, 2000). Recomenda-se a ingestão 55 µg/d de selênio, pois ele é utilizado no combate aos radicais livres. A ingestão de uma castanha do Pará diariamente fornece a quantidade de selênio necessária para suprir as necessidades dietéticas do homem (Pressman, 1997).

O cálcio é o mineral mais abundante no corpo humano, atua em processos essenciais, como cofator de enzimas e mediador da resposta hormonal, sendo essencial na coagulação sangüínea e contractilidade muscular, além de participar da formação de ossos e dentes, juntamente com o fósforo (De Angelis, 1977).

Portanto, para que organismo humano possa desenvolver as atividades fisiológicas de forma precisa há necessidade da ingestão destes oligoelementos através da dieta, nas concentrações exigidas para a manutenção da saúde.

3.3 – Fibras

Segundo Scheeman (1986), o material resistente à hidrólise pelas enzimas do trato digestivo de mamíferos é denominado de fibra, constituindo-se um importante componente da dieta alimentar.

As fibras alimentares apresentam inúmeros efeitos fisiológicos. Os efeitos incluem aumento do bolo fecal, diminuição da disponibilidade dos nutrientes, redução do nível plasmático de colesterol, e redução da resposta glicêmica após a ingestão de alimento (Scheeman, 1986).

Dietas pobres em fibras podem estar relacionadas a algumas alterações patológicas, tais como constipação, diverticulite e câncer de intestino grosso (Burkitt e Trowell, 1975). Outras doenças crônicas podem estar relacionadas ao baixo teor de fibras incluindo a obesidade, doença cardiovascular e diabetes (Schneeman, 1986).

A determinação do teor de fibras é muito importante pois, o alto teor de fibras insolúveis, tais como celulose e lignina, juntamente com a alta concentração de fatores antinutricionais na dieta são responsáveis pela pouca digestibilidade das proteínas (Gilani, Cockell e Sepehr, 2005). Segundo Kritchevsky (1988), as fibras podem modificar e diminuir a digestibilidade das

proteínas em até 10%, por aumentar a excreção de nitrogênio. Este efeito pode ser explicado pelo fato que as fibras, quando presentes na dieta em altas concentrações, podem aumentar a velocidade do trânsito intestinal.

3.4 - Proteínas

Associada à ingestão de fontes de calorias, como carboidratos e lipídeos, encontra-se a necessidade da ingestão de proteínas que possam suprir as necessidades dietéticas de aminoácidos essenciais, que apresentem biodisponibilidade e suscetibilidade à hidrólise durante a digestão.

Foram os primeiros nutrientes a serem considerados essenciais para o organismo. O termo vem do grego e significa *de primeira importância* (Borsoi, 2001). Podem ser de origem exógena, provenientes da dieta, ou endógena, derivadas da degradação das proteínas celulares do próprio organismo (Oliveira, 1998).

As proteínas são indispensáveis para o crescimento e manutenção da vida. Exercem funções catalíticas, estruturais, hormonais, contrátil, de regulação gênica, de defesa e de transporte nos fluídos biológicos (Borsoi, 2001; Murray *et al.*, 2002).

Sendo um nutriente essencial aos organismos animal e humano, as proteínas devem estar presentes na alimentação em quantidades adequadas. Segundo De Angelis (1991), a necessidade de uma proteína é a quantidade que deve ser consumida em um determinado período de tempo para contrabalançar os gastos orgânicos. A quantidade de proteína necessária para

fornecer todos os aminoácidos essenciais varia dependendo da fonte de proteína da dieta (Harper e Yoshimura, 1993).

Carnes, peixes, derivados lácteos, grãos e farinhas de leguminosas são particularmente ricos em proteínas, considerados como as principais fontes deste nutriente (Mahan e Escott-Stump, 1998).

As proteínas dos alimentos são digeridas no trato digestivo até di e tripeptídeos e aminoácidos livres. A maior parte dos aminoácidos livres é absorvida alcançando o fígado (De Angelis, 1977). Os dipeptídeos são absorvidos pelas células intestinais, nas quais são hidrolisados a aminoácidos livres, antes de entrarem no sistema porta (Champe e Harvey, 2000).

Dos 20 aminoácidos que constituem as proteínas alguns podem ser sintetizados pelo organismo humano, enquanto que outros devem ser obtidos através da dieta, são os aminoácidos essenciais. Para o humano adulto são essenciais os seguintes aminoácidos isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Para as crianças, além destes, é essencial a histidina e para alguns autores, também, a arginina (De Angelis, 1977; Harper e Yoshimura, 1993; Sgarbieri, 1996; Champe e Harvey, 2000; Murray *et al.*, 2002; Pratt e Corneley, 2006).

As propriedades das proteínas dependem de sua composição de aminoácidos. No entanto, os aminoácidos funcionam não só como unidades estruturais para a formação das proteínas, mas também como precursores de uma série de substâncias biologicamente importantes, tais como hormônios, porfirinas, pigmentos, etc (Sgarbieri, 1996).

O glutamato, por exemplo, além de ser um constituinte das proteínas, atua na transmissão do impulso nervoso e participa da síntese de glutathione (GSH), juntamente com a cisteína e a glicina. GSH é um dos mais importantes antioxidantes encontrados no organismo humano, protege as células contra a ação de moléculas extremamente reativas chamadas de radicais livres de oxigênio, por exemplo o superóxido, peróxido de hidrogênio, etc (Gotoh, 1993).

De acordo com Sgarbieri (1996) e Murray *et al.* (2002), as proteínas podem ser classificadas de acordo com a solubilidade em diversos solventes, em: albuminas, globulinas, prolaminas e escleroproteínas. A diferença de solubilidade nos diversos solventes fornece instrumento para o isolamento das proteínas.

1 – Albuminas – São solúveis em água e soluções salinas, e precipitadas pelo calor. Não apresentam aminoácidos especiais. Representam um grande grupo em que a albumina de ovo integral e albumina de soro sanguíneo constituem exemplos típicos.

2 – Globulinas - São solúveis em água ou soluções salinas diluídas. São também precipitadas pelo calor. Não apresentam aminoácidos especiais.

As globulinas são proteínas globulares largamente distribuídas no reino animal e vegetal. No homem, estão envolvidas no transporte de uma variedade de substâncias, incluindo lipídeos, hormônios e íons inorgânicos, além disso estão relacionadas ao sistema imune.

Elas apresentam função estrutural e catalítica e, nos vegetais, são importantes no processo de germinação (Sgarbieri, 1996). Estão presentes nas sementes de legumes em altas concentrações, como proteínas de

armazenamento, cuja concentração corresponde a 50-75% da proteína total das sementes (Shewrey, 1995).

Esta fração é isenta de fatores antinutricionais, tais como inibidores de proteinases e lectinas e por isso, frequentemente os estudos realizados para responder questões relacionadas à qualidade nutricional das proteínas vegetais, têm sido focados sobre as frações protéicas das globulinas (Araújo *et al.*, 2002).

3 - Prolaminas – São proteínas ricas em arginina e normalmente encontradas em sementes de cereais, sendo solúveis em etanol 70-80%, mas insolúveis em água ou etanol absoluto. Como exemplo de prolaminas pode ser citada a zeína do milho, a gliadina do trigo, etc.

4 - Glutelinas – São insolúveis em água, soluções salinas e alcoólicas, sendo porém solúveis em soluções ácidas e alcalinas diluídas. Como exemplo pode ser citada a glutelina do trigo e cerca de 80% das proteínas do arroz são glutelinas.

5 – Escleroproteínas - São proteínas insolúveis, ricas em glicina, alanina e prolina. Somente são solubilizadas por ácidos, bases ou detergentes. Exemplos de escleroproteínas: proteínas fibrilares, tais como o colágeno, queratinas e elastinas.

No que se refere à nutrição, as proteínas dos alimentos, também, podem ser classificadas de acordo com sua qualidade dietética, que depende, em parte, da proporção de aminoácidos e da concentração de aminoácidos essenciais presente, que deve ser satisfatória para as necessidades orgânicas.

A presença de um ou mais aminoácidos essenciais em concentração adequada aumenta o valor nutritivo da proteína (De Angelis, 1977; Rangel *et al.*, 2004).

4 – PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DAS PROTEÍNAS DOS ALIMENTOS

Além do aspecto quantitativo deve-se levar em conta o aspecto qualitativo das proteínas, isto é, seu valor nutritivo.

O valor nutritivo de uma proteína depende da sua composição, digestibilidade, biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais, ausência de toxidade e/ou de propriedades antinutricionais (FAO/WHO, 1991; Sgarbieri, 1996).

Não é suficiente que a proteína apresente os aminoácidos em quantidades e proporções adequadas para atender os requerimentos dos vários organismos, que utilizam esta proteína como fonte de nitrogênio e de aminoácidos essenciais. É necessário que os aminoácidos, particularmente, os essenciais estejam biodisponíveis. Os aminoácidos são considerados biodisponíveis quando são absorvidos em sua forma metabolicamente ativa, podendo desempenhar suas funções específicas nos vários órgãos e tecidos (De Angelis, 1977; Sgarbieri, 1996).

Entre os métodos utilizados para a determinação da qualidade nutricional das proteínas encontram-se os químicos e os biológicos.

4.1 – Métodos Químicos

A avaliação da qualidade das proteínas é realizada baseando-se nos seguintes índices: digestibilidade *in vitro*, perfil de aminoácidos e o escore químico de aminoácidos essenciais (AAE) e na determinação de fatores antinutricionais e/ou tóxicos.

4.1.1 - Escore Químico (EQ)

Segundo Sgarbieri (1996), a proteína do ovo integral apresenta altos teores de aminoácidos indispensáveis, principalmente os sulfurados. Quando esta proteína é utilizada como padrão de referência, tende subestimar o valor biológico de grande número de proteínas, principalmente as que são limitantes em aminoácidos sulfurados. Para corrigir esses problemas a FAO e a Organização Mundial de Saúde (WHO) recomendam calcular o escore químico de aminoácidos, que indica a correlação com os índices obtidos nos ensaios biológicos.

O escore químico estabelece uma comparação entre o teor de cada aminoácido, dieteticamente indispensável, da proteína teste com o aminoácido correspondente de uma proteína ou padrão tomada como referência. O padrão de referência mais utilizado é o padrão de referência da FAO/WHO de 1985 (FAO/WHO, 1991; Sgarbieri, 1996). Valores $>1,0$ são considerados como 1,0, sendo que, o aminoácido limitante é o que apresenta o menor escore (Pellet e Young, 1980; Henley e Kurster, 1994).

Para ilustrar, se o conteúdo de lisina na farinha de trigo integral é 2,6% e o valor para a lisina no escore padrão baseado nas necessidades de crianças é 5,1%, o escore de aminoácido para a lisina nas proteínas farinha do trigo é $2,6/5,1 = 0,51$. O escore para os outros aminoácidos essenciais é alto, portanto a lisina é o aminoácido limitante. O escore de aminoácidos para as proteínas da farinha de trigo é 51 (AOAC, 1975; Harper, 1981; FAO/WHO/UNO, 1985).

Portanto, para ingerir a quantidade de lisina requerida, uma criança deve consumir proteínas da farinha de trigo integral e do ovo integral, pois o escore para as proteínas do ovo integral é 1,0, complementando as proteínas do trigo, deficientes em lisina. (AOAC, 1975; Harper, 1981; FAO/WHO/UNO, 1985).

Na **Tabela 1**, são mostrados o conteúdo e o escore químico de aminoácidos essenciais da caseína, proteína animal que, freqüentemente, é utilizada como proteína padrão nos ensaios biológicos realizados para se determinar a qualidade de uma proteína.

Tabela 1 – Conteúdo e escore químico de aminoácidos essenciais da caseína (Pires *et al.*, 2006).

Aminoácidos	Conteúdo (mg/g)	Padrão recomendado (mg/g)*	Escore químico
Fenilalanina**	109,71	63	1,74
Histidina	18,99	19	1,00
Isoleucina	46,91	28	1,68
Leucina	93,05	66	1,41
Lisina	78,66	58	1,36
Metionina***	30,95	25	1,21
Treonina	43,22	34	1,27
Triptofano	ND****	11	ND
Valina	54,00	35	1,57

*FAO/WHO (1985). **Fenilalanina + tirosina.***Cisteína + metionina. ****ND – não determinado.

O método do escore de aminoácido não leva em conta a digestibilidade da proteína (Smyth e Elliott, 1964; AOAC, 1975). Já que, muitas proteínas vegetais não são completamente degeridas, deve-se fazer uma correção para se determinar a qualidade nutricional destas proteínas (Pellet e Young, 1980).

O cálculo deste índice é importante pois indica: 1 - a ordem dos aminoácidos limitantes na proteína teste, em relação à referência; 2 – o valor encontrado para o aminoácido limitante é uma estimativa do valor biológico da proteína teste em relação à referência.

4.1.2 - Digestibilidade Protéica *In Vitro*

Digestibilidade de uma proteína significa a porção da proteína que pode ser hidrolisada pelas enzimas digestivas até aminoácidos e que, portanto estaria disponível biologicamente, desde que não haja nenhuma interferência na absorção dos aminoácidos pelo organismo animal ou humano.

In vitro, a digestibilidade de uma proteína é estimada usando-se enzimas hidrolíticas, que agem no trato digestivo do organismo vivo, mantidas em pH igual ao do estômago e do intestino onde a digestão das proteínas se processa (Sgarbieri, 1996).

Para se realizar este ensaio podem ser utilizadas enzimas, como a tripsina, pepsina, quimotripsina, isoladamente, método descrito por Araújo *et al.*, em 2002 ou um complexo multienzimático contendo mais de uma enzima digestiva, como por exemplo tripsina + quimotripsina + peptidase, método descrito por Hsu *et al.*, em 1977, que apresenta correlação com os dados obtidos nos experimentos *in vivo*, utilizando-se como padrão a caseína.

A pepsina é uma endopeptidase, estável em pH ácido, é secretada pelas células serosas do estômago como pepsinogênio, um zimogênio inativo ou proenzima. O pepsinogênio é ativado pelo HCl ou por autocatálise. A pepsina libera peptídeos e alguns aminoácidos livres das proteínas da dieta (Champe e Harvey, 2000).

A tripsina e quimotripsina são serino-proteases sintetizadas e secretadas pelo pâncreas, como zimogênios inativos, sendo ativados na luz intestinal. O tripsinogênio é convertido em tripsina pela enteropeptidase. Subseqüentemente a tripsina converte o quimotripsinogênio em quimotripsina (Champe e Harvey, 2000).

Segundo Champe e Harvey (2000), a tripsina é responsável pela clivagem de ligações peptídicas com grupo carbonila pertencente a resíduos de aminoácidos carregados positivamente, interagindo com resíduos de arginina ou lisina. Já a quimotripsina, cliva ligações peptídicas, cujo grupo carbonila pertence a resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, interagindo com a fenilalanina, triptofano ou tirosina.

As peptidases são enzimas que atuam no intestino clivando, repetidamente, os oligopeptídeos produzindo aminoácidos livres e peptídeos menores (Champe e Harvey, 2000).

4.1.3 - Fatores Antinutricionais e/ou Tóxicos

Segundo Sgarbieri (1996), a distinção entre os fatores antinutricionais e tóxicos é que os fatores tóxicos agem de forma aguda produzindo lesões nos órgãos e tecidos e alterações fisiológicas que resultam em enfermidades

podendo inclusive, causar a morte de pessoas ou animais que as ingerem. Os fatores antinutricionais embora não causem alterações teciduais e fisiológicas evidentes, atuam no sentido de diminuir a eficiência do metabolismo interferindo com a eficiência de utilização de nutrientes.

Os fatores antinutricionais podem ocorrer naturalmente ou podem ser formados durante o processamento térmico/alcalino de alimentos ou produtos alimentícios (Gilani, Cockell e Sepehr, 2005).

Alguns exemplos de fatores antinutricionais que ocorrem naturalmente incluem os glicosídeos na mostarda e em produtos protéicos da semente de couve (Fenwick, Heaney e Mullin, 1983), inibidores de tripsina e hemaglutininas em legumes (Liener, 1994), taninos em legumes e cereais (Ahmed, Smithard e Ellis, 1991), fitatos em cereais e sementes oleaginosas (Sandberg e Svanberg, 1991) e gossipol em preparados protéicos de sementes de algodão (Martinez e Hopkins, 1975), os quais podem afetar negativamente a utilização de nutrientes e podem contribuir para deficiência no desenvolvimento físico em animais (Gilani, Cockell e Sepehr, 2005).

Os fatores antinutricionais atuam reduzindo a digestão e provocando uma perda de nutrientes essenciais ou interferindo em sua utilização e função metabólica (Cruz *et al.*, 2004).

Os alimentos e produtos alimentícios podem conter um grande número de fatores antinutricionais e/ou tóxicos que podem afetar a digestibilidade de proteínas e a biodisponibilidade de aminoácidos (Lajolo e Genovêse, 2002). Por isso, é que além de se determinar os fatores nutricionais presente nos alimentos, deve-se estar atentos para a determinação dos fatores

antinutricionais que podem reduzir seu valor nutricional (Abu-Tarboush e Ahmed, 1996).

Os inibidores de proteinases, lectinas ou hemaglutininas ou fitohemaglutininas, taninos e saponinas interagem com o trato intestinal, reduzindo a digestibilidade protéica e a absorção de aminoácidos, afetando a qualidade da proteína. Se estes fatores não forem destruídos ou inativados através de um tratamento térmico ou outro tratamento adequado, estas substâncias podem exercer efeitos fisiológicos adversos quando ingeridos pelo homem ou animais (Liener, 1994).

No entanto, segundo Lajolo e Genovêse (2002), provavelmente, a ingestão crônica de níveis residuais de fatores antinutricionais não apresenta risco à saúde humana ou causa efeitos antinutricionais.

Muitos dos fatores antinutricionais em legumes podem ser eliminados ou inativados por aquecimento ou processamento apropriado durante o preparo do alimento (Oshodi *et al.*, 1995; Rangel *et al.*, 2004). No entanto, o excesso de calor pode destruir importantes aminoácidos e reduzir a biodisponibilidade de outros nutrientes (Van der Poel, Verstegen e Tamminga, 1995).

4.1.3.1 – Inibidores de Proteinases

Os inibidores de enzimas são proteínas ou peptídeos capazes de inibir a atividade catalítica de enzimas hidrolíticas, tais como proteases, α -amilases, lipases, glicosidases e fosfatases e são conhecidos desde o final do século XIX em nematóides e soro humano (Macedo *et al.*, 2000; Lajolo e Genovêse, 2002; Freire *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2004), sendo encontradas em muitos produtos

alimentares, incluindo legumes, cereais, tomates e batatas (Friedman e Brandon, 2001).

Na soja são encontrados dois grupos de inibidores de proteinases: o inibidor de tripsina Kunitz e o inibidor tripsina e quimotripsina Bowman-Birk (Stahlhult e Hymowitz, 1983).

Do ponto de vista nutricional, os inibidores das serino-proteinases, tripsina e quimotripsina, encontrados em gêneros alimentícios são os mais importantes (Belitz, e Weder, 1990).

A inibição da tripsina e quimotripsina pelos altos níveis de inibidores de proteinases, em animais de laboratório, tais como ratos, camundongos e galinhas, causam deficiência no crescimento, hipersecreção de enzimas digestivas (Liener, 1994; Lajolo e Genovêse, 2002), hipertrofia pancreática e/ou hiperplasia (Gallaher e Schneeman, 1984), potenciação da carcinogênese pancreática (Gumbman *et al.*, 1986).

Muitos destes compostos reagem com as enzimas digestivas ou com os aminoácidos essenciais, limitando a aplicação da farinha integral de sementes em produtos alimentares (Rangel *et al.*, 2004).

4.1.3.2 – Lectinas

As lectinas de plantas foram descritas pela primeira vez por Stillmark (1988), um estudante de medicina, em Dorpat/Estônia quando trabalhava em sua dissertação sobre o feijão castor (*Ricinus communis*, L.). Desde então as

propriedades, ação sobre o metabolismo e toxicidade destas substâncias nos organismos vivos, vem sendo pesquisada.

As lectinas ou hemaglutininas, são glicoproteínas largamente distribuídas na natureza, incluindo vegetais consumidos como parte da dieta humana, e tem a habilidade de combinar reversível e especificamente com açúcares e glicoconjugados, sem alterar a estrutura das ligações glicosídicas dos sítios (Etzler, 1985, Lajolo e Genovêse, 2002).

As lectinas apresentam um ou mais sítios de ligação de diferentes tipos de açúcares, podendo ser utilizadas como ferramentas biológicas para identificação de receptores de superfície de membranas de células. Podem também ser utilizadas como bloqueadoras de sítios de ligação comuns de vírus (Silva e Silva, 2000).

Algumas lectinas são específicas em suas reações com grupos sanguíneos humanos ABO (Lis e Sharon, 1973), promovem estimulação mitogênica de linfócitos e aglutinação de células cancerosas (Liener, 1981) e ligam-se a receptores específicos na superfície das células intestinais, acarretando interferência não específica na absorção de nutrientes (Sgarbieri e Whitaker, 1982; Lajolo e Genovêse, 2002).

Pode-se concluir que, os efeitos tóxicos das lectinas estão associados a sua grande resistência à proteólise no trato intestinal de monogástricos, ruminantes e insetos, a sua capacidade de se ligar às células do trato gastrointestinal, a sua habilidade para modular o metabolismo intestinal e sistêmico e a estabilidade a grandes variações de pH (Vasconcelos e Oliveira, 2004).

4.2 – Métodos Biológicos

A composição dos alimentos é uma indicação muito valiosa do seu valor nutritivo, entretanto, não é suficiente para caracterização completa de qualquer alimento em estudo, sob o ponto de vista nutritivo (Gomes *et al.*, 2000). De acordo com Sgarbierri (1987), a porção disponível de qualquer nutriente é aquela que efetivamente é absorvida em uma forma que possa ser utilizada pelo organismo em seu metabolismo celular.

Portanto, faz-se necessário realizar uma avaliação nutricional das proteínas da dieta ou do produto a ser introduzido na alimentação de humanos e animais.

Os métodos biológicos utilizados na avaliação nutricional das proteínas baseiam-se em dois princípios: balanço de nitrogênio e ganho de peso. Utilizando-se estes dois princípios, podem ser determinados os índices utilizados na avaliação da qualidade nutricional das proteínas que são: Digestibilidade Verdadeira (DP), Digestibilidade Corrigida pelo Escore de Aminoácidos Essenciais (PDCAAS), Balanço Nitrogenado (BN), Razão de Eficiência Protéica (PER), Valor Biológico (VB) e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA).

4.2.1 – Digestibilidade Protéica (DP)

Métodos baseados no balanço nitrogenado, em que o nitrogênio ingerido e excretado é determinado em ratos alimentados com dietas contendo a proteína teste ou uma dieta aprotéica, permitem que a retenção de nitrogênio

seja estimada (Pellet e Young, 1980; Amaya *et al.*, 1991). Para que o nitrogênio presente na dieta possa ser absorvido e utilizado, as proteínas necessitam ser digeridas.

Digestibilidade é a medida do percentual das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácido ou de qualquer outro composto nitrogenado, como uréia, amônia, nitrito e nitrato, sendo um determinante da qualidade da proteína. É o primeiro fator que afeta a eficiência protéica da dieta. Se algumas ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, parte da proteína é excretada nas fezes ou transformada em produtos do metabolismo pelos microorganismos do intestino grosso (Bressani e Elias, 1979; Sgarbieri, 1987).

Na avaliação da digestibilidade de uma proteína *in vivo* pode ser determinada a Digestibilidade Protéica Aparente e a Digestibilidade Protéica Verdadeira.

A digestibilidade aparente é determinada pela medida do nitrogênio ingerido com a dieta e do nitrogênio eliminado nas fezes. Já a digestibilidade verdadeira é determinada levando-se em consideração o nitrogênio do próprio animal - nitrogênio metabólico, e que é excretado nas fezes juntamente com a proteína de origem alimentar não digerida. O nitrogênio metabólico é verificado nas fezes de um grupo de animais mantidos em dieta isenta de proteínas pelo mesmo período em que durar o experimento (Sgarbieri, 1987).

Em geral, as proteínas de origem animal têm boa digestibilidade, o que implica em uma eficaz absorção de aminoácidos e apresentam um maior valor nutritivo em relação a este índice. Já as proteínas de origem vegetal,

geralmente, não são bem digeridas, portanto nutricionalmente são inferiores (Tagle, 1981; Bressani, 1989).

As proteínas da soja apresentam estrutura mais organizada que a caseína, o que as torna mais resistentes ao ataque enzimático, portanto proporcionalmente uma menor digestibilidade (Maga *et al.*, 1973).

Se os animais não podem digerir as proteínas encontradas no vegetal ingerido, seus aminoácidos não são absorvidos, portanto este vegetal não é uma boa fonte de material protéico. Daí a importância de se realizar os ensaios de digestibilidade protéica, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para se determinar a qualidade das proteínas consumidas, já que as proteínas vegetais são importantes na suplementação protéica de populações de países em desenvolvimento (Abu-Tarboush e Ahmed, 1996).

Diferenças na digestibilidade protéica podem estar relacionadas à seqüência de aminoácidos e a estrutura terciária da proteína, presença de constituintes não protéicos e presença de fatores antifisiológicos que alteram a liberação dos aminoácidos das proteínas pelo processo enzimático (FAO/WHO, 1991). Boonvisut e Whitaker (1976) mostraram que a estrutura terciária da proteína afeta a digestibilidade e pode não ser facilmente destruída pelo tratamento térmico.

Altas concentrações de fibras, especialmente hemiceluloses e farelo de cereais, aumentam a excreção de nitrogênio nas fezes, reduzindo a digestibilidade da proteína em cerca de 10% (Paul e Southgate, 1978). Mesmo assim, a digestibilidade é um índice satisfatório que mede a utilização da proteína (FAO/WHO, 1991).

A **Tabela 2**, mostra os valores de referência da digestibilidade verdadeira de algumas proteínas (FAO/WHO, 1991). Os dados contidos nesta tabela demonstram que as proteínas de origem animal são bem digeridas pelo homem, portanto possuem boa qualidade nutricional, quando este índice é avaliado, portanto são consideradas como excelentes fontes de aminoácidos para os animais.

Tabela 2 – Valores da digestibilidade verdadeira de proteínas no homem*.

Fonte de Proteínas	Digestibilidade (%)
Leite de vaca integral	100
Arroz polido	93
Farinha de trigo integral	90
Milho	89
Feijões	82

*FAO/WHO, 1991.

4.2.2 - Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos Essenciais (PDCAAS)

O conteúdo de aminoácidos essenciais na dieta, a digestibilidade da proteína e a biodisponibilidade dos aminoácidos são parâmetros básicos na determinação da qualidade de uma fonte de proteínas. Estes métodos são baseados em ensaios *in vitro* ou em animais e correlacionam os dados obtidos com os estudos em humanos (FAO/WHO, 1991).

Em 1993, a FAO estabeleceu um novo método para comparar a qualidade de várias proteínas baseado na necessidade de aminoácidos dos humanos, o qual, provavelmente, oferece uma melhor avaliação da qualidade

protéica do que a PER. Este método, foi denominado Método da Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos Essenciais (PDCAAS), e é internacionalmente utilizado e sua eficácia foi reconhecida pela FAO/WHO, em 2001.

Observa-se que o PDCAAS associa vários fatores nutricionais como o perfil de aminoácidos essenciais das proteínas, digestibilidade destas e a participação percentual de aminoácidos relacionando-a as necessidades humanas.

Os valores do PDCAAS variam de 0,1 a 1,0. O valor 1,0 representa que 100% dos aminoácidos essenciais necessários a uma criança de cinco anos estão presentes na proteína. Portanto, de acordo com este método, uma proteína ideal é aquela que apresenta todos os aminoácidos essenciais requeridos pelo corpo humano (Sarwar, 1997; Schaafsma, 2000; Misner, 2000).

Aplicado aos seres humanos, o PDCAAS é padronizado para a necessidade de humanos de 2-5 anos, já que este grupo apresenta uma exigência de aminoácidos igual ou maior do que os requeridos por crianças com mais idade ou adultos (Sarwar, 1997; Henley e Kuster, 1994; Schaafsma, 2000; Misner, 2000).

Os valores de PDCAAS, de acordo com Misner (2000), de algumas proteínas alimentares são mostrados na **Tabela 3**.

Avaliando os valores de PDCAAS, contidos nesta tabela, verifica-se que tanto proteínas de origem animal quanto proteínas de origem vegetal apresentam boa digestibilidade corrigida pelo escore de aminoácidos essenciais.

Tabla 3 – Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos Essenciais (PDCAAS) de algumas proteínas alimentares*.

Proteína	PDCAAS
Soja	1,00
Soro de Leite	1,00
Ovo integral	1,00
Carne	0,92
Ervilha	0,73
Aveia	0,57
Amendoim	0,52
Arroz	0,47
Milho	0,42
Glúten	0,25

*Misner (2000).

4.2.3 - Balanço Nitrogenado (BN)

O nitrogênio dos alimentos é quase que inteiramente proveniente das proteínas, que contém em média, 16% de nitrogênio, portanto a quantidade de nitrogênio consumido multiplicado por 6,25 fornece a medida da quantidade de proteína consumida.

A medida da quantidade de nitrogênio excretada permite calcular a quantidade de proteína do corpo que foi completamente degradada e não pode ser reutilizada e a proteína consumida. Sendo que, a diferença entre a quantidade de nitrogênio consumida e a quantidade excretada na urina e nas fezes, permite determinar o balanço nitrogenado (Sgarbieri, 1987; Harper e Yoshimura, 1993).

Quando a ingestão é menor que a exigida pelo organismo, uma pequena quantidade de aminoácidos é degradada e seu nitrogênio é excretado pelo corpo, portanto o organismo está em um estado de balanço nitrogenado negativo. Se a ingestão protéica aumenta, o balanço nitrogenado torna-se menos negativo, até atingir um ponto de equilíbrio, isto é, balanço nitrogenado zero (Sgarbieri, 1987; Harper e Yoshimura, 1993).

Se o consumo de proteína excede a quantidade requerida para a manutenção do balanço nitrogenado zero, os aminoácidos excedentes podem ser degradados e a excreção de nitrogênio aumenta, o corpo apresenta um balanço nitrogenado positivo (Sgarbieri, 1987; Harper e Yoshimura, 1993).

4.2.4 - Razão de Eficiência Protéica (PER)

Osborne, Mendel e Ferry em 1919, relacionaram o ganho de peso com a quantidade de proteína consumida; o índice foi denominado Razão de Eficiência Protéica (PER). Eles demonstraram que a PER variava com o nível de proteína da dieta e recomendaram que fosse determinado o nível ideal de cada proteína. Este método foi adotado pela AOAC em 1975 (Pellet e Young, 1980).

O valor da PER, quando comparado ao ganho de peso apresentado pelos animais alimentados com proteína padrão (caseína), fornece um indicador da qualidade da proteína teste. Sendo que, qualquer proteína que apresenta um valor de PER maior que 2,7 é considerada uma excelente proteína (Sgarbieri, 1996; Misner, 2000).

Segundo Misner (2000), o valor da PER de algumas proteínas encontradas em alimentos encontra-se na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Valor da Razão de Eficiência Protéica (PER) para algumas proteínas alimentares*.

Fonte de Proteína	PER**
Proteína do soro do leite	3,6
Proteína do leite integral	3,1
Caseína	2,9
Proteína da soja	2,1

*Misner, 2000. **Razão da Eficiência Protéica = ganho de peso corporal (g)/quantidade de proteína consumida (g).

De acordo com os dados encontrados na **Tabela 4**, verifica-se que as proteínas animais apresentam qualidade protéica superior as das proteínas de origem vegetal, em relação ao PER. Observa-se que a proteína do soro do leite apresenta o maior valor PER, sendo considerada a proteína de excelente qualidade.

4.2.6 - Valor biológico (VB)

Segundo Sgarbieri, 1996, valor biológico é um dos métodos mais antigos e dos mais perfeitos de avaliação biológica de proteínas, no entanto, ele não leva em conta a digestibilidade protéica.

Valor biológico é um acurado indicador da atividade biológica de uma proteína, mede a quantidade de proteína retida por grama de proteína absorvida. Este índice mede a qualidade da proteína expressa pela razão da

eficiência protéica com que as proteínas são utilizadas para promover o crescimento (Misner, 2000).

Em uma escala de 100, representando a máxima eficiência das proteínas, o valor biológico de algumas proteínas alimentares, encontra-se na **Tabela 5**, segundo a FAO (1970).

Analisando estes dados verifica-se que as proteínas de origem animal, como a proteína do ovo, apresentam uma máxima eficiência protéica, com relação às de origem vegetal.

Tabela 5 – Valor biológico de algumas proteínas alimentares*.

Proteína	VB**
Ovo integral	93,7
Leite integral	84,5
Peixe	76,0
Carne	74,3
Soja	72,8
Arroz polido	64,0
Farinha integral	64,0
Milho	60,0
Feijão seco	58,0

*FAO (1970). **Valor Biológico (VB) =quantidade de proteína retida no corpo humano para manutenção e crescimento.

4.2.7 – Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA)

O Coeficiente de Eficiência Alimentar avalia o ganho de peso corporal do animal alimentado com uma dieta, durante um período de teste.

Este índice permite avaliar a eficiência com que o alimento ou dieta promove o ganho de peso corporal, portanto, avalia o alimento como um todo. Valor de CEA elevado, quando comparado ao da proteína padrão, permite inferir se a dieta está equilibrada nutricionalmente, refletindo, a qualidade da dieta (Pellet e Young, 1980; Sgarbieri, 1987).

OBJETIVOS

1 – GERAL

Avaliar a qualidade nutricional *in vitro* e *in vivo* das proteínas de amêndoas maduras e secas de sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.).

2 – ESPECÍFICOS

1 – Determinar a composição centesimal da farinha de sapucaia;

2 – Determinar o perfil e o escore químico dos aminoácidos das proteínas extraídas das amêndoas de sapucaia;

3 - Determinar a composição em ácidos graxos da fração lipídica da amêndoa dos frutos de sapucaia;

4 - Determinar a composição em minerais e o teor de fibras da amêndoa dos frutos de sapucaia;

5 - Estudar o valor nutricional *in vitro* das proteínas dos frutos de sapucaia, pela determinação da digestibilidade e presença de fatores antinutricionais;

6 – Avaliar a qualidade nutricional *in vivo* das proteínas dos frutos de sapucaia, pela determinação da DP e PDCAAS e dos índices de aproveitamento biológico (BN, PER, VB e CEA).

MATERIAL E MÉTODOS

1 – MATERIAL

1.1 – Amêndoas

As amêndoas da sapucaia foram obtidas de frutos maduros e secos, colhidos de árvores nativas da Estação Experimental de Santa Rita do Passa Quatro-SP, do Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais do Estado de São Paulo.

1.2 – Preparo da farinha desengordurada

As amêndoas foram trituradas, usando-se um liquidificador doméstico e peneiradas, até se obter uma massa homogênea, que foi denominado *farinha integral*.

A farinha integral foi pré-desengordurada com Éter de Petróleo PA (40-60 °C), e após este tratamento, foi colocada em um aparelho de Soxhlet (Sebelin TE-188 – TECNAL, São Paulo-SP), durante 24 horas.

Após a extração, o material desengordurado foi colocado em uma estufa a 105 °C por aproximadamente 4 h, para evaporar o éter. A farinha obtida, foi novamente triturada e peneirada, obtendo-se um pó muito fino e homogêneo, de cor amarela clara, que foi denominado *farinha desengordurada*, utilizada nos experimentos.

O éter utilizado no procedimento de extração da gordura da farinha das amêndoas da sapucaia, foi recolhido e armazenado, sendo posteriormente submetido a um processo de evaporação, obtendo-se um material oleoso

utilizado na determinação da composição em ácidos graxos dos lipídeos encontrados nas amêndoas da sapucaia.

2 – MÉTODOS

2.1 - Determinação da Composição Centesimal da Farinha

2.1.1 – Umidade

O teor de umidade contido na farinha de sapucaia, foi determinado por secagem em estufa a 105 °C por aproximadamente 4 h, pelo método descrito nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.1.2 – Carboidrato Total

O teor de carboidrato total foi determinado, utilizando-se o reagente de Fehling pelo método de redução, de acordo com os procedimentos descritos nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.1.3 – Lipídios

O teor de lipídios foi determinado pelo método de extração direta com éter de petróleo, em aparelho de Soxhlet, de acordo com as normas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.1.4 – Cinzas

As cinzas ou resíduo mineral fixo foram determinadas pelo método gravimétrico, incineração em mufla a 550 °C, descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1985) e a fibra total foi estimada por diferença.

2.1.5 – Proteínas

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo conteúdo de nitrogênio total (%), segundo o método microKjeldahl, descrito na Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1990) e multiplicado pelo fator 6,25, para a conversão do nitrogênio em proteínas, na dieta aprotéica e contendo farinha de sapucaia, e pelo fator 6,38, na dieta contendo caseína.

2.2 - Conteúdo de Ácidos Graxos

O conteúdo de ácidos graxos da fração lipídica foi obtido após metil esterificação, pelo procedimento descrito por Hartman e Lago (1973). As amostras foram saponificadas e os ácidos graxos metilados com o reagente esterificante constituído por cloreto de amônio (10 g), ácido sulfúrico (15 ml) e metanol (300 ml). A identificação e a quantificação foram realizadas utilizando-se cromatografia gás-liquido e detecção de ionização de chama, de acordo com o procedimento descrito por Firestone (1998) e Horwitz (2000), por

comparação do tempo de retenção das amostras com o metil ester padrão correspondente.

2.3 – Teor de Minerais

Os teores de micro e macrominerais foram determinados no Laboratório de Nutrição Animal da EMBRAPA, Campo Grande/Gado de Corte-MS, após digestão ácida da farinha desengordurada. O conteúdo de manganês, zinco, cobre, magnésio, e ferro foi determinado utilizando-se um espectrofotômetro de absorção atômica. O sódio e o potássio foram determinados empregando-se fotometria de chama e o fósforo e o cálcio, espectrofotometria de luz-visível (Salinas e Garcia, 1985).

2.4 – Composição de Aminoácidos e Escore Químico de Aminoácidos

A análise de aminoácidos foi realizada em analisador de aminoácidos PicoTag (Waters) como descrito por Henrikson e Meredith (1984). Resíduos de cisteína foram quantificados como ácido cistéico. O triptofano não foi determinado.

O escore de aminoácidos foi calculado utilizando-se a **Equação 1** (FAO/WHO, 1991; Sgarbieri, 1996):

Equação 1 – Equação para o cálculo do Escore Químico de Aminoácidos.

$$EQ = \frac{\text{mg de aminoácido/g de proteína teste}}{\text{mg de aminoácido na exigência padrão}}$$

2.5 – Ensaio de Atividade de Hemaglutinação

O ensaio para se verificar a atividade de hemaglutinação foi realizado em placas-U de microtitulação, utilizando-se diluições seriadas com volumes de 50 µl de NaCl 0,15 M. 50 µl de eritrócitos humanos do tipo A 2% foi adicionado e após 1h à temperatura ambiente, observou-se qual a maior diluição que apresentou aglutinação.

O título de hemaglutinação correspondente a maior diluição, em que ocorreu atividade hemaglutinante, sendo definido como uma unidade de hemaglutinação (Freire *et al.*, 2002).

2.6 – Ensaio de Atividade de Inibição

Tripsina e quimotripsina pancreática bovina foram utilizadas para o ensaio enzimático. A atividade tripsina-like foi avaliada utilizando-se N- α -benzoil-DL-arginina *p*-nitroanilida (BApNA) como substrato e atividade quimotripsina-like foi avaliada utilizando-se N-benzoil-L-tirosina *p*-nitroanilida (BTpNA) com o substrato (Macedo *et al.*, 1995) (método descrito no **Anexo I**).

2.7 – Digestibilidade *in vitro*

A digestibilidade das globulinas foi realizada pelos métodos descritos por Araújo *et al.*, em 2002 e Hsu *et al.*, em 1977. Os ensaios foram realizados utilizando-se globulinas nativas e aquecidas durante 10 minutos. As globulinas

utilizadas neste experimento foram purificadas de acordo com o procedimento descrito por Macedo *et al.*, em 1995 (descrição do método encontra-se no **Anexo I**).

2.8 - Preparo das dietas

As dietas foram preparadas de acordo com método da AIN-93G, descrito por Reeves, Nielsen e Fahey, 1993, Oliveira, Silveira e Vasconcelos, 1999, e Vasconcelos, Maia e Siebra, 2001, como mostrado na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Ingredientes necessários para o preparo de 100 g de ração*

Composição (g)	Aprotéica	Caseína	Teste
Proteína	-	-	10,0
Caseína	-	10,0	-
Óleo de Milho	8,0	8,0	8,0
Amido de Milho	72,0	62,0	62,0
Sacarose	10,0	10,0	10,0
Fibra	5,0	5,0	5,0
Mistura Vitamínica	1,0	1,0	1,0
Mistura Salina	4,0	4,0	4,0
Benzoato	0,1	0,1	0,1

*Conforme as normas da AIN-93G, descrita por Reeves, Nielsen e Fahey, 1993; Oliveira, Silveira e Vasconcelos, 1999; Vasconcelos, Maia e Siebra, 2001.

As dietas testadas foram: dieta isenta de proteína - aprotéica, para estimar a excreção de nitrogênio endógeno dos ratos; dieta com 10% de caseína - controle; dieta com 10% de farinha desengordurada de sapucaia - teste, conforme AIN-93G (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993, Oliveira, Silveira e Vasconcelos, 1999, e Vasconcelos, Maia e Siebra, 2001). Ajustes foram feitos

para acomodar os macronutrientes – proteínas, lipídeos e carboidratos, e fibras da farinha de sapucaia, com a finalidade de fornecer aos animais nutrientes necessários em quantidades adequadas.

O óleo de milho (marca comercial) foi adquirido no mercado local da cidade de Campo Grande-MS. Os componentes utilizados nas dietas eram puros (PA), e a celulose, o amido de milho, a sacarose, o mix vitamínico e a mistura salina foram adquiridos da Rhoster Indústria e Comércio Ltda., São Paulo-SP.

As dietas experimentais foram preparadas de acordo com a composição centesimal, proposta pela AIN-93G (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993, Oliveira, Silveira e Vasconcelos, 1999, e Vasconcelos, Maia e Siebra, 2001), conforme **Tabela 6**. Os ingredientes foram pesados em balança digital e homogeneizados manualmente em um recipiente de plástico com água fria.

A massa obtida foi transformada em *pellets*, utilizando-se máquina de moer carne com matriz de 0,5 de diâmetro. Depois de transformada em *pellets* foi colocada para secagem em estufa sob ventilação forçada de ar, à temperatura de 45 °C, por aproximadamente 24 h. Após a secagem as rações foram acondicionadas em sacos de polietileno para armazenamento de alimentos, identificados e armazenados em local escuro, seco e ventilado por uma semana, até serem utilizadas no experimento.

2.9 - Determinação da Composição Centesimal das Dietas

Os métodos utilizados para a determinação do teor de Umidade, Lipídeos, Proteínas, Cinzas e Fibras das dietas, foram os descritos para a

determinação da composição centesimal da farinha (**Item 2.1**). O teor de Amido e Sacarose foi determinado como descrito abaixo.

2.9.1. – Amido e Sacarose

Amido e sacarose foram determinados separadamente, pelo método da redução, utilizando soluções padronizadas de Fehling, de acordo com procedimento descrito nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985) e os resultados expressos em g/100 g, para glicídios não redutores, em sacarose e em amido.

2.10 – Ensaio Biológico

O ensaio biológico foi conduzido no Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, com o objetivo de determinar a qualidade protéica das dietas.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, Conselho Nacional de Saúde (**Anexo II**).

Foram utilizados 24 ratos machos da raça Wistar, recém-desmamados, com 21 dias de idade. Os animais foram pesados e aleatoriamente separados

em 3 grupos de 8 animais e mantidos em gaiolas metabólicas individuais, providas com recipientes de vidros para coleta de urina e fezes.

Os animais receberam água e a dieta correspondente *ad libitum*. As condições do laboratório de ensaio foram de 25 ± 3 °C e períodos alternados de claro-escuro de 12 em 12 horas (Pellet e Young, 1980).

Um grupo de animais recebeu a dieta aprotéica, outro a dieta padrão-caseína e o terceiro grupo recebeu a dieta teste, contendo a farinha de sapucaia desengordurada.

A cada dois dias todos os animais eram pesados, a água substituída, as gaiolas higienizadas e o fornecimento da dieta controlada. As sobras da dieta e as fezes eram recolhidas e pesadas, bem como a urina. O período de coleta de dados foi de 21 dias.

No final do experimento, os animais foram sacrificados, por inalação de éter etílico e as carcaças desprezadas.

Utilizando-se os dados coletados, tais como: variação de peso dos animais, quantidade de dieta fornecida e consumida, quantidade de urina e peso das fezes excretadas, e as análises laboratoriais, onde foram determinados a concentração do nitrogênio urinário- N_U , nitrogênio fecal- N_F e nitrogênio na ração- $N_{ração}$, foram calculados os seguintes índices: Digestibilidade Protéica Verdadeira (DP), Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos (PDCAAS), Balanço Nitrogenado (BN), Razão de Eficiência Protéica (PER), Valor Biológico (VB) e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA).

O cálculo de todos os parâmetros foi realizado para cada rato e as médias foram calculadas por grupo, com o objetivo de se avaliar *in vivo* a qualidade das proteínas da farinha das amêndoas da sapucaia. Para se determinar os diversos índices biológicos foram utilizadas as seguintes equações:

2.10.1 - Digestibilidade Protéica Verdadeira (DP)

Para se determinar a digestibilidade de uma proteína, medidas do nitrogênio nos alimentos e nas fezes são realizadas. A digestibilidade protéica verdadeira, foi expressa da seguinte forma (Hopkins, 1981):

Equação 2 – Equação para o cálculo da Digestibilidade Protéica Verdadeira.

$$DP (\%) = \frac{N_I - (N_F - N_M)}{N_I} \times 100$$

DP = Digestibilidade Protéica

N_I = Nitrogênio Ingerido por Animal

N_F = Nitrogênio Fecal

N_M = Nitrogênio Metabólico (nitrogênio fecal do grupo aprotéico – nitrogênio produzido por substâncias não protéicas)

2.10.2 - Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos

O PDCAAS foi calculado pela **Equação 3**, onde DP é a digestibilidade verdadeira (FAO/WHO, 2001):

Equação 3 – Equação para o cálculo da Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos.

$$\text{PDCAAS (\%)} = \frac{\text{mg do aminoácido limitante em g da proteína teste}}{\text{mg do mesmo aminoácido em g da proteína referência}} \times \text{DP}/100$$

2.10.3 – Balanço Nitrogenado

O balanço nitrogenado pode ser calculado pela **Equação 4**:

Equação 4 – Equação para o cálculo do Balanço Nitrogenado.

$$\text{BN (gN)} = N_I - (N_F - N_M) - (N_U - N_E)$$

Onde, BN = Balanço Nitrogenado

N_I = Nitrogênio Ingerido por Animal

N_M = Nitrogênio Metabólico (nitrogênio fecal do grupo aprotéico – nitrogênio produzido por substâncias não protéicas)

N_F = Nitrogênio Fecal

N_U = Nitrogênio Urinário

N_E = Nitrogênio Endógeno (nitrogênio urinário do grupo aprotéico)

2.10.4 – Razão de Eficiência Protéica (PER)

Este índice pode ser calculado utilizando-se a **Equação 5** (Sgarbieri, 1996):

Equação 5 – Equação para o cálculo da Razão de Eficiência Protéica.

$$\text{PER} = \frac{\text{variação de peso por animal (g)}}{\text{proteína consumida por animal(g)}}$$

2.10.5 – Valor Biológico (VB)

A expressão permite que o VB de proteínas seja calculado (Sgarbieri, 1996):

Equação 6 – Equação para o cálculo do Valor Biológico.

$$\text{VB (\%)} = \frac{N_I - (N_F - N_M) - (N_U - N_E)}{N_I - (N_F - N_M)} \times 100$$

Onde, VB = Valor biológico

N_I = Nitrogênio Ingerido por Animal

N_F – Nitrogênio Fecal

N_M = Nitrogênio Metabólico (nitrogênio fecal do grupo aprotéico – nitrogênio produzido por substâncias não protéicas)

N_U = Nitrogênio Urinário

N_E = Nitrogênio Endógeno (nitrogênio urinário do grupo aprotéico)

2.10.6 – Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA).

O índice de eficiência alimentar pode ser calculado de acordo com a

Equação 7 (Pellet e Young, 1980; Sgarbieri, 1987):

Equação 7 – Equação para o cálculo do Coeficiente de Eficiência Alimentar.

$$\text{CEA} = \frac{\text{variação de peso (g) por animal}}{\text{ração consumida (g) por animal}}$$

2.11 - Métodos Estatísticos

Os resultados foram expressos como médias \pm desvio padrão (S.D.), para um nível de significância igual a 5% ($p < 0,05$), onde possível. Os dados foram analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) (modelo regressão linear ou método GLM).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - Composição Centesimal da Farinha das Amêndoas de Sapucaia

A composição centesimal, expressa em grama, e o conteúdo total de calorias, expresso em quilocalorias, por 100 g da farinha integral, encontram-se na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Composição centesimal em 100 g da farinha integral de amêndoas de sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.).

Constituintes	Resultados*
Umidade	5,04±0,03
Resíduo mineral fixo (cinzas)	3,80±0,01
Lipídeos totais	60,61±0,33
Carboidratos totais	4,42±0,23
Proteínas (N x 6,25)	20,47±0,38
Fibras totais (por diferença)	5,67
Valor calórico total (kcal/100 g)**	645,05±2,07

*Médias ± desvio padrão das determinações em triplicata. **Valor calórico total foi calculado pelos fatores: 4 para proteínas e açúcares e 9 para lipídeos (FAO/WHO, 1991).

O conteúdo de lipídeos e proteínas encontrados na farinha integral das amêndoas de sapucaia foi 60,61% e 20,47%, respectivamente, revelando que estas amêndoas apresentam um alto conteúdo calórico, de 645,05 Kcal/100 g, podendo ser utilizada como complemento energético.

Franco, 1992 e Vallilo *et al.*, 1998 e 1999, que analisaram as amêndoas de sapucaia, relatam conteúdo de lipídeos totais de 62,60 e 63,04%, respectivamente, valores semelhantes aos obtidos nestas análises.

De acordo com Mello *et al.* (1998), a castanha de caju contém 46,3% de lipídeos totais e 24% de carboidratos totais. A concentração de carboidratos é

significativas maior que os encontrados na sapucaia. No entanto a quantidade de proteínas, que foi de 22%, é igual na castanha de caju e de sapucaia.

Os teores de lipídeos da castanha do Pará, igual a 69,3%, são superiores aos da sapucaia, 60,61%. No entanto, o teor de proteínas igual a 16,4%, de carboidratos, igual a 3,2% e de fibras igual a 4,6%, é inferior na castanha do Pará do que nas amêndoas de sapucaia (Ecazoo, 2006), quando comparados aos teores contidos na **Tabela 7**.

As amêndoas de sapucaia apresentaram baixos teores de fibra, 5,67%, quando comparados com as recomendações dietéticas que é de 30 g/d. No entanto, podem ser consideradas como fonte suplementar de fibras alimentares, podendo prevenir o risco de doenças crônicas (Food and Nutrition Board, 2002) e, provavelmente, a sua ingestão não deve interferir na digestibilidade protéica e na biodisponibilização de nutrientes pelo organismo (Paul e Southgate, 1978).

2 - Determinação de Ácidos Graxos

O perfil de ácidos graxos da gordura analisada mostrado na **Tabela 8**, indica um alto conteúdo de ácidos graxos insaturados, sendo 34,22% de monoinsaturados, 42,73% de poliinsaturados e 0,19% de ômega 3. Estes níveis estão de acordo com os níveis recomendados para os óleos comestíveis (Brasil, 1999; AOCS, 1996; Food and Nutrition Board, 2002).

Verificou-se uma predominância de ácido linoléico, cuja concentração foi de 42,54%, e de ácido oléico 33,94%. Este achado é importante, pois os ácidos

graxos insaturados, tal como o ácido linoléico, reduzem os níveis de colesterol plasmático em humanos (Champe e Harvey, 2000; Pratt e Corneley, 2006).

Observou-se que a relação entre ácido graxo linoléico e ácido alfa linolênico é maior que 4,0, valor máximo recomendado na dieta, de acordo com o Departamento de Saúde da Inglaterra (1994).

Tabela 8 – Teores de ácidos graxos das amêndoas de sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.), expresso em g/100 g*

Ácidos graxos	Teores
Laúrico (C _{12:0})	0,10
Mirístico (C _{14:0})	0,10
Palmítico (C _{16:0})	12,14
Palmitolêico (C _{16:1ω7})	0,19
Esteárico (C _{18:0})	6,31
Olêico (C _{18:1ω9})	33,94
Linoléico (C _{18:2ω6})	42,54
Cis-11-eicosanóico (C _{20:1ω11})	0,10
Alfa linolênico (C _{18:3ω3α})	0,19
Saturados	18,64
Monoinsaturados	34,22
Poliinsaturados	42,73
Ômega 3	0,19
Total de isômeros <i>trans</i>	ND**
Monoinsaturado/saturado	1,84
Poliinsaturado/saturado	2,30

*Area X fator de conversão (F = 0,956, de acordo com Holland, 1994). **ND: não detectado (limite de detecção = 0,01/100 g).

Segundo Hiane *et al.* (2005), os valores encontrados para os ácidos graxos monoinsaturados na sapucaia é menor do que os encontrados na castanha de bocaiúva (*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd.) – 42,5%. No entanto,

a amêndoas da bocaiúva apresenta uma concentração de ácidos graxos saturados – 49,7% - maior que as amêndoas da sapucaia.

As amêndoas de sapucaia são pobres em ácidos linolênico (0,19%), quando comparadas à castanha de bocaiúva, que apresenta uma concentração igual a 1,9%, (Hiane *et al.*, 2005). Os teores de ácido linoléico na amêndoa de sapucaia de 42,54% são elevados, quando comparados aos teores da castanha de caju, cuja concentração é de 19,6% (Ecazoo, 2006).

Na avaliação dos índices de qualidade nutricional foi observado que a relação de ácidos graxos poliinsaturados/ácidos graxos saturados e a relação de ácidos graxos moninsaturados/ácidos graxos saturados, das amostras analisadas, são semelhantes aos níveis recomendados.

Os lipídeos extraídos das amêndoas de sapucaia apresentaram baixos teores de ácidos graxos poliinsaturados denominados $\omega 3$, por exemplo o ácido linolênico, que foi de 0,19%. Estes ácidos são responsáveis por promover uma redução nos níveis de triacilgliceróis plasmáticos e diminuem a agregação plaquetária (Champe e Harvey, 2000; Pratt e Corneley, 2006).

O teor de ácidos graxos saturados encontrados nos lipídeos das amêndoas de sapucaia foi de 18,64%, sendo que 12,14%, referem-se ao ácido palmítico e 6,31%, e ácido oléico, estes teores são baixos quando comparados às concentrações dos ácidos graxos insaturados. Mas, deve-se levar em conta que a ingestão de altos níveis de gorduras saturadas pode causar um aumento dos níveis de LDL e HDL (Champe e Harvey, 2000; Food and Nutrition Board, 2002; Pratt e Corneley, 2006).

Estudos clínicos recentes mostraram que, altas concentrações de ácidos graxos *trans* podem diminuir os níveis de HDL e aumentar os níveis de LDL no sangue, tanto quanto os ácidos graxos saturados (Champe e Harvey, 2000; Food and Nutrition Board, 2002; Pratt e Corneley, 2006). Nas amostras analisadas não foi detectada a presença destes isômeros.

Portanto, as amêndoas de sapucaia demonstraram ser excelentes fontes de ácido linoléico, um ácido graxo essencial. E o alto conteúdo de ácidos graxos insaturados e ausência de isômeros *trans*, indicam que podem ser consumidas pelos humanos, sendo uma boa fonte de gordura e calorias. Os dados obtidos são similares aos encontrados na literatura (Vallilo *et al.*, 1998 e 1999).

3 - Composição Mineral

O conteúdo de macro e microminerais da farinha das amêndoas de sapucaia são mostrados na **Tabela 9**, sendo que os microminerais são apresentados em $\mu\text{g.g}^{-1}$ e os macrominerais em mg.g^{-1} .

Observou-se que o fósforo e potássio, que apresentaram uma concentração de 8,75 mg/g e 8,90 mg/g, respectivamente, predominam.

O potássio é principal cátion do fluído intracelular e a sua concentração nos tecidos magros é importante na avaliação da massa magra de uma pessoa. Este cátion está envolvido na contração muscular e é utilizado para contrabalancear o efeito hipertensor do sódio, pois ele provoca queda de pressão (De Angelis, 1977).

Tabela 9 – Conteúdo de macro e microminerais das amêndoas de sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.).

Elementos	Teores*	RDA** (mg/d)
	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	
Na	5,28±0,00	1500
Fé	32,65±1,36	0,015
Mn	80,69±2,20	2,3
Zn	40,37±0,38	11
Cu	32,76±1,14	0,9
	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	
Ca	1,72±0,02	1000
Mg	2,79±0,10	400
P	8,75±0,51	700
K	8,90±0,04	4700

*Médias \pm desvio padrão das determinações em triplicata. **RDA – Necessidades Dietéticas Recomendadas – homens 25-50 anos (Food and Nutrition Board, 2002).

O fósforo é encontrado em todos os órgãos e tecidos do corpo, a maior parte formando um complexo com o cálcio nos ossos, onde o fósforo exerce atividades osteoblásticas e osteoclásticas. O fósforo participa do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos e é constituinte dos fosfolídeos, fosfocreatina, fosfoarginina, AMPc, ATP e nucleoproteínas. Na forma de fosfato inorgânico atua como tampão no líquido intracelular (De Angelis, 1977).

Vallilo *et al.* em 1998 e 1999, analisaram as amêndoas de sapucaia e encontraram concentrações similares para o fósforo, magnésio e cálcio. No entanto, os teores de manganês, zinco e cobre, 80,69 $\mu\text{g}/\text{g}$, 40,37 $\mu\text{g}/\text{g}$ e 32,76 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectivamente, encontrados nesta análise são significativamente maiores que os encontrados por Vallilo *et al.*, em 1998 e 1999, que encontraram 12 $\mu\text{g}/\text{g}$ para p manganês, 13,74 $\mu\text{g}/\text{g}$ para o zinco e 3,2 $\mu\text{g}/\text{g}$ para o cobre. Estas diferenças podem estar relacionadas ao estágio de maturação dos frutos, época de colheita, condições climáticas, como umidade, tempo e

condições de armazenamento, já que estes fatores influenciam na concentração de constituintes químicos dos frutos.

Considerando que, uma amêndoa de sapucaia pesa em média 3,4 g, com base nos dados obtidos neste experimento, pode-se dizer que estas amêndoas são excelentes fontes de ferro, manganês e cobre já que a ingestão de de 10 castanhas/dia pode suprir estas necessidades e representar uma importante fonte complementar de sódio, zinco, cálcio, magnésio, fósforo

Comparando-se com as necessidades diárias recomendadas para crianças e adultos (National Academy Press, 2002), as amêndoas de sapucaia podem ser consideradas como uma fonte complementar de minerais importantes requeridos na dieta humana, principalmente, para crianças.

4 - Análise de Aminoácidos

4.1 - Composição de Aminoácidos

A qualidade das proteínas como fonte de aminoácidos pode ser avaliada pela comparação com os padrões de aminoácidos essenciais recomendados pela FAO (FAO/WHO, 1991).

Na **Tabela 10** pode ser observado que as proteínas das amêndoas de sapucaia apresentaram níveis adequados de aminoácidos essenciais quando comparados os padrões recomendados.

Tabela 10 – Composição de aminoácidos das proteínas das amêndoas de sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.), em mg/g de proteína.

Aminoácidos	Sapucaia	Ovo integral *	Leite de Vaca*	Carne Bovina*	Padrão Recomendado**
Alanina	87,8				
Arginina	169,1				
Aspartato	110,0				
Cisteína	15,4				
Glutamato	275,3				
Glicina	157,1				
Histidina	19,3	22	27	34	19
Isoleucina	29,5				28
Leucina	113,8	54	47	48	66
Lisina	82,1	86	95	81	58
Metionina	89,6	70	78	89	25***
Fenilalanina	106,6	93	102	80	63****
Prolina	229,0				
Serina	86,5				
Treonina	34,4	47	44	46	34
Triptofano	ND	17	14	12	11
Tirosina	32,5				
Valina	62,0	66	64	50	35

*FAO, 1970. **FAO/WHO (1991). ***Cisteína + metionina. ****Fenilalanina + tirosina. Triptofano não foi determinado – ND. Os aminoácidos essenciais estão em negrito.

A concentração de fenilalanina encontrada foi de 106,6 mg/g, lisina de 82,1 mg/g, leucina de 113,8 mg/g, metionina de 89,6 mg/g e valina de 62,0 mg/g. Os teores destes aminoácidos na farinha de sapucaia, quando comparados aos níveis recomendados é elevado. Já a histidina com uma concentração de 19,3 mg/g, isoleucina de 29,5 mg/g e treonina de 34,4 mg/g, apresentaram níveis semelhantes aos recomendados, baseando-se nas referências padrão para crianças prescritas pela FAO/WHO (1991).

Além disso, observou-se que as proteínas das amêndoas de sapucaia apresentam teores de aminoácidos sulfurados, metionina + cisteína, igual a 105 mg/g. O alto conteúdo de aminoácidos sulfurados encontrado na farinha de sapucaia, indica que ela pode complementar as farinhas de leguminosas ou ser utilizada independentemente. Pois, suas proteínas contêm, quantidades adequadas de aminoácidos essenciais, principalmente sulfurados, para crianças na pré-escola e todos os aminoácidos essenciais para adultos (FAO/WHO, 1991). A concentração de triptofano não foi determinada.

Comparando-se estes dados com o conteúdo de aminoácidos de proteínas animais, tais como do ovo integral, leite de vaca e carne bovina, como pode ser observado na **Tabela 10**, pode-se concluir que as amêndoas de sapucaia é uma excelente fonte de aminoácidos, pois o perfil de aminoácidos encontrado nestas amostras é similar ao perfil de aminoácidos encontrados em proteínas animais.

4.2 – Escore Químico de Aminoácidos

Aparentemente, proteínas e dietas com um conteúdo e um perfil de aminoácidos essenciais, que efetivamente preenche as necessidades dietéticas de crianças de faixa etária baixa, podem também ser adequadas para crianças de faixa etária maior e de adultos, no entanto, o inverso pode não ser verdadeiro (FAO/WHO, 1991).

Para se ajustar os níveis de aminoácidos dieteticamente necessários para uma determinada faixa etária, são calculados o escore químico dos aminoácidos essenciais, determinando-se o aminoácido mais limitante, isto é, o

aminoácido que apresenta maior deficiência para o grupo etário envolvido (Pellet e Young, 1980; FAO/WHO, 1991).

Os valores obtidos para o conteúdo de cada aminoácido essencial nas proteínas das amêndoas de sapucaia (**Tabela 10**) foram divididos pelos valores recomendados pela FAO do aminoácido correspondente (1991), e o resultado, denominado escore de aminoácido que pode ser observado na **Tabela 11**, permitiu determinar se havia algum aminoácido limitante nas proteínas estudadas.

Tabela 11 – Escore químico de aminoácidos das proteínas das amêndoas de sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.)

Aminoácidos	Conteúdo (mg/g)	Padrão recomendado (mg/g)*	Escore químico
Treonina	34,4	34	1,01
Histidina	19,3	19	1,02
Isoleucina	29,5	28	1,05
Lisina	82,1	58	1,42
Fenilalanina**	106,6	63	1,69
Leucina	113,8	66	1,72
Valina	62,0	35	1,77
Metionina***	105,0	25	3,58
Triptofano	****ND	11	****ND

*FAO/WHO (1991). **Fenilalanina + tirosina. ***Cisteína + metionina. ****ND – não determinado.

Baseando-se no escore químico dos aminoácidos essenciais, as proteínas das amêndoas de sapucaia não apresentaram aminoácido limitante, como pode ser observado na **Tabela 11**, podendo ser consideradas de alto valor nutricional. A treonina apresentou o menor escore, mesmo assim, maior que 1,0, portanto acima dos níveis recomendados (FAO/WHO, 1991), sendo

que o escore químico para os aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína), foi de 3,58.

Sgarbieri, em 1987, relata que a alta concentração de aminoácidos sulfurados das farinhas pode influenciar as propriedades funcionais e tecnológicas, favorecendo a formação de gel, bem como as propriedades fisiológicas.

Tendo-se observado que a farinha de amêndoas de sapucaia é rica em aminoácidos sulfurados, fica evidente a necessidade de novos estudos, para se verificar a aplicação tecnológica desta farinha. Suas propriedades funcionais, tais como composição em vitaminas, análise sensorial, comportamento binário – tempo e temperatura, formas de apresentação para aplicar na produção de alimentos, devem ser estudadas. Um estudo agrônomo deve ser feito para se estudar o cultivo da sapucaia em escala comercial.

Dados relativos ao perfil de aminoácidos de proteínas da sapucaia não foram encontrados na literatura. No entanto, quando se compara os dados obtidos no experimento, ao escore de aminoácidos de outras fontes protéicas, como da soja, carne bovina e ovo integral, verifica-se que as amêndoas da sapucaia apresentam um escore similar, com exceção dos aminoácidos sulfurados (Pires *et al.*, 2006), que, na farinha de sapucaia estão presentes em concentração elevada.

Estes dados indicam que as proteínas das amêndoas da sapucaia são de alto valor nutritivo, possuindo a capacidade dietética de suprir as necessidades desta natureza com níveis adequados de todos os aminoácidos essenciais para crianças e adultos, principalmente no que se relaciona aos

aminoácidos sulfurados, podendo substituir ou complementar dieta de humanos, como fonte de proteínas e aminoácidos.

5 - Fatores Antinutricionais

A qualidade da proteína é afetada por fatores antinutricionais que interagem com as células do trato digestivo, tais como inibidores de proteinases, lectinas e taninos, reduzindo a digestibilidade protéica e a absorção de aminoácidos. Se não forem destruídos pelo aquecimento ou por um tratamento adequado, estas substâncias podem causar efeitos fisiológicos adversos quando ingeridos pelo homem ou animais (Rangel *et al.*, 2004).

No presente estudo, não foi observada atividade hemaglutinante e serino proteinases nas amostras analisadas (**Tabela 12**). Isto indica, que as amêndoas de sapucaia, apresentam nível não detectável de lectinas e de inibidores de proteinases, respectivamente e que, portanto, estas amêndoas não apresentam estes dois importantes fatores antinutricionais.

Tabela 12 – Atividade de inibição de proteinases e de hemaglutinação das proteínas de amêndoas de sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.).

Proteínas	Atividade hemaglutinante (título)*	Inibidores de proteinases (UI/mg)	
		tripsina	quimotripsina
Albumina	ND**	ND**	ND**
Globulina	ND**	ND**	ND**
Prolamina	ND**	ND**	ND**
Glutelina	ND**	42,5	ND**
Extrato Total	1	64,0	ND**

*Título é definido como a maior em que se observou aglutinação dos eritrócitos. A quantidade de proteína usada no ensaio foi 100µg/ml. **Não detectado.

Este é um achado relevante, porque muitos destes compostos inibem as enzimas digestivas ou reagem com os aminoácidos essenciais, limitando o uso de farinhas integrais de sementes em produtos alimentares. Lectinas ligam-se às células da mucosa intestinal, impedindo a digestão e a absorção de nutrientes (Higuchi, Suga e Iwai, 1983) e reduzindo a digestibilidade protéica pela inibição das enzimas digestivas (Thompson, Tenebaum e Hui, 1986).

6 - Digestibilidade *In Vitro* das Globulinas das Amêndoas da Sapucaia

Muitos estudos, realizados para responder questões relacionadas à qualidade das plantas, têm sido focados na fração globulínica. As globulinas foram escolhidas para serem utilizadas neste experimento, pois apresentaram um maior rendimento no processo de extração e um maior conteúdo protéico.

O conteúdo de proteínas totais das amêndoas de sapucaia obtido pelo método de Bradford (1976) foi de 66%, sendo que 58,7% eram proteínas da fração globulínica, como pode ser observado na **Tabela 4** do **Anexo I**. Após o fracionamento foi estimada a massa molecular das frações que constituem as proteínas da sapucaia, como pode ser observado na **Figura 1** do **Anexo I**.

Para se verificar a digestibilidade *in vitro* das globulinas nativas e aquecidas das amêndoas de sapucaia, foi utilizado um sistema multienzimático (quimotripsina + tripsina + peptidase – 1:1:1). Isto se fez necessário já que as globulinas nativas e aquecidas são fracamente digeridas pela pepsina, quimotripsina e pepsina quando isoladas (Araújo *et al.*, 2002). Isto pode ser observado na eletroforese em SDS-PAGE da digestibilidade *in vitro* das

globulinas nativas e aquecidas utilizando-se as enzimas isoladas e o complexo multienzimático, **Figuras 2, 3 e 5** do **Anexo I**, respectivamente.

Verificou-se que o complexo multienzimático foi eficiente na digestão das globulinas, como pode ser observado na **Tabela 13**. As globulinas nativas apresentaram uma digestibilidade *in vitro* de 70,30%. Quando as globulinas da sapucaia foram aquecidas por 10 min observou-se um valor de 71,35%, um aumento estatisticamente não significativo da digestibilidade ($p < 0,05$). A digestibilidade da caseína nativa – 81,80% e aquecida – 84,57%, também não apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$). A **Figura 4** do **Anexo I** é a representação gráfica da digestibilidade *in vitro*, pelo complexo multienzimático (tripsina + quimotripsina + peptidase), das globulinas e caseína nativas e aquecidas das amêndoas de sapucaia.

Tabela 13 – Digestibilidade *in vitro*, pelo complexo multienzimático (tripsina + quimotripsina + peptidase), das globulinas e caseína nativas e aquecidas das amêndoas de sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.).

Proteínas	Digestibilidade <i>in vitro</i> (%) [*]
Globulinas nativas	70,30±4,68
Globulinas aquecidas	71,35±4,64
Caseína nativa	81,80±3,68
Caseína aquecida	84,57±4,68

^{*}Médias ± desvio padrão das determinações em triplicata. Valores não significativos para o teste ANOVA ($p < 0,05$).

O aumento na digestibilidade das globulinas da sapucaia, quando se utilizou o complexo multienzimático, indica que as enzimas digestivas necessitam atuarem juntas, para hidrolisar as proteínas da sapucaia, provavelmente, por tornarem as ligações peptídicas mais suscetíveis à hidrólise.

O insignificante aumento na digestibilidade das globulinas, após o aquecimento, indica que estas proteínas podem ser consumidas *in natura*, pois a temperatura não altera a digestibilidade de suas proteínas e elas apresentam níveis muito baixos de fatores antinutricionais tais como lectinas e inibidores de proteinases.

7 - Composição Centesimal das Dietas

A composição centesimal das dietas utilizadas no ensaio biológico - dieta isenta de proteína - aprotéica, dieta contendo caseína e dieta contendo a farinha desengordurada de sapucaia - teste, encontra-se na **Tabela 14**.

Tabela 14 – Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos para avaliação nutricional da farinha de sapucaia, expressas em g/100 g de ração.

Constituintes	Dietas		
	Aprotéica	Controle	Teste
Umidade	4,30±0,01	4,83±0,08	5,49±0,02
Minerais	3,94±0,03	3,89±0,03	3,70±0,02
Proteínas	0,36±0,06	11,03±0,03	10,09±0,09
Lipídeos	8,06±0,02	8,24±0,01	7,95±0,05
Fibras (por diferença)	5,44±0,23	4,37±0,05	5,08±0,18
Carboidratos – Amido	72,27±0,20	62,26±0,83	62,68±0,35
Carboidratos – Sacarose	9,93±0,03	10,21±0,15	10,50±0,27
Valor Calórico Total**	402,78±1,68	408,16±1,01	404,63±1,63

*Médias ± desvio padrão das determinações em triplicata. ** Valor calórico total foi calculado, empregando-se os seguintes fatores: 4 para proteínas e carboidratos e 9 para lipídeos (FAO/WHO, 1991).

Observa-se que a concentração dos constituintes das dietas encontra-se dentro as recomendações da AIN-93G (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993,

Oliveira, Silveira e Vasconcelos, 1999, e Vasconcelos, Maia e Siebra, 2001), quando comparados aos teores contidos na **Tabela 6**. Também não se verificou diferença estatisticamente significativa, quando as diferentes dietas foram comparadas.

As dietas não apresentaram diferença estatística significativa para $p < 0,05$, em relação ao conteúdo energético, quando comparadas entre si, portanto, provavelmente, não afetaram as necessidades calóricas dos animais, não influenciando nos resultados obtidos nos experimentos.

Nenhuma diferença foi observada em relação ao teor de proteína nas dietas controle e teste, indicando que não houve influencia deste constituinte nos experimentos, no que se refere às concentrações.

8 - Ensaio Biológico

Para se determinar a qualidade protéica das dietas testadas os animais foram avaliados durante 21 dias e os dados coletados, total de fezes excretadas, consumo de dieta e variação de peso dos animais, durante este período são mostrados na **Tabela 15**.

Tabela 15 – Consumo de dieta, variação de peso e total de fezes produzidas pelos ratos alimentados com dieta aprotéica, controle e teste.

Dieta	Total de fezes produzidas	Consumo de dieta*	Varição de peso*
Aprotéica	48,818	79,81±19,56	-10,96±2,29
Controle	114,162	226,71±22,29	65,07±10,73
Teste	117,736	217,43±19,76	52,76±12,06

*Médias ± desvio padrão por rato, para grupos de 8 ratos – valores não significativos pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

8.1 – Variação de Peso

Dados relativos ao consumo de dieta, variação de peso e total de fezes excretadas apresentados na **Tabela 15**, mostram que o consumo de ração do grupo controle foi em média 226,71g e do grupo teste foi em média 217,43g. Em relação ao ganho de peso, o grupo controle apresentou uma média de 65,07 g e o teste uma média de 52,76g.

Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando se empregou a dieta contendo caseína (controle) e a dieta contendo farinha de sapucaia (teste) como fonte de proteínas, embora tenha sido observada uma tendência de menor ganho de peso no grupo que recebeu a farinha de sapucaia.

Estes dados evidenciam que as proteínas das amêndoas de sapucaia apresentam o mesmo valor nutritivo que a caseína. Supõe-se, portanto, um bom aproveitamento das proteínas encontradas na farinha da sapucaia.

Como o consumo da dieta contendo farinha de sapucaia e da dieta contendo caseína não diferiu, pode-se deduzir que a sapucaia apresenta boa palatabilidade, o que pode influir no consumo, o que pode ser avaliado pela realização de testes sensoriais.

8.2 – Digestibilidade Protéica Verdadeira

Digestibilidade é a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácido pelo organismo, sendo um determinante da qualidade da proteína.

É o primeiro fator que afeta a eficiência protéica da dieta. Se algumas ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, parte da proteína é excretada nas fezes ou transformada em produtos do metabolismo pelos microorganismos do intestino grosso (Sgarbieri, 1987).

Na **Tabela 16**, é mostrado os valores da digestibilidade verdadeira e da digestibilidade corrigida pelo escore de aminoácidos essenciais, das proteínas da dieta controle e da dieta teste.

Tabela 16 – Digestibilidade verdadeira e digestibilidade protéica corrigida pelo escore de aminoácidos essenciais (PDCAAS) das proteínas de dietas contendo caseína e sapucaia.

Digestibilidade (%)	Dietas*	
	Caseína	Teste
Verdadeira	94,3415±0,48	93,8583±0,60
PDCAAS	0,9434±0,00	0,9480±0,00

*Médias ± desvio padrão das determinações em triplicata – valores não significativos pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

Neste experimento, o valor da digestibilidade *in vivo* das proteínas da farinha de sapucaia foi de 93,86% e quando comparada à digestibilidade da caseína que foi de 94,34%, não apresentou diferença estatística significativa. Isto mostra que do ponto de vista da digestibilidade a qualidade nutricional das proteínas da sapucaia é equivalente à da caseína.

As proteínas do leite integral de vaca, do arroz polido e da farinha de trigo integral, apresentam os seguintes valores para digestibilidade verdadeira 100%, 93% e 90%, respectivamente (FAO, 1991). Isto demonstra que as proteínas das amêndoas da sapucaia podem ser comparadas a estas proteínas, portanto ao que refere a digestibilidade estas proteínas são consideradas de boa qualidade.

8.3 - Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos Essenciais (PDCAAS)

O Método da Digestibilidade Protéica Corrigida pelo Escore de Aminoácidos Essenciais (PDCAAS) compara a qualidade de várias proteínas com base na necessidade de aminoácidos dos humanos. Sendo que uma proteína ideal é aquela que apresenta todos os aminoácidos essenciais requeridos pelo corpo humano, representado por um valor de 1,0.

Aplicado aos seres humanos, o PDCAAS é padronizado para a necessidade de humanos de 2-5 anos, já que este grupo apresenta uma exigência de aminoácidos igual ou maior do que os requeridos por crianças com mais idade ou adultos (Sarwar, 1997; Schaafsma, 2000; Misner, 2000).

Para se calcular o PDCAAS da caseína, foi utilizado o escore de aminoácidos relatado por Pires *et al.* (2006) na **Tabela 1**, sendo que o aminoácido com o menor escore, encontrado pelos pesquisadores na caseína, foi o da histidina com escore igual a 1,0.

Na **Tabela 16**, são mostrados os valores da digestibilidade e do PDCAAS da caseína, 0,94 e das proteínas da sapucaia, 0,95, sendo que estes índices não apresentam diferença estatística significativa.

Portanto, pode-se concluir que as proteínas da sapucaia, com um PDCAAS numericamente superior ao da caseína, apresentaram boa qualidade. E mesmo quando comparado a proteínas como a da soja, do soro de leite e do ovo integral que apresentam PDCAAS igual a 1,00 e da carne bovina igual a 0,92 (Misner, 2000) estas proteínas se mostraram com alto valor nutricional,

em relação a este índice, podendo ser comparadas a proteínas de origem animal.

8.4 - Balanço Nitrogenado (BN)

Durante o período de teste, a quantidade de proteína consumida por animal do grupo controle foi de 20,55g - alimentado com a dieta contendo caseína, e do grupo teste foi de 21,54g – alimentado com a dieta contendo farinha de sapucaia, não apresentam diferença estatística significativa ($p < 0,05$), como pode ser observado na **Tabela 17**.

Tabela 17 – Quantidade de proteína consumida (g) e percentagem de nitrogênio nas dietas ingeridas pelos ratos durante o período de teste.

Dietas	Proteína consumida por animal*	Nitrogênio na ração*
Controle	20,5541±2,02	1,7288±0,02
Teste	21,5364±1,94	1,6144±0,01

*Médias ± desvio padrão das determinações em triplicata.

As porcentagens de nitrogênio encontradas nas dietas controle e teste, 1,73% e 1,61%, respectivamente, não apresentam diferença estatística significativa para um nível de significância igual a 6% ($p < 0,06$). Não devendo, portanto, interferir nos índices a serem avaliados.

A medida da quantidade de nitrogênio excretada permite calcular a quantidade de proteína do corpo que foi completamente degradada e não pode ser reutilizada e a proteína consumida. Sendo que, a diferença entre a quantidade de nitrogênio ingerido e a quantidade excretada na urina e nas

fezes, permite determinar o balanço nitrogenado (Sgarbieri, 1977; Harper e Yoshimura, 1993).

A **Tabela 18**, contém os teores de nitrogênio ingerido, de nitrogênio excretado nas fezes e de nitrogênio urinário excretado, por animal e a percentagem de nitrogênio fecal, estes dados permitiram calcular o balanço de nitrogênio para ratos alimentados com dieta contendo caseína e farinha de amêndoas de sapucaia.

Tabela 18 – Balanço de nitrogênio para ratos alimentado com dieta controle e teste.

Nitrogênio	Dietas		
	Aprotéica*	Controle*	Teste*
Ingerido/animal (g)	-	3,9177±0,39	3,5108±0,32
Fecal (%)	1,69±0,02	2,38±0,01	1,97±0,02
Fecal/animal (g)	0,1179	0,3396	0,3313
Urinário/animal (g)	0,0451±0,003	0,3769±0,01	0,3513±0,03
Balanço Nitrogenado (g)	-	3,4370±0,38	3,0645±0,32

*Médias ± desvio padrão das determinações em triplicata – valores não significativos pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

Neste experimento verificou-se que, o balanço nitrogenado apresentado pelos animais que ingeriram a dieta preparada com a farinha de sapucaia, igual a 3,07g e os animais que ingeriram a dieta contendo caseína, igual a 3,44g, não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Portanto, as proteínas de sapucaia apresentaram índice de retenção, a partir do nitrogênio ingerido, semelhante ao da caseína. O balanço nitrogenado foi positivo nos dois grupos, mostrando que a ingestão de nitrogênio foi maior que a excreção fecal e urinária.

8.5 - Razão de Eficiência Protéica (PER)

O valor de PER para a caseína e para as proteínas da sapucaia encontra-se na **Tabela 19**.

Os dados obtidos neste experimento, mostram que as proteínas das amêndoas da sapucaia e a caseína, apresentaram PER igual a 2,43 e 2,59, respectivamente. Estes valores apresentam uma diferença numérica, porém não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Tabela 19 – Índices de aproveitamento biológico (PER, CEA, VB) da proteína de dietas contendo caseína e sapucaia.

Índices	Dietas*	
	Caseína	Teste
PER	2,5929±0,25	2,4284±0,38
CEA	0,2859±0,03	0,2428±0,62
VB(%)	92,9293±0,69	92,8591±0,75

*Médias ± desvio padrão das determinações em triplicata – valores não significativos pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

Segundo Misner (2000), o valor de PER para a caseína é igual a 2,9. No entanto, o valor obtido, neste experimento, foi de 2,6. A diferença observada pode ser devido à concentração da proteína na caseína utilizada, às condições do experimento, manuseio e linhagem dos animais, que interferem na PER.

O valor de PER para as proteínas da sapucaia, é superior ao apresentado pela soja, que é de 2,1 (Misner, 2000; Kreider, 2005) e superior ao das proteínas da farinha de trigo que é igual a 1,5 e da carne igual a 2,2 (Kreider, 2005).

De acordo com Sgarbieri (1996) e Misner (2000), qualquer proteína que apresenta um valor de PER maior que 2,7 é considerada uma excelente proteína. Quando comparado ao valor de referência 2,7 para a PER, as proteínas da sapucaia apresentaram um índice menor do que o recomendado.

No entanto, o índice obtido é similar ao obtido pela caseína neste experimento, não diferindo estatisticamente. Mostrando que as proteínas das amêndoas da sapucaia apresentam qualidade nutricional semelhante a da caseína.

8.6 - Valor Biológico (VB)

O valor biológico mede a qualidade da proteína expressa pela razão da eficiência protéica com que as proteínas são retidas ou utilizadas para promover o crescimento (Misner, 2000).

Analisando-se os dados contidos na **Tabela 19**, verifica-se que as proteínas da farinha de amêndoas de sapucaia apresentam um valor biológico igual a 92,86% e a caseína 92,93%, estes valores são estatisticamente iguais ($p < 0,05$), demonstrando que a quantidade de nitrogênio retido, quando comparado ao total de nitrogênio absorvido é semelhante.

Comparado aos valores encontrados para proteínas animais, como do ovo integral igual a 93,7% e do leite de vaca integral igual a 84,5% (FAO, 1970), a sapucaia apresenta valor biológico semelhante aos de proteínas animais. Este dado demonstra que a sapucaia apresenta um excelente aproveitamento biológico.

8.7 - Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA)

O Coeficiente de Eficiência Alimentar avalia o ganho de peso corporal do animal alimentado com uma dieta, durante um período de teste (Pellet e Young, 1980; Sgarbieri, 1987).

Avaliando a eficiência alimentar, ganho de peso/ingestão alimentar (**Tabela 19**), observou-se que os animais que receberam as proteínas de sapucaia, apresentaram valores de CEA similar ao controle, 0,24 e 0,29, respectivamente, não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$).

Este resultado demonstrou que a dieta contendo a farinha das amêndoas de sapucaia, provavelmente, apresentou um aproveitamento biologicamente tão bom quanto à caseína, e que a dieta estava bem equilibrada nutricionalmente, refletindo, portanto, a qualidade da dieta.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste experimento permitem concluir que as proteínas das amêndoas maduras e secas de sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.) apresentaram alto valor nutricional tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, estas amêndoas:

1 – Representam importante fonte de lipídeos ricos em ácidos graxos insaturados, predominando o ácido linoléico e ácido oléico, não sendo detectada a presença de isômeros *trans*.

2 – Apresentaram baixos teores de fibra, quando comparados com os recomendados, mas podem ser consideradas como fonte suplementar de fibras alimentares.

3 – Quanto ao teor de minerais, são fontes de ferro, manganês e cobre, para uma ingestão diária de 10 amêndoas.

4 – Revelaram níveis baixos ou não detectáveis de lectinas e inibidores de proteinases, demonstrando não apresentar os principais fatores antinutricionais.

5 – Não foi observada diferença na digestibilidade *in vitro* das globulinas, principal fração protéica, tanto nativas quanto aquecidas.

6 – Baseando-se no escore químico dos aminoácidos essenciais, as proteínas das amêndoas de sapucaia não apresentaram aminoácido limitante.

7 – No ensaio biológico, para verificar o aproveitamento protéico, com ratos em crescimento, apresentaram valores de consumo de dieta, ganho de peso, quantidade de proteína consumida por animal, nitrogênio ingerido nas dietas e balanço nitrogenado, semelhantes aos da caseína.

8 – Quanto aos índices de aproveitamento biológico, as suas proteínas apresentaram índices de Digestibilidade Verdadeira e PDCAAS, Balanço de Nitrogênio, PER, Valor Biológico e CEA semelhantes ao da caseína.

Conclui-se que as amêndoas de sapucaia podem ser utilizadas no combate a desnutrição protéico-energética. Podendo ser exploradas como uma fonte de lipídeos e de proteínas de excelente qualidade nutricional. Suas proteínas apresentam todos os aminoácidos essenciais em teores acima dos recomendados para crianças e adultos e níveis elevados de aminoácidos sulfurados, podendo ser utilizadas como complemento de proteínas com baixos teores destes aminoácidos. Não apresentam lectinas e inibidores de proteinases, provavelmente, seu consumo não traz risco à saúde humana e de animais.

REFERÊNCIAS

1. Plantas Brasileiras, 2002. Plantas Medicinais do Brasil. Disponível em: <http://www.brazilian-plants.com/br/database.cfm>. Acesso em 23.04.2006.
2. Margherita Leoni, 2004. *Lecythis pisonis*. Disponível em: <http://www.margheritaleoni.com/disegnifiori/novita.asp?sidq=35033A8964>
5. Acesso em 23.04.2006.
3. Ecazoo, 2006. Cashew Nutritional Value. Disponível em: <http://www.ecazoo.com/cashews/default.asp>. Acesso em 22.04.2006.
4. Plantarum, 2006. Futura - Programa "Um Pé de Quê" Sapucaia. Disponível em: www.plantarum.com.br/futura.html. Acesso em 22.04.2006.
5. Wikipedia, 2006. Lecythidaceae. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Sapucaia> <http://pt..org>. Acesso em 22.04.2006.
6. Árvores do Brasil, 2006. *Lecythis pisonis*. Disponível em: <http://www..nom.br/sapuca1/index.htm>. Acesso em 22.04.2006.
7. Abu-Tarboush HM, Ahmed SAB, 1996. Studies on Karkade (*Hibiscus sadariffa*): protease inhibitors, phytate, *in vitro* protein digestibility and gossypol content. Food Chemistry, 56:1, 15-19.
8. Ahmed AE, Smithard R, Ellis M, 1991. Activities of enzymes of the pancreas, and the lumen and mucosa of the small intestine in growing broiler cockerels fed on tannin-containing diets. Brazilian Journal of Nutrition, 65:2, 189–197.
9. Amaya H, Acevedo E, Bressani R, 1991. Efecto del recalientamiento sobre la disponibilidad de hierro y valor nutritivo de la proteína del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) cocido. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 16:2, 222-237.

10. American Oil Chemist's Society, 1996. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society. 4th ed. Champaign, AOCS, (sections C, p1-5; I, p37).
11. Araújo AH, Cardoso CB, Pereira EA, Lima LM, Oliveira AS, Miranda MRA, Xavier-Filho J, Sales MP, 2002. *In vitro* digestibility of globulins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and xerophitic algaroba (*Prosopis juliflora*) seeds by mammalian digestive proteinases: a comparative study. Food Chemistry, 78, 143-7.
12. Association of Official Analytical Chemists, AOAC, 1975. Official methods of analysis of the association of official/analytical chemists. 12th ed., ed. W. Horwitz, Washington, D.C.
13. Association of Official Analytical Chemists, AOAC, 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Washington, v1-2.
14. Belitz HD, Weder JKP, 1990. Protein inhibitors of hydrolases in plants foodstuffs. Food Review International, 6, 151-211.
15. Boonvisut S, Whitaker JR, 1976. Effect of heat, amylase and disulfide bond cleavage on the *in vitro* digestibility of soybean proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 24:6, 1130-1135.
16. Borsoi MA, 2001. Nutrição e Dietética: noções básicas. São Paulo: SENAC, 79.
17. Bos C, Juliet B, Fouilet H, Turlan L, Daré S, Luengo C, N'tounda R, Benamouzig R, Gausserès N, Tomé D, Gaudichon C, 2005. Postprandial metabolic utilization of wheat protein in humans. American Journal of Clinical Nutrition, 81:7, 87-94.
18. Boucqué CHV, Fiems LO, 1988. Vegetable by products of agro-industrial origin. Livestock Production Science, 19:1-2, 97-135. (Special Issue).

19. Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
20. Brasil, Leis, Decretos. Resolução nº 482, de 23 de set. 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 13 out. 1999, Secção I, p82-87 (Anexo 3 – Óleo de Amendoim).
21. Bressani R, 1989. Revisión sobre calidad del grano de frijol. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 39:3, 419-42.
22. Bressani R, Elias LG, 1979. Mejoramento de la calidad nutricional de las leguminosas. In: *Anais - Seminário nacional sobre integração da pesquisa nutricional e alimentar*, João Pessoa.
23. Burkitt DP, Towell H, 1975. *Refined carbohydrates foods and disease*. The Academic Press, N.Y.
24. Champe PC, Harvey RA, 2000. In *Bioquímica Ilustrada*. Artmed Editora, Porto Alegre-RS, 2ª ed., 446p.
25. Chaves MH, Barbosa AS, Moita Neto JM, Aued-Peimentel S, Lago JHG, 2004. Caracterização Química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* St Hill et Nauda. *Química Nova*, 27:3, 404-408.
26. Chrispeels MJ, Raikhhel NV, 1991. Lectins, lectin genes and their role in plant defence. *Plant Cell*, 3, 1-19.
27. Cruz GADR, Oliveira MGA, Pires CV, Pilon AM, Cruz RS, Brumano MHN, Moreira MA, 2004. Avaliação da Digestibilidade Protéica, Inibidor de Proteases e Fibras Alimentares de Cultivares de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Brazilian Journal of Food Technology*, 7:2, 103-109.
28. Dalmau E, 2006. Sapucaia ou cumbuca de macaco. Disponível em: http://www.terra brasil.org.br/ecosistema/ecosist_sapucaia.htm

29. De Angelis RC, 1991. Fome oculta: impacto para a população do Brasil. São Paulo:Atheneu, 236p.
30. De Angelis RC,1977. In Fisiologia da Nutrição: fundamentos para nutrição e desnutrição. Edart, Ed. Da Universidade de São Paulo, v1, 320p.
31. Department of Health, 1994. Report on health and social subjects nº 46. Nutritional Aspects of Cardiovascular Disease. HMSO, London, 178p.
32. Etzler ME, 1985. Palent lectins: molecular and biological aspects. Annual Review Plant Physiology, Palo Alto, 3, 209-234
33. FAO, 1970. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The Amino Acid Content of Foods and Biological Data on Proteins. Nutritional Study. Rome. Rome, Italy.
34. FAO, 1973. Energy and protein requirements: report of a joint FAO/WHO. FAO Nutrition Meetings Reports Series, n52; WHO Technical Report Series, n522.
35. FAO, 1980. State of Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.
36. FAO, 1985. Food and Agricultural Organization. Protein and energy requirements. Rome, Italy.
37. FAO/WHO, 1991. Protein quality evaluation: report of a joint FAO/WHO expert consultation held in Bethesda, MD, USA. Dec 1989. Rome, Italy.
38. FAO/WHO, 2001. Report of the FAO/WHO Working Group on Analytical Issues Related to Food Composition and Protein Quality, FAO, Rome, Italy.
39. Fenwick GR, Heaney RK, Mullin WJ, 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. Critical Review of Food Science and Nutrition, 18, 123-201.

40. Firestone D, 1998. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 5th ed. Champaign: AOCS, v2.
41. Food and Nutrition Board, 2002. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. The National Academies Press.
42. Fouqué A, 1972. Especies Fruiteras D'America Tropical. Fruits, 17:1, 62-72.
43. Franco G, 1992. Tabela de composição química dos alimentos, 9^a ed., Rio de Janeiro, São Paulo: Atheneu, 78-147.
44. Freire MGM, Gomes VM, Corsini RE, Machado OLT, De Simone SGS, Novello JC, Marangoni S, Macedo MLR, 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. Plant Physiology and Biochemistry, 40, 61-68.
45. Friedman M, Brandon DL, 2001. Nutritional and health benefits of soy proteins. Journal of Agricultural and Biological Chemistry, 49:3, 1069-1086.
46. Gallaher D, Schneeman BO, 1984. In Nutritional and toxicological aspects of food safety. Friedman, M ed., 299-316. New York:Plenum Press.
47. Garcia VA, Freire MGM, Novello JC, Marangoni S, Macedo MRL, 2004. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. Protein Journal, 23:5, 343-350.
48. Gatehouse AMR, Powell KS, Van Damme EJM, Peamans WJ, Gatehouse JA, 1995. Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant

- protection. In: Pustzai A, Bardocz S (Ed.), *Lectins: Biomedical perspective*, Taylor and Francis, London, pp.35-8, 1995.
49. Gilani GS, Cockell KA, Sepehr E, 2005. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. *Journal of AOAC International*, 88:3.
 50. Gomes, JC, Magalhães, ECS, Pereira, CAS, Soares, LF, Miranda, LCG, 2000. Avaliação do efeito de bupiridilios (paraquat) em culturas de soja quanto às características nutricionais da proteína do farelo desengordurado. *Ciência e Agrotecnologia*, 24:4, 961-967.
 51. Gotoh N, 1993. Inhibition of glutathione synthesis increases the toxicity of low density lipoprotein to human monocytes and macrophages. *Journal of Biochemistry*, 296, 151-154.
 52. Gumbman MR, Spangler WL, Dugan GM, Rackis JJ, 1986. In M. Friedman (Ed.), *Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in food* (pp33-79). New York: Plenum Press.
 53. Harper AE, 1981. McCollum and directions in the evaluation of protein quality. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry*, 29, 429.
 54. Harper AE, Yoshimura NN, 1993. Protein Quality, Amino Acid Balance, Utilization, and Evaluation of Diets Containing Amino Acids as Therapeutic Agents. *Nutrition*, 9:5.
 55. Harper SM, Crenshaw RW, Mullins MA, Privalle LS, 1995. Lectin binding to insect brush border membranes. *Journal of Economy and Ecology*, 88, 1197-202.
 56. Hartman B, Lago RCA, 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, 22:8, 475-476.
 57. Henley EC, Kuster JM, 1994. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. *Food Technology*, 4, 74-77.

58. Henrikson RL, Meredith SC, 1984. Amino acid analysis by reverse phase high performance liquid chromatography precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, 136, 65-71.
59. Hiane PA, Ramos Filho MM, Ramos MIL, Macedo MLR, 2005. Bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., pulp and kernel oils: characterization e fatty acid composition. *Brazilian Journal Food Technology*, 8:3, 256-259.
60. Hiane PA, Ramos MIL, Ramos Filho MM, Pereira JG, 1992. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos de alguns frutos nativos do Estado de Mato Grosso do Sul. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, 10:1, 35-42.
61. Higuchi M, Suga M, Iwai K, 1983. Participation of lectin in biological effects of raw winged bean seeds on rats. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 1879-1886.
62. Holland B, 1994. In: *The composition of foods*. McCance and Widdowson's, Cambridge, UK, p8-9.
63. Hopkins DT, 1981. Effects of variations in protein digestibility. In: Bodwell CE *et al.*, ed. *Protein quality in humans: assessment and in vitro estimation*. Westport Publishing Co., 178-181.
64. Horwitz W, 2000. *Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists*. 17th ed. Gathersburg, Maryland: AOAC, v2, cap. 41, p20.
65. Hsu, H.W., Vavak, D.L., Satterlee, L.D., Miller, G.A., 1977. A multi-enzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, 42, 1269–1271.
66. Instituto Adolfo Lutz, 1985. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3 ed. São Paulo, v.1. 533p.

67. Kreider R, 2005. How to eat for energy and health on a vegetarian diet. Disponível em: <http://www.muscleandfitnesshers.com/nutrition/>. Acesso 01.05.2006.
68. Kritchevsky D, 1988. Dietary Fiber. Annual Review of Nutrition, 8, 301-328.
69. Lajolo FM, Genovêse IM, 2002. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 22, 6582-6598.
70. Liener IE, 1981. Phytohemagglutinins (phytolectins). Annual Review of Plant Physiology , Palo Alto, 27, 291-319.
71. Liener IE, 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 34, 31-67.
72. Lis H, Sharon M, 1973. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). Annual Review of Biochemistry, Palo Alto, 42, 541-574.
73. Lorenzi H, 1992. Árvores do Brasil, Editora Plantarum Ltda, 1ª ed., v.1.
74. Macedo MLR, Coelho MB, Freire MGM, Machado OLT, Marangoni S, Novello JC, 2000. Effects of toxic protein isolated from *Zea mays* seeds on the development and survival of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. Protein and Peptides Letters, 7:4, 225-231.
75. Macedo MLR, Fernandes KVS, Sales MP, Xavier-Filho J, 1995. Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which are susceptible or resistant to be bruchid beetle. Brasiliam Journal of Medical and Biological Research, 28, 183-90.
76. Maga JA, Lorenz K, Onayemi O, 1973. Digestive acceptability of proteins as measured by the initial rate of *in vitro* proteolysis. Journal of Food Science, 38, 173-174.

77. Mahan LK, Escott-Stump S, 1998. Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia. 9ª ed., São Paulo: Roca, 1179p.
78. Martinez WH, Hopkins DT, 1975. In Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds, Part 2, M. Friedman (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp 335–374
79. Marx HS, Mason AC, 1993. Selenium bioavailability of soy-based diets in rats. *Journal Nutritional Biochemistry*, 4, 523-527.
80. Mello ML, Maia GA, Silva APV, Oliveira GSF, Figueiredo RW, 1998. Caracterização físico-química da amêndoa da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) crua e tostada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18:2, 184-187.
81. Misner B, 2000. The Great Animal Versus Vegetable Protein Debate What Is The Best Protein For Muscle Growth? Disponível em: <http://www.afpafitness.com/>. Acesso 04.04.2006
82. Mossé J, Pernollet JC, 1983. Storage proteins of legume seeds. In *Chemistry and Biochemistry of legumes*. Arora, S.K. Ed., Edward Arnold: London-UK, 15, 439-443.
83. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, 2002. Harper: Bioquímica. 9ª ed., Atheneu Editora São Paulo Ltda, São Paulo, Brasil.
84. National Academy Press. Food and Nutrition Board, 2002. Disponível em: <http://www.nap.edu/>. Acesso 20.04.2006
85. Niedzielska G, Caruk K, Pasterna K, 2000. Trace elements in neoplasm tissues of the larynx. *Otolaryngologist*, 54:31, 200-202.
86. Oka Y, Chet I, Spegel Y, 1997. Accumulation of lectin in cereal roots incaded by nematode *Heterodera avenae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51, 333-345.
87. Oliveira JED, 1998. Ciências Nutricionais. São Paulo: Sarvier.

88. Oliveira JTA, Silveira SB, Vasconcelos IM, 1999. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. Journal of the Science of Food Agriculture, 79, 815-820.
89. Oliveira JTA, Vasconcelos IM, Cavada BS, Moreira RA, Santos CF, Moreira LIM, 1994. *Canavalia brasiliensis* seeds. Protein quality and nutritional implications of dietary lectin. Journal of the Science of Food and Agriculture, 64, 417-24.
90. Osborne TB, Mendel LB, Ferry EL, 1919. A method of expressing numerically the growth promoting value of proteins. Journal of Biological Chemistry, 37, 223-229.
91. Oshodi AA, Ipinmoroti KO, Adeyeye EI, Hall GM, 1995. *In vitro* multienzyme digestibility of protein of six varieties of African yam bean flours. Journal of the Science of Food and Agriculture, 69, 373-377.
92. Paul AA, Southgate DAT., 1978. In Composition of foods. Ed. McCance and Widdowson's, 4^a ed., London, HMSO.
93. Pellet PL, Young VR, 1980. Nutritional evaluation of protein foods. Report of working group sponsored by the International Union of Nutritional Sciences and the United Nations University World Hunger Programme.
94. Peumans WJ, Van Damme JM, 1995. Lectins as plant defense proteins. Plant Physiology, 109, 347-52.
95. Pires CV, Oliveira MGA, Rosa JC, Costa NMB, 2006. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 26:1, 179-187.
96. Pratt CW, Corneley K, 2006. In Bioquímica Essencial (716pp.). Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

97. Pressman S, 1997. In The Owner's Manual For the Human Body. Plasmafire Intl, USA.
98. Rangel A, Saraiva K, Schwengber P, Marciso MS, Domont GB, Ferreira ST, Pedrosa C, 2004. Biological evaluation of a protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. Food Chemistry, 87, 491-499.
99. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC, 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on the reformulation of the AIN-76^a rodent diet. Journal of Nutrition, 123:2, 467-472.
100. Ribas DLB, Sganzerla A, Zorzatto JR, Philippi ST, 2001. Nutrição e saúde infantil em uma comunidade indígena Teréna, Mato Grosso do Sul, Brasil. Caderno de Saúde Pública, 17:2, 323-331.
101. Ripoll C, Favery B, Leconte P, Van Damme E, Peumants W, Abad P, Jouanin L, 2003. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. Plant Science, 164, 517-23.
102. Salinas YG, Garcia R, 1985. Métodos químicos para el analisis de suelos acidos y plantas forrajeras. Cali: Centro de Agricultura Tropical, 83p.
103. Sandberg AS, Svanberg U, 1991. Phytate hydrolysis in cereals: effects on *in vitro* estimation of iron availability. Journal of Food Science. 56, 1330-1333.
104. Sarwar G, 1997. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. Journal of Nutrition, 127, 758-764.
105. Schaafsma G, 2000. The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score. Journal of Nutrition, 130:7, 1865-1867.

106. Schneeman BO, 1986. Dietary fiber: physical and chemical properties, methods of analysis, and physiological effects. *Food Technology*, 104-110, February.
107. Sgarbieri VC, 1987. Alimentação e nutrição – fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: Almed, 387p.
108. Sgarbieri VC, 1996. In Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificações. São Paulo: Livraria Varela (pp.517).
109. Sgarbieri VC, Whitaker JR, 1982. Physical, chemical and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. *Advances in Food Research*, New York, 28, 93-166.
110. Shewry PR, 1995. Plant protein storage. *Biological Review*, 70, 375-426.
111. Silva Júnior SI, Demonte A, 1997. Avaliação da qualidade nutricional da proteína do “leite de soja” e do leite integral em pó. Ensaio experimental e discussão metodológica. *Alimentos e Nutrição*, 8, 105-120.
112. Silva MR, Silva MAAP, 2000. Fatores Antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. *Revista de Nutrição*, 13:1, 3-9.
113. Silva S, 1991. Frutas do Brasil. Editora: Empresa das Artes Projetos & Edições Artísticas Ltda. Rio de Janeiro.
114. Smyth DG, Elliott DF, 1964. Some analytical problems involved in determining the structure of proteins and peptides - A Review. *The Analyst*, 89, 81.
115. Stahlhult RW, Hymowitz T, 1983. Variation in the low molecular weight proteinase inhibitors of soya beans. *Crop Science*, Madison, 23, 766-769.
116. Stillmark H, 1988. Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. *Arb. Pharmak. Institute Dorpat*, 3, 59-151.
117. Tagle MA, 1981. Nutrição. São Paulo: Artes Médicas, 234p.

118. Tassara H, 1996. Frutas do Brasil. São Paulo: Empresa das Artes.
119. Teixeira E, 2006. Frutas do Brasil. Disponível em: <http://www.bibvirt.futuro.usp.br/especiais/frutasnobrasil/sapucaia.html>. Acesso em 21.04.2006
120. Thompson LU, Tenebaum AV, Hui H, 1986. Effect of lectins and the mixing of proteins on rate of proteins digestibility. *Journal of Food Science*, 51, 150-152.
121. Togashi M, Sgarbieri VC, 1995. Avaliação nutricional da proteína e do óleo de sementes de baru (*Dypterix alata* Vog). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 15:1, 66-69.
122. Vadivel V, Janardhanan K, 2005. Nutritional e antinutritional characteristics of seven south Indian wild legumes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60, 69–75.
123. Vallilo, M.I., Tavares, M., Aueda-Pimentel, S., Badolato, E.S.G., Inomata, E.I., 1998. Caracterização química parcial de *Lecythis pisonis* Camb. (sapucaia). *Acta Amazônica*, 28:2, 131-140.
124. Vallilo MI, Tavares M, Aueda-Pimentel S, Campos NC, Moita Neto JM, 1999. *Lecythis pisonis* Camb. Nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. *Food Chemistry*, 66:2, 197-200.
125. Van der Poel AFB, Verstegen MWA, Tamminga S, 1995. Chemical physical and nutritional effects and food processing technology. In: *Western Nutritional Conference*, 16, Saskatoon. *Proceedings*. Saskatoon: Edmonton, 70-86.
126. Vasconcelos IM, Maia AAB, Siebra EA, 2001. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 12, 55-62.

127. Vasconcelos IM, Oliveira JTA, 2004. Antinutritional properties of plants lectins. *Toxicon*, 44:4, 385-403.
128. Villachica H, Carvalho JEU, Müller CH, Diaz SC, Almanza M, 1996. *Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia. Tratado de Cooperación Amazonica*, Lima.
129. Volatier JL, 2000. INCA national survey of individual dietary intakes. Paris: Editions Tec et Doc.
130. Waitzberg DL, 2000. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3ª ed., São Paulo: Atheneu, v1.
131. Xavier-Filho J, Campos FAP, 1989. Proteinase inhibitors. In: Cheek, PR. *Toxicans of plant origin*. Boca Ranton: CRC Press, 3, 1-27.
132. Young VR, 1991. Soy Protein in relation to human protein and amino acid nutrition. *Journal American Diet Association*, 91, 828-835.

ANEXO I

Texto Submetido para Publicação em Periódico Internacional Indexado -

Qualis A

***In vitro* digestibility of globulins from sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.)
nuts by mammalian digestive proteinases**

Sandra Maria Silveira Denadai¹, Priscila Aiko Hiane², Sergio Marangoni³, Paulo
Aparecido Baldasso³, Ana Maria Rauen de Oliveira Miguel⁴, Maria Lígia R.
Macedo^{5*}

¹Departamento de Morfofisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande,
MS, Brazil

²Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Biológicas e
da Saúde, UFMS, Campo Grande, MS, Brazil

³Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas
(Unicamp), Campinas, SP, Brazil

⁴Centro de Química de Alimentos & Nutrição Aplicada, Instituto de Tecnologia
de Alimentos, Campinas, SP, Brazil

⁵Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas,
Departamento de Ciências Naturais, UFMS, Três Lagoas, MS, Brazil

Short title: *In vitro* digestibility of globulins from sapucaia

Author for correspondence:

Maria Lígia Rodrigues Macedo

Departamento de Ciências Naturais, CPTL; Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul; C.P. 210; Três Lagoas, MS 79603-011; Brazil.

E-mail address: bioplant@terra.com.br

Tel. +55-67-3509-3708

Fax +55-67-3509-3760

Abstract

Sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.) nuts collected from Brazil were analyzed to determine proximate composition, amino acid profile of proteins fractions, *in vitro* protein digestibility, and antinutritional factors, in order to evaluate their potential as an alternative source of proteins. The nuts contained adequate amounts of essential amino acids, fatty acids, but low concentration of the minerals and fibers were observed. In the present study, lectins or proteinases inhibitors, when detectable, showed low levels. *In vitro* digestibility of native and heated globulins by mammalian digestive proteinases was carried out utilizing trypsin, chymotrypsin, and peptidase, with resulting mean values of approximately 71.5% and 73.5%, respectively. Taken together, the results suggest that sapucaia nuts may provide a new source of protein for use as a potential nutritional agent.

Keywords: *in vitro* protein digestibility, antinutritional factors, globulins, proteinases, sapucaia nuts, *Lecithys pisonis*.

1. Introduction

Plants offer an enormous variety of macro and micronutrients for human consumption. The value of plant proteins in supplying the protein needs in developing countries has been recognized in recent years. Furthermore, fruits, seeds, nuts, and almonds from regional native plants are utilized to complement the diet of indigenous populations and animal feeding as well (Ribas *et al.*, 2001, Araújo *et al.*, 2002), as they are as rich in proteins, carbohydrates, lipids, vitamins, and minerals as legume grains (Vadivel and Janardhanan, 2005).

The Brazilian flora has many native fruit-bearing forest species whose nuts and seeds are good sources of nutrients. Despite this diversity, nutrient intake in the diet of the Brazilian population can be poor, lower than the amounts required for health maintenance. The search for alternative, nutritionally suitable, and affordable food sources is thus highly desirable. Chemical composition and nutritional value are yet to be studied in many of the native species of Brazilian regions, although regional fruits recently investigated have been shown to be good sources of nutrients such as amino acids, sugars, fats, vitamins, and fibers (Hiane *et al.*, 1992; Hiane *et al.*, 2005). Among the edible species consumed in some regions of Brazil is the sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.), locally known as 'cumbuca-de-macaco', among other names. Native to Brazilian rainforests, the sapucaia is found in the Atlantic forest and in the Amazon region (Teixeira, 2005). Its aromatic, sweet-tasting, oleaginous nuts can be consumed raw, boiled, or roasted.

Before products of plant origin can be indicated for use as food complements, mainly as proteins sources, investigations should be conducted to determine the amino acid composition of their proteins and protein digestibility, as well as the presence of antinutritional factors. While the amino acid proportionality

pattern of a protein is probably the most important determinant of protein quality, digestibility of protein and bioavailability of its constituent amino acids are the next most important factors (FAO/WHO, 1991). Differences in protein digestibility may arise from inherent differences in the nature of food protein, from the presence of non-protein constituents, which may modify digestion, from the presence of antiphysiological factors, or from processing conditions that alter the release of amino acids from proteins by enzymatic processes. However, digestibility still provides a satisfactory index of protein utilization (FAO/WHO, 1991).

In addition, high levels of insoluble fiber and high concentrations of antinutritional factors in the diets are also responsible for poor digestibility of proteins (Gilani, Cockell and Sepehr, 2005). Food and feed products may contain a number of antinutritional factors that may adversely affect protein digestibility and amino acid availability (Lajolo and Genovêse, 2002). Inhibitory proteinases, abundant in the plant kingdom, are proteins that can inhibit trypsin, chymotrypsin, amylase, and carboxypeptidase activities (Macedo *et al.*, 2000; Freire *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2004). Chronic ingestion of residual levels of antinutritional factors is unlikely to pose risks to human health.

Most animal proteins are well digested, resulting in efficient absorption of amino acids. In contrast, plant proteins are not usually well digested, and are thus nutritionally inferior. The value of plant proteins in supplying the protein needs in developing countries is well acknowledged. If some of the peptidic bonds fail to be hydrolyzed in the digestive process, part of the protein content is excreted in the feces or altered into metabolic products by intestinal microorganisms in the large intestine (Sgarbieri, 1996). Good plant protein sources are essentially plant foodstuffs whose proteins are well digested.

Most studies designed to provide answers to questions related to nutritional quality of plant proteins have focused on proteins in the globulin fraction. Globulins are globular proteins that are widely distributed throughout the plant and animal kingdoms. They are soluble in water or in dilute salt solutions. Globulins are involved in the transport of a variety of substances, including lipids, hormones, and inorganic ions, in addition to playing a role in the immune system. They are present in seeds in high amounts as storage proteins, and are also found in fractions of antinutritional factors (Araújo *et al.*, 2002). They have structural and enzymatic functions and are important in the germination process (Sgarbieri, 1996).

Because the proteins of sapucaia nuts had not been previously characterized, the objective of this work was to study *in vitro* the action of mammalian proteinases—trypsin, chymotrypsin, and pepsin—on globulins and to determine the nutritional value of dry mature sapucaia nuts. The results will later be compared with those currently being obtained *in vivo*, to evaluate protein digestibility and the potential use of the seeds as an alternative food source.

2. Materials and methods

2.1 - Nuts

Nuts were obtained from dry mature sapucaia fruits collected from native trees at Estação Experimental de Santa Rita do Passa Quatro, SP, of Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais do Estado de São Paulo, Brazil.

2.2 - Preparation of defatted meal

The nuts were ground in a Delta Ultrassônico grinder (Delta, São Paulo, SP, Brazil) and pulverized to a homogenous powder, which was named whole meal.

The whole meal was defatted with petroleum ether PA (40-60 °C) in a Soxhlet extractor (Sebelin TE-188, TECNAL, São Paulo, SP. Brazil) for 24 h. After extraction, the ether was evaporated at 105 °C for 4 h. The meal was again triturated and pulverized, resulting in a very fine powder that was named defatted meal, which was used as the source of proteins in all the experiments.

2.3 - Fatty acid composition

Fatty acid composition of the lipid fraction was obtained after methyl etherification by the procedure described by Hartman and Lago (1973). Identification and quantification were carried out using gas-liquid chromatography and flame ionization detection, according to the procedure outlined by Firestone (1998) and Horwitz (2000).

2.4 - Mineral content

Micro- and macromineral contents were determined in the Animal Nutrition Laboratory of EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brazil, after acid digestion of the defatted meal. Manganese, zinc, copper, magnesium, and iron contents were determined using an atomic absorption spectrophotometer. Sodium and potassium were determined by flame photometry, and phosphorus and calcium by visible-light spectrophotometry (Salinas and Garcia, 1985).

2.5 - Proximate composition

2.5.1 - Moisture

The moisture content of the whole meal was determined by stove drying at 105 °C for approximately 4 h, according to methods described in the analytical norms of Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.5.2 - Total sugar

Total sugar was determined with the reduction method using Fehling's reagent, according to the procedure described in the norms of Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.5.3 - Ash

Ash (fixed mineral residue) was determined according to AOAC (1990). Total fiber was estimated by difference.

2.5.4 - Protein

The protein content was measured with the procedure developed by Bradford (1976) with bovine serum albumin (BSA) as the protein standard and by total nitrogen content (%) according to the Kjeldahl method described in AOAC (1990) and multiplied by a factor of 6.25.

2.6 - Fractionation of meal proteins

The seed protein fractions used in the present study—namely, albumins, globulins, prolamins, glutelins, and residue—were prepared according to an extraction procedure with NaCl, ethanol, and NaOH (Macedo *et al.*, 1995). Fifteen-gram portions of nut flour were extracted with 150 ml of 4% NaCl for 1 h. The slurry was centrifuged at 17 000 x *g* for 30 min at 4 °C and the supernatant was then dialyzed against distilled water for albumin and globulin separation. The residue of the salt extraction was suspended in 70% ethanol for 1 h and again centrifuged as described above to obtain prolamins. The alcohol-insoluble pellet was suspended in 0.1-M NaOH and extracted for 1 h. Glutelins were then

obtained by centrifugation as described above. All the fractions plus the final insoluble residue were recovered by dialysis and freeze-drying.

2.7 - SDS-PAGE-polyacrylamide gel electrophoresis

This method was carried out using a Laemmli (1970) system. The proteins used as molecular mass standards were: fosforilase BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbanic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20 kDa), and α -lactoglobulin (14.2 kDa).

2.8 - Hemagglutination assay

Hemagglutination assays were done in microtiter U-plates using serial dilutions with 50- μ L volumes of 0.15-M NaCl. A 50- μ l volume of a 2% suspension of type A human erythrocytes was added and, after 1 h at room temperature, the results were read. The hemagglutination titer corresponding to the reciprocal of the highest dilution showing hemagglutination was defined as one hemagglutination unit (Freire et al., 2002).

2.9 - Inhibitory activity assay

Bovine pancreatic trypsin and bovine pancreatic chymotrypsin were used for the enzymatic assays. Trypsin-like activities were assayed using N- α -benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide (BA*p*NA) as substrate. Chymotrypsin-like activities were assayed using N-benzoyl-L-tyrosine *p*-nitroanilide (BT*p*NA) as substrate (Macedo *et al.*, 1995). In a standard assay, a reaction mixture contained 50 μ l of each enzyme extract, reaction buffer (0.1-M Tris-HCl buffer, pH 8.0), and 50 μ l of 1-mM substrate to a final volume of 500 μ l. The reaction was stopped by adding 200 μ l of 30% acetic acid. The release of *p*-nitroaniline groups was measured spectrophotometrically at 410 nm. The proteinase inhibitor was

assayed by preincubating 50 µl of each fraction at concentrations ranging from 25 to 200 µg with 50 µl of proteinase and 350 µl of reaction buffer at 37 °C for 15 min. The reaction was started by addition of the substrate and was performed as described above. The remaining activity was expressed as the percentage of enzymatic activity in the absence of inhibitor.

2.10 - Amino acid composition

Amino acid analysis was performed on a PicoTag amino acid analyzer (Waters) as described by Henrikson and Meredith (1984). One nanomole of protein fraction was hydrolyzed in 6-M HCl/1% phenol at 106 °C for 24 h. The hydrolyzed was reacted with 20 µl of fresh derivatization solution (methanol : triethylamine : water : phenylisothiocyanate, 7:1:1:1, v/v) for 1 h at room temperature. After pre-column derivatization, phenylisothiocyanate (PTC) amino acids were identified on a reverse-phase HPLC column by comparing their retention times to those of standard PTC amino acids (Pierce). Cysteine residues were quantified as cysteic acid.

2.11 - Purification of globulins

Globulins were prepared from sapucaia nuts by the procedure described by Macedo *et al.* (1995). Ground meals, extracted with 50-mM borate buffer at pH 8.0 for 30 min at room temperature, were centrifuged (30 min at 8000 x g, 5 °C) and the supernatant proteins were fractionated by ammonium sulfate precipitation. The 70-90% saturation fraction was dialyzed against water, freeze-dried, and applied to a Sephacryl S-200 column (3 cm x 50 cm) equilibrated and eluted with the same buffer used for extraction. The globulin-rich fractions were recovered after an ion-exchange chromatography on a DEAE-Sepharose column (2 cm x 20 cm), equilibrated with 50-mM Tris-HCl at

pH 8.0 and eluted with a NaCl gradient (0.1 M) in the same buffer. Globulins were dialyzed against water and freeze-dried.

2.12 - *In vitro* digestibility of globulins

Globulins were dissolved in 0.01-M phosphate buffer at pH 6.0 at a 0.5-mg/ml concentration. Globulins (250-ml aliquots) were separately assayed for digestion by 10 ml of pepsin (25 mg/ml in 50-mM HCl), trypsin (25 mg/ml in 0.01-M phosphate buffer, pH 7.0), or chymotrypsin (25 mg/ml in 0.01-M phosphate buffer, pH 7.0), at 37 °C for periods of 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, and 4 h. The substrate-to-proteinase ratio was 20:1. Adding a 10% SDS solution stopped the digestion (Araújo *et al.*, 2002). The enzymes used for the globulin digestibility assay were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.13 - *Multienzymatic assays*

Globulin digestibility was assayed by the *in vitro* method described by Oshodi *et al.*, (1995). Calculated control (casein) and samples were weighed, dissolved in 10 ml of distilled water, and refrigerated at 5 °C for 1 h. The globulin-containing samples and enzymes were all adjusted to pH 8.0 at 37 °C. Globulin digestibility was determined by the digestion of the protein-containing sample with a multienzyme mixture—trypsin (porcine pancreatic trypsin—Type IX) with 14 190 BAEE units/mg protein; α -chymotrypsin (bovine pancreatic chymotrypsin—Type II), 60 units/mg powder; and peptidase (porcine intestinal peptidase—Grade III), 40 units/g powder—at 37 °C. A pH drop from 8.0 in the samples was recorded after 20 min of incubation. Globulin digestibility was calculated according to the regression equation ($Y = 234.84 - 22.56X$, where $Y = \%$ digestibility, $X = \text{pH}$

drop) described by Hsu *et al.* (1977). The assays were performed using native and heated globulins.

2.14 - Statistical tests

The results were expressed as mean \pm S.D., the level of significance was 5% ($p < 0.05$), where appropriate. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) (general linear models or GLM procedure).

3 – Results and discussion

Proximate composition

Table 1 shows the proximate composition and total calorie content (kcal/100g) of the whole meal. The lipid and protein contents are in accordance with values found in the literature (60.61% and 20.47%, respectively), revealing high energy content (645.05 kcal/100g).

Fatty acid determination

The fatty acid profile of the oils analyzed (**Table 2**) indicates high content of unsaturated acids (monounsaturated, 34.22%; polyunsaturated, 42.73%; omega 3, 0.19%), and a predominance of linoleic (42.54%) and oleic acids (33.94%). The concentration of linoleic acid is in accordance with the levels recommended in Brazil (Brasil, 1999) and by the American Oil Chemistry's Society (AOCS, 1996) for peanut oil (Brazil, 13.0-45.0%; AOCS, 14.0-43.0%). Sapucaia nuts were found to be an excellent source of linoleic acid, an essential fatty acid. Also, their high lipid content and high level of oil unsaturation indicate their potential use for human consumption, in addition to being a good source of calories in nutritional diets—the data obtained are similar to the values found in the literature (Vallilo *et al.*, 1998; Vallilo *et al.*, 1999). Regarding the quality of

oils, the acid contents were within the international standards for the processing of crude vegetable oils for human consumption (Vallilo et al., 1999).

Mineral composition

The mineral composition (macro and microminerals) of the nuts is shown in **Table 3**. Compared with the recommended dietary allowances for children and adults (The National Academy Press, 2000), sapucaia nuts are not a rich source of nutritionally important minerals required in the human diet.

Protein fractionation

As shown in **Figure 1**, albumins are composed of many different polypeptides covering a wide range of molecular masses (18-94 kDa), whereas globulins (major fraction) are essentially represented by four major polypeptides (18, 34, 40, and 50 kDa). Prolamins exhibit fractions ranging from 38 to 50 kDa and the polypeptide composition of glutelins has fractions from 18 to 50 kDa. Several other protein bands were found in each of these fractions.

The protein content of sapucaia defatted nut meal determined by Bradford (1976) was 66%. In the present investigation, globulins made up the major protein fraction component of sapucaia nuts (58.7%), whereas glutelins, albumins, and prolamins accounted for 20.2%, 20.1%, and 1.0%, respectively (**Table 4**). The globulin fraction exhibited a notably high protein concentration (84%) when compared with the other fractions (data not shown), and was thus chosen for the purification and assays conducted in the present work.

Amino acid analysis

The quality of seed proteins as sources of amino acids can usually be evaluated by comparison with the FAO/WHO recommended standards for essential amino

acids (FAO/WHO, 1991). As shown in **Table 5**, the proteins from sapucaia nuts contained adequate levels of phenylalanine, lysine, leucine, methionine, valine, and arginine, and the other amino acids were found in high or moderate amounts, based on the FAO/WHO (1991) standards for children. The proteins also contained adequate amounts of essential amino acids for pre-school children and all the essential amino acids for adults. The concentration of tryptophan was not determined. When the amino acid content of sapucaia nuts is compared with that of animal proteins from eggs, cow's milk, or beef, sapucaia nuts are found to be an excellent amino acids source.

Antinutritional factors

Protein quality is affected by antinutritional factors that interact with cells of the intestinal tract, such as proteinase inhibitors, lectins, and tannins, which reduce protein digestibility and amino acid absorption. Unless destroyed or inactivated by heat or by some other suitable treatment, these substances can exert adverse physiological effects when ingested by man and animals (Rangel et al., 2004). In the present study, lectins or proteinases inhibitors, when detectable, showed low levels (data not shown).

This is a relevant finding, because feeding raw soybean and many other legume products, which contain high levels of proteinase inhibitors, to experimental animals such as rats, mice, and chickens leads to growth depression, pancreatic hypertrophy, and/or hyperplasia (Gallaher and Schneeman, 1984) and a potentiation of pancreatic carcinogenesis (Gumbman *et al.*, 1986). Most of those compounds inhibit the digestive enzymes or react with essential amino acids, limiting the use of whole seeds in food products. Lectins bind to the intestinal mucosa, impairing digestion and absorption of nutrients (Higuchi,

Suga and Iwai, 1983) and reducing protein digestibility by inhibiting digestive enzymes (Thompson, Tenebaum and Hui, 1986).

In vitro digestibility of globulins

The *in vitro* digestibility of sapucaia nut globulins by mammalian digestive proteinases was carried out utilizing trypsin, chymotrypsin, and pepsin, separately. Incubation of purified globulins (**Figures 2.1, 2.2, and 2.3**) showed that trypsin digested the 18- and 66-kDa fractions, but the globulins were resistant to hydrolysis by chymotrypsin or pepsin. After heat treatment, however, the 50- and 66-kDa fractions were digested by chymotrypsin and the 18-, 50-, and 66-kDa fractions were hydrolyzed by trypsin, though no hydrolysis by pepsin was observed on SDS-PAGE (**Figure 3.1, 3.2, and 3.3**). Trypsin exhibited hydrolytic activity on both native and heated globulins. These results were in agreement with previous findings that globulins are resistant to hydrolysis by pepsin (Araújo *et al.*, 2002).

In vitro digestibility by multienzymatic assays

Figure 4 shows the SDS-PAGE patterns of native and heated globulins digested by multienzymes. The electrophoretic pattern of their *in vitro* digestibility is shown in **Figure 5**. **Figures 4** and **5** reveal that the multienzymatic complex was efficient in digesting globulins. Digestibility was as high as 71.5% (**Figure 4**). Heating of globulins for 10 min led to an insignificant increase in digestibility, to 73.5%. The increased digestibility of sapucaia globulins by multienzymes suggests that digestive enzymes may have a joint action, making all the bonds more accessible to proteases. The low increase in digestibility after heating suggests that sapucaia globulins can be ingested as

fresh protein, as the nuts do not contain antinutritional factors such as lectins and protease inhibitors.

Conclusion

This study revealed that sapucaia nuts are a valuable source of proteins, with higher levels of essential amino acids, fatty acids, and minerals than the recommended ones. Lectins or proteinases inhibitors, when detectable, showed low levels. In addition, the *in vitro* digestibility of globulins by a multienzymatic complex was pronounced. These observations suggest that sapucaia nuts may be a new source of proteins, a potential functional and nutritional agent, and an economically important oil source.

Acknowledgments

The authors wish to thank FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia), of the Brazilian state of Mato Grosso do Sul; CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); PROPP-UFMS (Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul), and FINEP-MCT (Financiamento de Estudos e Projetos, Ministério da Ciência e Tecnologia) for providing financial support for this investigation. The authors are grateful also to Darli Castro Costa and Osmar Ferreira de Andrade, for their technical assistance.

4 – References

1. American Oil Chemist's Society, 1996. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society. 4th ed. Champaign, A.O.C.S., (sections C, p1-5; I, p37).

2. Araújo, A.H., Cardoso, C.B., Pereira, E.A. Lima, L.M., Oliveira, A.S., Miranda, M.R.A., Xavier-Filho, J., Sales, M.P., 2002. *In vitro* digestibility of globulins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and xerophitic algaroba (*Prosopis juliflora*) seeds by mammalian digestive proteinases: a comparative study. *Food Chemistry*, 78, 143-147.
3. Association of Official Analytical Chemists, A.O.A.C., 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Washington, v1-2.
4. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-54.
5. Brasil, Leis, Decretos, etc. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Diário Oficial, Brasília, 13 out. 1999, Seção I, p82-87 (Anexo 3 – Óleo de Amendoim).
6. FAO/WHO, 1991. Protein quality evaluation (Report of a joint FAO/WHO expert consultation held in Bethesda, MD, USA. Dec 1989). FAO/Rome/Italy.
7. Firestone, D., 1998. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 5th ed. Champaign: AOCS, v2.
8. Freire, M.G.M., Gomes V.M., Corsini, R.E., Machado, O.L.T., De Simone, S.G.S., Novello, J.C., Marangoni, S., Macedo, M.L.R., 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 61-68.
9. Gallaher, D., Schneeman, B.O., 1984. In M. Friedman (Ed.), Nutritional and toxicological aspects of food safety (pp299–316). New York: Plenum Press.
10. Garcia, V.A., Freire, M.G.M., Novello, J.C., Marangoni, S., Macedo, M.R.L., 2004. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification,

- characterization, and activity against pest proteases. *Protein J.*, 23:5, 343-350.
11. Gilani, G.S., Cockell, K.A., Sepehr, E., 2005. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. *Journal of AOAC International*, 88:3, 2005.
 12. Gumbman, M.R., Spangler, W.L., Dugan, G.M., Rackis, J.J., 1986. In M. Friedman (Ed.), *Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in foods* (p33–79). New York: Plenum Press.
 13. Hartman, B., Lago, R.C.A., 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Practice*, 22:8, 475-476.
 14. Henrikson, R.L., Meredith, S.C., 1984. Amino acid analysis by reverse phase high performance liquid chromatography precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochemistry*, 136, 65-71.
 15. Hiane, P.A., Ramos, M.I.L., Ramos Filho, M.M., Pereira, J.G., 1992. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos de alguns frutos nativos do Estado de Mato Grosso do Sul. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, 10:1, 35-42.
 16. Hiane, P.A., Ramos Filho, M.M., Ramos, M.I.L., Macedo, M.L.R., 2005. Bocaiúva, *Acrocomia Aculeata* (Jacq.) Lodd., Pulp and Kernel Oils: Characterization and Fatty Acid Composition. *Braz. J. Food Technol.*, 8:3, 256-259.
 17. Higuchi, M., Suga, M., Iwai, K., 1983. Participation of lectin in biological effects of raw winged bean seeds on rats. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 1879-1886.
 18. Holland, B., 1994. In: *The composition of foods*. McCance and Widdowson's, Cambridge, UK, p8-9.

19. Horwitz, W., 2000. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 17th ed. Gathersburg, Maryland: AOAC, v2, cap. 41, p20.
20. Hsu, H.W., Vavak, D.L., Satterlee, L.D., Miller, G.A., 1977. A multi-enzyme technique for estimating protein digestibility. J. Food Sci., 42, 1269–1271.
21. Instituto Adolfo Lutz, 1985. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3th ed. São Paulo, v1. 533p.
22. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-684.
23. Lajolo, F.M., Genovêse, I.M., 2002. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 22, 6582-6598.
24. Macedo, M.L.R., Fernandes, K.V.S., Sales, M.P., Xavier-Filho, J., 1995. Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which are susceptible or resistant to be bruchid beetle. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 28, 183-190.
25. Macedo, M.L.R., Matos, D.G.G., Machado, O.L.T., Marangoni, S., Novello, J.C., 2000. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. Phytochemistry, 54, 553-558.
26. Rangel, A., Saraiva, K., Schwengber, P., Narciso, M.S., Domont, G.B., Ferreira, S.T., Pedrosa, C., 2004. Biological evaluation of a protein isolated from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. Food Chemistry, 87, 491–499.
27. Ribas, D. L. B., Sganzerla, A., Zorzatto, J. R.; Philippi, S. T., 2001. Nutrição e saúde infantil em uma comunidade indígena Teréna, Mato Grosso do Sul, Brasil. Cad. Saúde Pública, 17;2, 323-331.
28. Salinas, Y.G., Garcia, R., 1985. Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras. Cali: Centro de Agricultura Tropical, 83p.

29. Sgarbieri, V.C., 1996. Proteínas em Alimentos protéicos – Propriedades – Degradação – Modificações, (pp200-202). Livraria Varela, São Paulo/Brasil.
30. Teixeira, E. Frutas do Brasil. 2004.
<http://www.alicesoftware.com/webs/treesnew/aweb/td001/td00035.htm>.
Retrieved February 20, 2006.
31. The National Academy Press. Food and Nutrition Board, 2000.
<http://www.nap.edu/books/0309072794/html/R1.html>. Retrieved February 20, 2006.
32. Thompson, L.U., Tenebaum, A.V., Hui, H., 1986. Effect of lectins and the mixing of proteins on rate of proteins digestibility. J. Food Sci., 51, 150-152.
33. Vadivel, V., Janardhanan, K., 2005. Nutritional and antinutritional characteristics of seven south Indian wild legumes. Plant Foods for Human Nutrition, 60, 69–75.
34. Vallilo, M.I., Tavares, M., Aueda-Pimentel, S., Badolato, E.S.G., Inomata, E.I., 1998. Caracterização química parcial de *Lecythis pisonis* Camb. (sapucaia). Acta Amazônica, 28:2, 131-140.
35. Vallilo, M.I., Tavares, M., Aueda-Pimentel, S., Campos, N.C., Moita Neto, J.M., 1999. *Lecythis pisonis* Camb. Nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. Food Chemistry, 66:2, 197-200.

Table 1 – Proximate composition of sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.) nuts, expressed as g/100 g of whole matter

Component	Results*
Moisture	5.04±0.03
Ash	3.80±0.01
Crude lipid (ether extract)	60.61±0.33
Total sugars	4.42±0.23
Protein (Kjeldahl-N** x 6.25)	20.47±0.38
Total dietary fiber (by difference)	5.67
Total calorie content (kcal/100 g)***	645.05±2.07

*Mean values ± standard deviation of triplicate determinations. **Nitrogen by the Kjeldahl method. ***Total calorie content was calculated with these factors: 4 for protein and sugars and 9 for lipids (FAO/WHO, 1991).

Table 2 – Lipid contents and main fatty acid composition of sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.) nuts, expressed as g/100 g*

Fatty acid	Contents
Lauric (C12:0)	0.10
Miristic (C14:0)	0.10
Palmitic (C16:0)	12.14
Palmitoleic (C16:1 ω 7)	0.19
Stearic (C18:0)	6.31
Oleic (C18:1 ω 9)	33.94
Linoleic (C18:2 ω 6)	42.54
Cis-11-eicosanoic (C20:1 ω 11)	0.10
Alpha linolenic (C18:3 ω 3 α)	0.19
Saturated	18.64
Monounsaturated	34.22
Polyunsaturated	42.73
Omega 3	0.19
Total trans-isomers	ND**

*Area X conversion factor F (F = 0.956, according to Holland, 1994). **ND: not detected (detection limit = 0.01/100 g).

Table 3 – Macro and micromineral contents of sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.) nuts

Elements	Contents*
$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	
Na	5.28±0,00
Fe	32.65±1.36
Mn	80.69±2.20
Zn	40.37±0.38
Cu	32.76±1.14
$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	
Ca	1.72±0.02
Mg	2.79±0.10
P	8.75±0.51
K	8.90±0.04

*Mean values ± standard deviation of triplicate determinations.

Table 4 – Protein fractions of sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.) nuts, by solubility

Protein fractions	%
Globulins	58.7
Glutelins	20.2
Albumins	20.1
Prolamins	1.0

*Protein content of the press and solvent-defatted meals was 66% (Bradford). Protein fraction recovery was 50.1%.

Table 5 – Amino acid composition of proteins from sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.) nuts (mg/g protein).

	Albumins	Glutelins	Globulins	Prolamins	Total proteins	FAO/WHO (1991) Requirement standard
Alanine	10.0	32.2	44.2	1.4	87.8	
Arginine	2.4	57.6	108.6	0.5	169.1	
Aspartate	11.7	38.7	58.1	1.5	110.0	
Cystine	-	3.7	11.7	-	15.4	25*
Glutamate	36.4	83.8	153.3	1.8	275.3	
Glycine	39.0	43.2	73.2	1.7	157.1	
Histidine	-	7.4	11.8	0.1	19.3	19
Isoleucine	2.7	10.6	15.8	0.4	29.5	28
Leucine	1.0	42.8	69.0	1.0	113.8	66
Lysine	28.4	20.7	31.9	1.1	82.1	58
Methionine	-	30.1	59.2	0.3	89.6	
Phenylalanine	77.2	12.5	16.6	0.3	106.6	63**
Proline	117.5	39.3	70.0	2.2	229.0	
Seryne	7.2	31.5	46.9	0.9	86.5	
Threonine	3.2	13.2	17.3	0.7	34.4	34
Tryptophan	ND	ND	ND	ND	ND	11
Tyrosine	1.7	12.0	18.3	0.5	32.5	
Valine	4.7	22.4	34.1	0.8	62.0	35

*Cystine + methionine. **Phenylalanine + tyrosine. Tryptofan was not determined – ND. Essential amino acids are in bold letters.

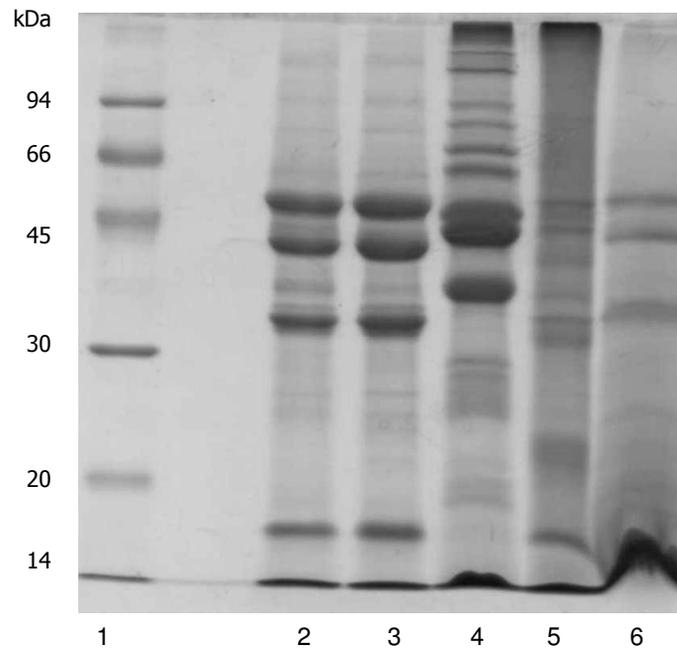


Figure 1 – Polypeptide patterns of molecular mass marker (lane 1), crude extract (lane 2), globulins (lane 3), albumins (lane 4), glutelins (lane 5), and prolamins (lane 6) of sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.) nuts.

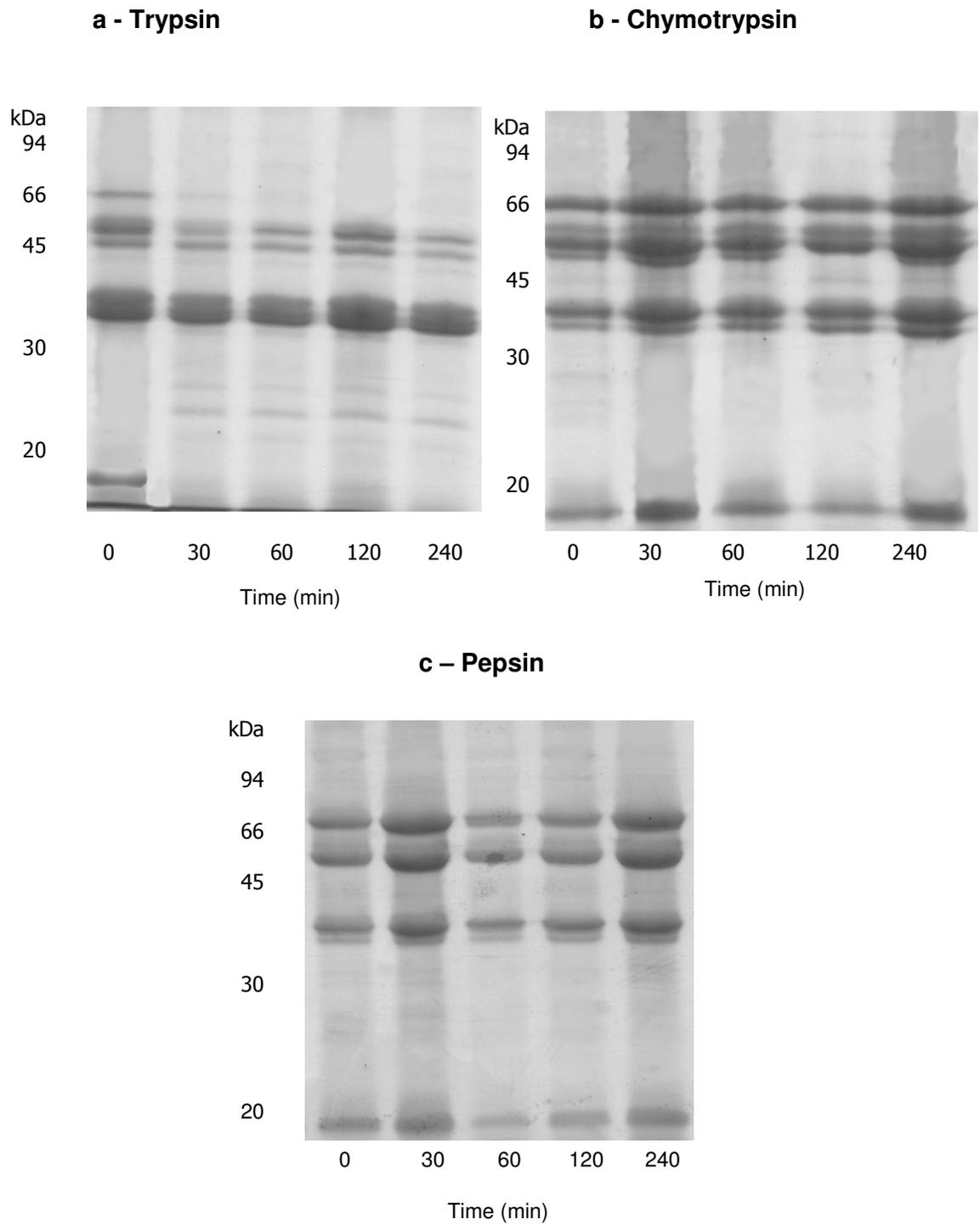


Figure 2 – SDS-PAGE patterns of digestion of native globulins of sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.) nuts by trypsin, chymotrypsin, and pepsin, separately. (a) Digestion by trypsin. (b) Digestion by chymotrypsin. (c) Digestion by pepsin. Vertical numbers indicate molecular weight marker, in kDa. Horizontal numbers refer to times of digestion.

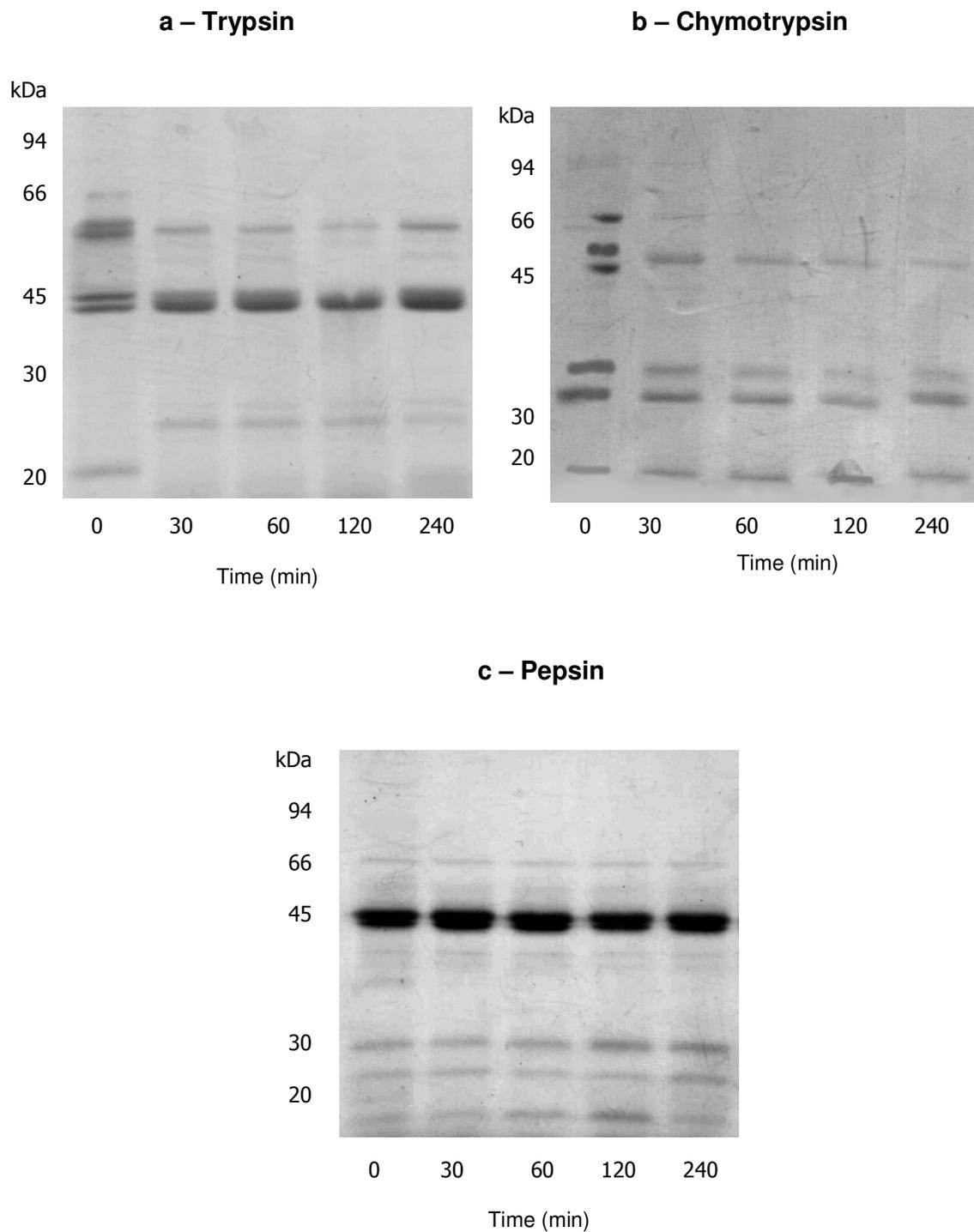


Figure 3 – SDS-PAGE patterns digestion of heated globulins of sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.) nuts by trypsin, chymotrypsin, and pepsin, separately. (a) Digestion by trypsin. (b) Digestion by chymotrypsin. (c) Digestion by pepsin. Vertical numbers indicate molecular weight marker, in kDa. Horizontal numbers refer to times of digestion.

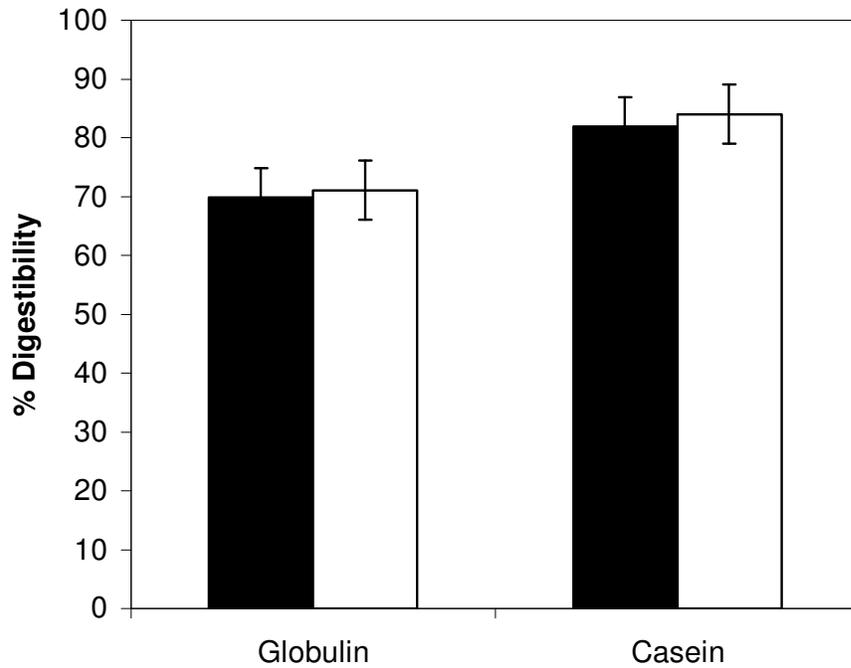


Figure 4 – *In vitro* digestibility of sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.) nuts globulins by multienzymes (trypsin, chymotrypsin, and peptidase) in comparison with casein (mean \pm SD, $n = 3$). Black columns: native protein; white columns: heated samples. Experimental error is indicated by standard deviation bars. The effect of heating on protein digestibility was statistically insignificant, according to ANOVA ($p < 0.05$).

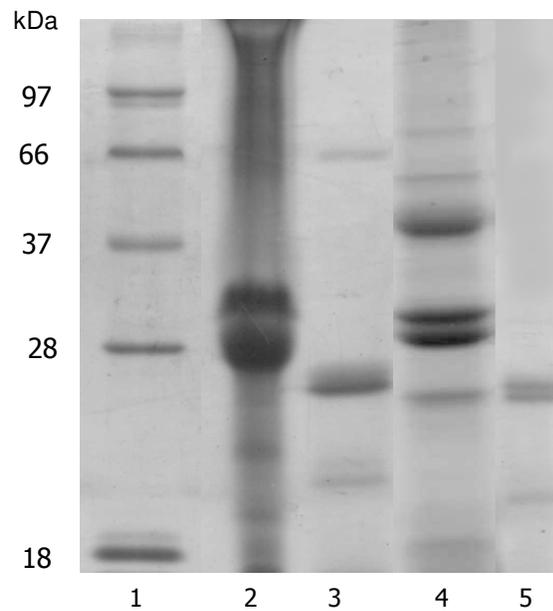
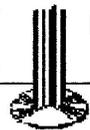


Figure 5 – Electrophoresis showing *in vitro* digestibility of native and heated globulins of sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.) nuts in a multienzymatic assay (trypsin, chymotrypsin, and peptidase); molecular mass marker (Lane 1), casein (lane 2), casein + multienzymes (lane 3), globulins (lane 4), and globulins + multienzymes (lane 5).

ANEXO II



UFMS

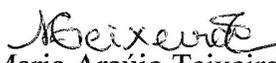
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº. 75/2005 referente ao projeto de pesquisa **Estudo nutricional *in vivo* e *in vitro*, com ênfase em proteínas antinutricionais e tóxicas, de amêndoas de Sapucaia (*Lecythis pisonis*, Camb.)**", de responsabilidade da Pesquisadora Sandra Maria Silveira Denadai, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 21 de fevereiro de 2005.

Campo Grande (MS), 25 de fevereiro de 2005.


Dr^a Maria Araújo Teixeira
Presidente da CEUA


Prof^a Joice Stein
Vice-Presidente da CEUA