

MELISSA ALESSANDRA VALÉRIO

**RESÍDUO DA SEMENTE DO URUCUM (*Bixa orellana* L.):
AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E APROVEITAMENTO PARA USO NA
ALIMENTAÇÃO HUMANA**

CAMPO GRANDE
2012

MELISSA ALESSANDRA VALÉRIO

**RESÍDUO DA SEMENTE DO URUCUM (*Bixa orellana* L.):
AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E APROVEITAMENTO PARA USO NA
ALIMENTAÇÃO HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Lima Ramos

Co-orientador: Prof. Dr. José Antônio Braga Neto

CAMPO GRANDE
2012

MELISSA ALESSANDRA VALÉRIO

**RESÍDUO DA SEMENTE DO URUCUM (*Bixa orellana* L.):
AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E APROVEITAMENTO PARA USO NA
ALIMENTAÇÃO HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), 29 de Junho de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Isabel Lima Ramos

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Priscila Aiko Hiane

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof(a). Dr(a). Karine de Cássia Freitas

Instituição Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

AGRADECIMENTOS

- À professora Maria Isabel Lima Ramos e professor José Antônio Braga Neto pela orientação, apoio e confiança.
- À empresa Chr Hansen, em especial ao Sr. Plínio Pércles Mansim, pela matéria-prima doada para a realização do projeto.
- Aos técnicos de laboratório da Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Osmar, Márcio, Michelly, Mariana, Magali e em especial ao Maurício Fernandes pelo grande apoio durante o ensaio.
- Ao meu pai, pelos conselhos durante toda essa fase e a ajuda na preparação da dissertação.
- À Embrapa Gado de Corte, através da Dra. Jaqueline Rosemeire Verzignassi, responsável pelo Laboratório de Tecnologia de Sementes de Forrageiras Tropicais e seu prestativo assistente, Sr. Luiz de Jesus, que viabilizaram dependências e equipamentos para a limpeza dos lotes de resíduos de urucum.
- À professora Maria Lígia Macedo pelos esclarecimentos e apoio para a execução de algumas análises.
- Ao professor Manoel Mendes Ramos Filho pela ajuda durante a análise do ácido fítico e das análises estatísticas.
- Ao Bruno, do laboratório de Qualidade de Água (LAQUA) do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET) pela ajuda na determinação dos minerais.
- À médica veterinária Elane Fabrício de Jesus no auxílio na coleta de sangue dos animais.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

- Ao programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste por possibilitar a concretização deste projeto.

RESUMO

Valério MA. Resíduo da semente do urucum (*Bixa orellana* L.): qualidade nutricional e aproveitamento para uso na alimentação humana. Campo Grande; 2012. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O urucuzeiro (*Bixa orellana* L.), cujo fruto é o urucum, é um arbusto tropical, cuja cultura vem conquistando cada vez mais importância. É do pericarpo, tegumento que envolve a semente de urucum, se extrai um dos mais importantes corantes naturais, a bixina. Este corante tem sido largamente utilizado, em especial, na indústria alimentícia. Da extração agroindustrial da bixina, resulta o resíduo da semente de urucum, subproduto que representa mais de 95% da matéria prima processada. Tratando-se de sementes e, por serem estas, em geral, ricas em proteína, objetivou-se, nesse trabalho, avaliar a qualidade biológica desse nutriente no farelo obtido do resíduo da semente de urucum. Analisou-se a composição centesimal; minerais; composição de aminoácidos e escores químicos; fatores antinutricionais e a qualidade das proteínas, através do ensaio biológico. Obtiveram-se os seguintes valores na composição centesimal: 11,50% de proteína; 6,74% de umidade; 5,22% de cinzas; 2,22% de lipídeos; 42,19% de carboidratos totais e; 28,45% de fibras. O resíduo do farelo da semente de urucum revelou-se como um alimento rico em fibra e fonte de proteína. Os teores dos minerais estudados não alcançaram as recomendações da IDR para adultos. O ácido fítico, taninos e inibidores de proteases não foram detectados na amostra analisada. A proteína foi mais solúvel em pH 12, sendo o ponto isoelétrico encontrado no pH 3,8. Os aminoácidos mais abundantes foram lisina, fenilalanina + tirosina, leucina e isoleucina, todos em níveis superiores aqueles recomendados pela FAO/WHO para adultos. Valina foi o aminoácido mais limitante com escore químico de 0,22. A qualidade da proteína do resíduo do farelo da semente de urucum e do isolado proteico não mostraram diferenças significativas. O valor biológico foi inferior ao da proteína padrão, porém, maior do que valores encontrados em outros vegetais. Entre as análises bioquímicas realizadas, apenas a creatinina dos grupos teste 1 e 2 (resíduo e isolado proteico) diminuiu em relação ao grupo controle (caseína). Os testes enzimáticos não indicaram toxicidade hepática. Através das observações conduzidas, conclui-se quanto aos aspectos favoráveis ao aproveitamento do resíduo do farelo da semente de urucum na alimentação humana, reconhecendo-se, no entanto, a necessidade da continuidade da pesquisa.

Palavras-chave: *Bixa orellana*, ensaio biológico, qualidade de proteínas, resíduo do urucum, semente do urucum

ABSTRACT

Valério MA. Annatto seed's residue (*Bixa orellana* L.): Nutritional evaluation and use in human's diet. Campo Grande; 2012. [Dissertation – Federal University of Mato Grosso do Sul].

The annatto tree (*Bixa orellana* L.), which fruit is also known as annatto, is a tropical shrub, which crop has gained more importance in Brazil. It is from the pericarp, a fibrous membrane that surrounds the annatto seed that is extracted one of the most important natural dyes, the bixin. This dye has been widely used mostly in the food industry, the industrial process of bixin extraction results the annatto seed residue, a by-product which represents over 96% of the processed raw material. Considering they are seeds, and that seeds in general are rich in protein, the present work aimed to evaluate the biological quality of this nutrient in the meal residue originated from the annatto seed processing. Aspects such as chemical composition, mineral levels, amino acid composition and chemical scores, antinutritional factors, as well as protein quality through biological assay, were analyzed. The following values were obtained in the annatto seed residue composition: 11.50% protein, 6.74% moisture, 5.22% ash, 2.22% lipids, 42.19% total carbohydrates and, 28.45% fibers. The residue of the annatto seed meal proved to be a food rich in fiber and also a protein source. The contents of the studied minerals did not achieve the recommendations of the RDA for adults. Phytic acid, tannins and protease inhibitors were not detected in the samples. The protein was more soluble at pH 12, being the isoelectric point found at pH 3.8. The most abundant amino acids were lysine, phenylalanine +tyrosine, leucine and isoleucine, all at higher levels than those recommended by FAO/WHO for adults. Valine was the most limiting amino acid with a chemical score of 0.22. The protein quality of the residue of the annatto seed meal and protein isolate showed no significant differences. The biological value was lower than that of the standard protein, however, higher than that found in other plants. Among the biochemical analyzes performed, only the creatinine test groups 1 and 2 (residue and protein isolate) decreased compared to control (casein). The enzyme tests did not indicate liver toxicity. Based on the performed observations, it is concluded favorably as to the use of the annatto seed meal residue in human diet, recognizing, however, the need of further research.

Key-words: annatto's residue, annatto's seed, biological assay, *Bixa orellana*, protein quality.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração da solução de ácido fítico para preparo de curva padrão	51
Tabela 2 – Composição centesimal do farelo do resíduo da semente do urucum expressa em g/100g de amostra integra	64
Tabela 3 - Teores de minerais do farelo da semente do urucum expressos em mg/g e a comparação com a ingestão Diária Recomendada (IDR)	65
Tabela 4 - Composição e escore químico (EQ) de aminoácidos do isolado proteico (IP) da semente do urucum e comparação com as exigências da FAO/WHO para adultos	70
Tabela 5 - Comparação dos aminoácidos essenciais (mg/g proteína) do isolado proteico do farelo da semente do urucum (IPU), isolado proteico da soja (IPS) e do isolado proteico da semente do cupuaçu (IPC)	72
Tabela 6 - Ganho de peso e média dos pesos corpóreos inicial e final dos grupos submetidos às dietas caseína (CA), aprroteica (AP), farelo de urucum (Teste 1) e isolado proteico (Teste 2) durante o ensaio biológico	74
Tabela 7 - Ingestão alimentar dos grupos submetidos à dieta caseína (CA), aprroteica (AP), farelo de urucum (Teste 1) e isolado proteico (Teste 2) durante o ensaio biológico	75
Tabela 8 - Índices de qualidade da proteína do farelo da semente de urucum nos grupos caseína (CA), farelo de urucum (Teste 1) e isolado proteico (Teste 2)	76
Tabela 9 - Parâmetros bioquímicos dos grupos submetidos às dietas caseína (CA), farelo de urucum (Teste 1) e isolado proteico (Teste 2) ao final do ensaio biológico	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Urucuzeiro (<i>Bixa orellana</i> L.)	18
Figura 2 - Flores do urucuzeiro (<i>Bixa orellana</i> L.)	19
Figura 3 - Cápsulas abertas e fechadas do urucum (<i>Bixa orellana</i> L.)	20
Figura 4 - Sementes do urucum (<i>Bixa orellana</i> L.)	22
Figura 5 – Extração dos carotenóides das sementes do urucum	42
Figura 6 – Resíduo da semente do urucum (<i>Bixa orellana</i> L.)	43
Figura 7 - Laboratório de Sementes da EMBRAPA, primeira Limpeza do resíduo da semente do urucum	44
Figura 8 - Laboratório de sementes da EMBRAPA, segunda limpeza do resíduo da semente do urucum para retirar sujidades em tamis – A; sujidades – B	44
Figura 9 - Gaiolas metabólicas utilizadas no ensaio biológico	54
Figura10 - Ração aprteíca (sem adição de caseína) – A e Ração padrão caseína (uso da proteína caseína) – B	55
Figura 11 - Ração teste com farelo do urucum (Teste 1) e ração teste com isolado proteico do farelo (Teste 2)	56
Figura 12 - Curva de solubilidade do resíduo da semente do urucum	69
Figura 13 - Evolução de peso dos animais dos grupos aprteico, caseína, teste 1 e teste 2 durante o período experimental	74

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Valor Calórico Total	47
Equação 2 – Escore Químico	48
Equação 3 – Taxa de Eficiência Proteica (PER)	56
Equação 4 – Valor Biológico (VB)	57
Equação 5 – Coeficiente da Eficácia Aliménar (CEA)	57
Equação 6 – Digestibilidade Verdadeira (DV)	58
Equação 7 – Balanço Nitrogenado (BN)	
Equação 8 – Determinação da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) ..	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
AF	Ácido Fítico
AIN	American Institute of Nutrition
ALT/TGP	Alanina aminotransferase/transaminase glutâmico pirúvica
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	Association of Oficial Analytical Chemists
AST/TGO	Aspartato aminotransferase/ transaminase glutâmico oxalacética
BN	Balanço Nitrogenado
BAPNA	N-benzoyl-L-arginine-pnitroanilide
CA	Caseína
CCET	Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas
CEA	Coeficiência de Eficácia Alimentar
DV	Digestibilidade Verdadeira
dL	Decilitros
DP	Desvio Padrão
EQ	Escore Químico
EMPRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMEPA	Empresa de Pesquisa Agropecuária da Paraíba
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Grama
IDR	Ingestão Diária Recomendada
IPC	Isolado proteico do cupuaçu
IPS	Isolado proteico da soja
IPU	Isolado proteico do resíduo do urucum
LAQUA	Laboratório de Qualidade de Água
mg.dL ⁻¹	Miligrama por decilitros
mg	Miligrama
mg/g	Miligrama por grama
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NM	Nanômetros

N	Normal
PA	Padrão
PER	Taxa de Eficiência Proteica
PI	Ponto Isoelétrico
VB	Valor Biológico
VD	Valor Diário
VDR	Valor Diário de Referência
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VCT	Valor Calórico Total
°C	Graus Celsius
UI/L	Unidade Internacional por litro
UTASP	Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
µg	Microgramas
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Urucum	17
2.1.1 Sementes de urucum	21
2.1.2 Farelo do resíduo da semente de urucum	24
2.2 Resíduos Agroindustriais	26
2.3 Fatores Antinutricionais	27
2.4 Proteínas	30
2.5 Minerais	32
2.5.1 Cálcio (Ca)	33
2.5.2 Magnésio (Mg)	34
2.5.3 Ferro (Fe)	35
2.5.4 Zinco (Zn)	36
2.5.5 Manganês (Mn)	36
2.5.6 Sódio (Na)	37
2.5.7 Cobre (Cu)	37
2.5.8 Potássio (K)	38
2.6 Solubilidade das Proteínas	39
2.7 Ensaio Biológico	40
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo Geral	41
3.2 Objetivos Específicos	41
4. METODOLOGIA	42
4.1 MATERIAL	42
4.2 MÉTODOS	43
4.2.1 Obtenção do farelo do resíduo da semente do urucum	43
4.2.2 Composição Centesimal do farelo do resíduo do urucum	45
4.2.2.1 Umidade	45
4.2.2.2 Cinzas ou Resíduo Mineral Fixo	45
4.2.2.3 Lipídeos	45
4.2.2.4 Proteínas	46

4.2.2.5 Carboidratos	46
4.2.2.6 Fibras	46
4.2.2.7 Valor Calórico Total (VCT)	47
4.2.3 Minerais	47
4.2.4 Composição e Escore Químico de Aminoácidos	48
4.2.5 Determinação dos Fatores Antinutricionais.....	49
4.2.5.1 Taninos	49
4.2.5.2 Ácido Fítico	49
4.2.5.3 Inibidores de Proteases	51
4.2.6 Obtenção do Isolado Proteico	52
4.2.6.1 Solubilidade da proteína frente ao pH	52
4.2.6.2 Isolado Proteico	53
4.2.7 Ensaio Biológico	53
4.2.7.1 Amostra e Delineamento Experimental	53
4.2.7.2 Procedimento	54
4.2.7.3 Elaboração das Rações	55
4.2.8 Índices da Qualidade Proteica	56
4.2.8.1 Taxa de Eficiência Proteica (PER)	56
4.2.8.2 Valor Biológico (VB)	57
4.2.8.3 Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA)	57
4.2.8.4 Digestibilidade Verdadeira (DV)	57
4.2.8.5 Balanço Nitrogenado (BN)	58
4.2.9 Análises Bioquímicas	58
4.2.9.1 Glicose	59
4.2.9.2 Colesterol Total	59
4.2.9.3 Triglicerídeos	59
4.2.9.4 Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL)	60
4.2.9.5 Creatinina	60
4.2.9.6 Alanina aminotransferase/ transaminase glutâmico pirúvica (ALT/TGP) e Aspartato aminotransferase/ transaminase glutâmico oxalacética (AST/TGO).....	60
4.2.10 Análises Estatísticas	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	61

5.1 Composição Centesimal do farelo do resíduo da semente do urucum	61
5.2 Minerais	64
5.3 Fatores Antinutricionais	66
5.3.1 Taninos	66
5.3.2 Ácido Fítico	67
5.3.3 Inibidores de Proteases	68
5.4 Obtenção do Isolado Proteico	68
5.5 Composição de Aminoácidos e Escore Químico	70
5.6 Ensaio Biológico	73
5.6.1 Índices da Qualidade Proteica	75
5.6.2 Análises Bioquímicas	78
6. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO - Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UFMS	105

1. INTRODUÇÃO

O urucuzeiro, cujo fruto é o urucum (*Bixa orellana*), é um arbusto tropical que cresce, espontaneamente, desde a Guiana até a Bahia. Trata-se de uma cultura que vem conquistando cada vez mais importância econômica, uma vez que do pericarpo (camada que envolve as sementes) se extrai um corante natural ou pigmento constituído por vários carotenóides, predominando a bixina, que representa mais de 80% dos carotenóides totais presentes (PEDROSA; CIRNE; NETO, 1999; FRANCO *et al.*, 2008).

O urucuzeiro, bem conhecido pelos indígenas era utilizado como repelente de insetos e protetor solar de pele contra raios solares, muito antes do descobrimento do Brasil. Posteriormente, os colonos passaram a usá-lo como condimento para vários pratos caseiros. É originário da América Tropical, possivelmente da flora amazônica e o nome científico *Bixa orellana*, foi dado por Francisco Orellana, após uma expedição na região da Amazônia setentrional (CASTRO *et al.*, 1994; GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003). Os maiores produtores mundiais de urucum são Peru, Brasil e Quênia (CHAVES *et al.*, 2004; COSTA; CHAVES, 2005).

A bixina do urucum tem se destacado com uma das principais fontes de corantes naturais utilizados no mundo, tendo como principais aplicações na indústria têxteis, de alimentos e cosméticos, e principalmente na farmacêutica para o tratamento de diversas doenças (FRANCO *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2005).

A partir de 1992, o potencial do mercado internacional do urucum teve um grande impulso. Como o produto natural é substituto para corantes sintéticos, considerados cancerígenos, a proibição ao uso destes aditivos nos Estados Unidos, Japão e alguns países da Europa fez com que o urucuzeiro ganhasse importância nas regiões produtoras. Desde os anos de 1994, o urucum é uma das maiores fontes naturais de corantes e pigmentos vermelhos (ALMEIDA *et al.*, 1995).

Ferreira *et al.* (1989) observaram que os teores de nutrientes da semente apresentavam uma tendência a serem superiores aos da casca e placenta em quase todas as seleções utilizadas. A ordem decrescente destes macronutrientes na semente foi respectivamente: Potássio; Nitrogênio; Fósforo; Magnésio e Cálcio. Pela sua composição química, o farelo de urucum pode ser considerado equivalente ao farelo de trigo, por apresentar teores semelhantes especialmente de fibra e proteína bruta (TONANI *et al.*, 2000).

O farelo do resíduo da semente de urucum é o subproduto da extração agroindustrial da bixina, corante natural largamente utilizado pela indústria alimentícia (MORAES, 2008).

O corante de urucum é utilizado extensivamente em suas várias formas, na indústria de alimentos, nas tonalidades que variam de amarelas a vermelhas. O sal de norbixina, pigmento hidrossolúvel do urucum, é utilizado, principalmente em queijos, sorvetes, derivados de cereais, confeitos, bebidas, molho e salsichas, representando quase a totalidade do mercado de urucum (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; COSTA; CHAVES, 2005; KOUL V; KOUL S; TIKOO, 2003; PIMENTEL; STRINGHETA, 1999; OLIVEIRA, 2005; SHUHAMA *et al.*, 2003; SILVA; NACHTIGALL; STRINGHETA, 2009). A bixina, pigmento lipossolúvel, é usada em alimentos como margarinas, cremes vegetais, queijos e sorvetes (CONSTANT, 1999; ROSA, 2004; SILVA; NACHTIGALL; STRINGHETA, 2009).

Entre os corantes naturais, o urucum figura como o segundo em importância econômica depois do caramelo. O cultivo do urucum destina-se exclusivamente a comercialização do corante presente na semente. A produção de pigmento, contudo, deixa a semente como subproduto (MERCADANTE; PFANDER, 1998). Com o aumento da escala de extração agroindustrial desse corante, resulta em 94 a 98% de sobras, que atualmente são descartadas pela indústria como resíduo (MORAES *et al.*, 2008).

Segundo Armour *et al.* (1998) as sementes de plantas contribuem significativamente para dieta humana e animal; porém no beneficiamento de alimentos vegetais e animais há uma grande variedade de resíduos que é transformada. Por vezes essa transformação não ocorre e, esses resíduos ou matérias primas, deixam de ser aproveitados, como por exemplo, vários tecidos de mamíferos, aves e pescados (EVANGELISTA, 2005).

Os elementos residuais, constituídos por cascas, caroços, sementes, ramas, bagaços, etc., podem ser empregados como subprodutos para utilização humana, reservando-se os detritos para a fabricação de ração animal, adubos, entre outros (EVANGELISTA, 2005).

Portanto, por ser a semente de urucum considerada, em sua composição química, rica em proteína, esse trabalho objetivou avaliar a qualidade biológica desse nutriente referente à composição em aminoácidos essenciais e outros elementos nutritivos presentes no resíduo da semente do urucum.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 URUCUM

Na chegada dos conquistadores espanhóis ao Novo Mundo, muitas plantas cujos extratos eram empregados pelos Maias e Astecas tornaram-se conhecidas. Uma destas plantas, o urucum, existente ao longo da América tropical era usada como extrato para tingir tecidos e pintar o corpo, além de ser utilizada juntamente com a vanilina, na formulação de uma bebida a base de cacau (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003; SANDI *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2005).

Originário da América Tropical, sua disseminação em vários continentes é função da larga procura como fonte de corante natural para medicamentos, cosméticos e principalmente, alimentos. Por conta da sua propagação em diferentes regiões do mundo pode-se encontrar a planta do urucuzeiro, com vasta sinonímia vulgar. Arnoto, em Ceilão; Atolé, Achiote ou Bija, no Peru e em Cuba; Axiote, no México; Achiote, Anatto, Bija e Santo Domingo, em Porto Rico; Ditaque e Kifasu, em Angola; Bixa, na Guiana; Orleans Laum, na Alemanha; Roucou, Rocouyer, na França. No Brasil, é conhecido vulgarmente por urucum, urucu, açafroa, açafraão e açafroeira da terra (SILVA; FRANCO, 2000a; OLIVEIRA, 2005).

O urucuzeiro é um arbusto que pode atingir de 2 a 9 m de altura. É planta ornamental, pela beleza e colorido de suas flores e utilíssima como fornecedora de sementes condimentares, laxativas, cardiotônico, hipotensor, expectorante e antibiótico, agindo como anti-inflamatório para as contusões e feridas, apresentando, ainda, emprego interno na cura das bronquites e externo nas queimaduras. Dela se extrai também o óleo industrial (FRANCO *et al.*, 2008; CORRÊA, 1978; BARBOSA FILHO, 2006).

As plantas apresentam um sistema radicular do tipo pivotante, contendo um eixo principal, a partir do qual brotam, lateralmente, ramificações secundárias e terciárias. O seu caule é lenhoso e relativamente reto, de onde partem vários ramos que formam uma copa de aspecto bem frondoso. As folhas se prendem à superfície dorsal e ventral dos ramos, de forma alternada, são inteiras, apresentam nervuras longas e possuem coloração verde. As flores, grandes e na cor branca ou em várias tonalidades, são emitidas praticamente durante todo o ano, no entanto, com maior

intensidade em duas épocas (junho/julho e novembro/dezembro - Nordeste), definindo as safras da planta. Normalmente, a abertura das flores ocorre primeiramente na parte inferior e depois na porção superior da inflorescência. Nos frutos do urucum denominados de cápsulas ou cachopas, observam-se antes da maturação fisiológica colorações variadas, desde verde-clara a verde escura, amareladas ou vermelho-escuras. Um fruto bem desenvolvido pode fornecer, em média, 40 a 60 sementes e excepcionalmente é possível existir cápsulas com 70 (Figura 1 e Figura 2) (FRANCO *et al.*, 2002).



Figura 1: Urucuzeiro (*Bixa orellana* L.)

Fonte: www.multiflorafernandopolis.blogspot.com



Figura 2: Flores do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.)
Fonte: www.pt.wikipedia.org

Nas condições do Nordeste brasileiro, a colheita do urucum é realizada, aproximadamente, aos 120 dias após a abertura da flor. A maturação das cápsulas é dada pela mudança de cor quando passa do verde, amarelo ou vermelho para castanho ou marrom. A primeira colheita, a mais significativa, ocorre nos meses de junho/julho, enquanto a segunda, conhecida como safrinha, realiza-se no período novembro/dezembro (fevereiro/março nas condições do sul/sudeste). A operação de colheita deve ser realizada, no máximo, duas a três vezes por safra (FRANCO *et al.*, 2008).

É de suma importância colher apenas as cápsulas que se apresentem, adequadamente, maduras e secas, uma vez que o percentual elevado de umidade nas sementes contribui negativamente para a perda da qualidade das mesmas, assim como, o aparecimento de fungos (FRANCO *et al.*, 2001). Do urucum são produzidos os corantes hidrossolúveis à base de norbixina, com vasto uso em salsicharias, laticínios e cereais; os corantes lipossolúveis à base de bixina com grandes aplicações em produtos alimentícios, a exemplo de massas, recheios e produtos oleosos; e os condimentos como o colorau ou colorífico, muito comum na culinária brasileira e na América Latina (Figura 3) (FRANCO, 2008).



Figura 3 – Cápsulas abertas e fechadas do urucum (*Bixa orellana* L.)
Fonte: www.inventoresbrasileiros.com & www.camaramuqui.es.gov.br

O consumo de urucum tem aumentado muito nas últimas décadas. Excluídas as demandas internas, o comércio internacional médio anual de urucum é estimado em cerca de 10.000 toneladas, sendo dois terços desta produção na forma de semente bruta e o restante como extrato. A América Latina produz 60% de todo o urucum consumido no mundo, seguido pela África com 27% e a Ásia com 12%. Os preços da semente dependendo da produção e da variedade oscilaram de US\$ 2000 a US\$ 660 por tonelada entre os anos de 1985 a 1995. Estes preços também são proporcionais ao conteúdo de bixina, o qual em alguns casos deve ser maior que 2,7% (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003).

A crescente demanda por produtos livres de aditivos sintéticos está ajudando a impulsionar o consumo do urucum. Isso incentivou o cultivo da planta em todas as regiões do país, com pólos de produção instalados no Pará, Paraíba, Bahia, Minas Gerais, Paraná e São Paulo. Nesse último, o grão vermelho tomou conta da chamada região da Alta Paulista, que até a década de 1930 era destinada à cafeicultura. A empresa Christian Hansen mantém um braço comercial em Monte Castelo (SP), a Urucum do Brasil, que compra anualmente na região 900 toneladas do produto. O volume responde por 45% das aquisições globais de urucum da empresa, que adquire somente grãos com teor de bixina superior a 4% (REVISTA GLOBO RURAL, 2007).

O Brasil situa-se como o segundo produtor mundial de urucum, contando hoje com cerca de seis mil hectares de plantações pelo país, seguido pelo Quênia, sendo o Peru, o maior produtor e exportador (BARBOSA FILHO, 2006; OLIVEIRA, 2005). Em 2006, o Brasil produziu cerca de 13.000 toneladas/ano de semente de urucum e

deste montante, o nordeste contribuiu com 47,88% (6.225 toneladas) (FRANCO, 2007).

Do total de sementes de urucum produzido no Brasil, cerca de 25% são utilizados na preparação de extratos lipo e hidrossolúveis e o restante é usado na fabricação do colorífico, totalmente consumido no mercado interno (MERCADANTE; PFANDER, 1998).

2.1.1 SEMENTES DE URUCUM

As sementes de urucum (Figura 4) se destacam como importante matéria prima para a obtenção dos corantes bixina (representa mais de 80% dos carotenóides totais lipossolúveis), norbixina e norbixato. Isto se deve, em razão das suas características de produto natural, não tóxico, com elevado poder tintorial e amplo espectro de cores, utilizados para a coloração de produtos alimentícios, cosméticos, farmacêuticos e têxteis, além de serem usados em condimentos culinários como o colorau. Além de serem utilizadas no tratamento de doenças coronarianas (cardite, endocardite, pericardite), afecções do estômago e intestino, hemorragias, constipação intestinal, prisão de ventre, afecções respiratórias (tosse, bronquite, faringite, asma), gripe, queimaduras (evitando a formação de bolhas) (ANSELMO; MATA; RODRIGUES, 2008; FRANCO *et al.*, 2002; TESKE; TRENTINI, 2001).



Figura 4 – Sementes do urucum (*Bixa orellana* L.)
Fonte: www.cpt.com.br

A coloração vermelha da semente está diretamente relacionada ao percentual da bixina. Quanto maior a concentração de norbixina, maior a tendência para o amarelo. Tanto as sementes, quanto os extratos processados são comercializados com base no teor de bixina ou norbixina (OLIVEIRA, 2005).

Nas sementes de urucum foi descrita a presença de celulose, sucrose, óleos, essências, alfa e beta-carotenos (PAZ *et al.*, 2006). As sementes são ricas em proteínas, podendo ser empregadas na alimentação animal, fazendo parte na composição de rações para aves, principalmente para poedeiras. Sua utilização tem como finalidade melhorar a coloração das gemas dos ovos, tornando o produto mais apresentável para o consumo (FRANCO *et al.*, 2002).

Bressani (1983) conduziu estudos nesse sentido, efetuando análises das sementes com enfoque especial para seu valor nutricional. Os resultados revelaram elevado teor de fibras totais (16%); alto teor de fósforo; baixo teor de cálcio e, elevada quantidade de proteína (13 a 17%), destacando-se os aminoácidos lisina e triptofano os quais foram constatados em quantidades majoritárias, enquanto que, metionina, isoleucina, leucina, fenilamina e treonina, em percentuais mais baixos. O conteúdo total de proteína corresponde à cerca de 65% daquele encontrado na caseína, usada como referência. O autor reporta, que a deficiência de aminoácidos, particularmente metionina faz desta farinha um produto de baixo valor biológico. Também foi constatada a baixa digestibilidade da proteína, 57% comparada a 94 % para a caseína. Assim, o autor sugere que mais de 50% das fibras podem ser

eliminadas por peneiramento da farinha trazendo conseqüentemente um aumento da digestibilidade.

Segundo Franco (2008), na análise da semente de urucum, foram encontrados os seguintes valores, com base em matéria seca: 13,5% de proteína bruta, 45,7% de fibra em detergente neutro, 1,5% de extrato etéreo, 6,2% de matéria mineral e 63,8% de extrativo não nitrogenado (ANSELMO; MATA; RODRIGUES, 2008; TONANI *et al.*, 2000). Possui ainda 10,6% de aminoácidos, seis dos oito aminoácidos essenciais contemplados no padrão ideal da Organização Mundial da Saúde (OMS). As cinzas (5,4%) apresentaram alto conteúdo de fósforo, ferro e zinco, com reduzido teor de cálcio. Além da bixina e norbixina outros carotenóides são encontrados em menores quantidades no arilo da semente do urucum, entre eles: isobixina, beta caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina e a orellina, de cor amarela.

A bixina é o carotenóide majoritário das sementes de urucum, perfazendo um mínimo de 80% dos carotenóides totais (PRESTON; RICKARD, 1980). Outros carotenóides, em quantidades muito pequenas, foram isolados de sementes de urucum e suas estruturas foram elucidadas através de técnicas espectroscópicas como espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN) (MERCADANTE; PFANDER, 1998). Carvalho *et al.* (2010), avaliaram a concentração de bixina e de lipídios em coleção do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), composta por 25 acessos, verificando que os mesmos possuem altos teores de bixina na semente, variando (em base seca) de $3,12 \pm 0,06\%$ a $6,26 \pm 0,06\%$. Os teores de lipídios variaram de $1,97 \pm 0\%$ a $3,98 \pm 0,09\%$.

Weiss e Landauer (2003) realizaram um levantamento de inúmeras substâncias potencialmente antioxidantes, dentre elas encontra-se a bixina. Outras aplicações farmacológicas são citadas como, por exemplo, o emprego destas substâncias como agentes foto protetores utilizadas em tratamentos radioterápicos. O efeito antioxidante da bixina e norbixina tem importância na prevenção de aterosclerose (LIMA *et al.*, 2003).

Lima *et al.* (2001b) induziram hiperlipidemia em coelhos, com uma dieta contendo colesterol. Acrescidas a esta ração, foram testados os carotenóides bixina, norbixina e o flavonóide quercetina, provenientes de urucum. Após 28 dias de tratamento, foi determinada dosagem sorológica para a quantificação do colesterol de alta densidade (HDL) e triglicerídeos. A bixina apresentou a maior redução de

colesterol (40%), em relação ao padrão, superior à redução obtida com a norbixina (25,35%) e quercetina (35,07%). Ainda, a bixina apresentou a menor redução do HDL, sendo isto uma vantagem, visto que o HDL transporta o colesterol da circulação sanguínea para o fígado, onde é metabolizado.

Segundo Lima *et al.* (2003), o efeito antioxidante da bixina e norbixina tem importância na prevenção de aterosclerose. Uma vez que as lesões ateroscleróticas iniciam-se após algum tipo de lesão no endotélio, cujo dano é causado principalmente pela lipoproteína LDL oxidada, a inibição da oxidação, resulta na proteção do endotélio.

Com o objetivo de obter um fitoterápico e/ou um suplemento alimentar, voltado ao tratamento da hiperlipidemia em animais, Franco (2008), induziu coelhos a hiperlipidemia oferecendo diariamente ração e após o período de indução administrou diferentes dosagens de bixina. Ao final do experimento, observou redução do colesterol sanguíneo, aumento do HDL e ausência de efeito hipotriglicéridico, porém verificou que existe necessidade de cuidados quanto à dosagem de bixina administrada, pois a mesma em dose de 10% mostrou-se tóxica aos animais.

A presença de carotenóides pode minimizar os efeitos dos radicais livres, o que torna de grande importância a investigação dos efeitos benéficos de tais pigmentos. Nesse sentido, Souza (2011) investigou a ação terapêutica da semente de urucum e dos cristais de bixina na redução da toxicidade da cisplatina sobre distúrbios hepáticos e renais em ratos adultos. Os resultados mostraram proteção hepática e renal contra injúria causada pela cisplatina, quando administrado o urucum ou a bixina na dieta dos animais antes da ingestão deste fármaco.

2.1.2 FARELO DO RESÍDUO DA SEMENTE DE URUCUM

O farelo de urucum é obtido exclusivamente de sementes processadas de urucum. É o resíduo das indústrias de processamento de sementes de urucum para a obtenção do corante bixina, cujo peso representa menos de 6% do peso total da semente. A extração do pigmento (bixina) pode ser feita por centrifugação em água ou por centrifugação em óleo de soja. As sementes submetidas aos processamento em água passam por uma operação de secagem, sendo, em seguida misturadas às

sementes processadas em óleo. Juntas são moídas, resultando, assim, no farelo de sementes de urucum (PASCHOINI, 2000).

Para a obtenção do produto mais popular do urucum, o colorau, cerca de 97 a 98% da semente bruta de urucum não é aproveitada após o processamento, tornando-se um resíduo que pode poluir o meio ambiente (SILVA *et al.*, 2006a). Análises sobre a composição química deste resíduo (UTIYAMA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2005), mostraram o seu potencial para ser usado em rações de aves e suínos. Além disso, a presença de restos de pigmentos pode viabilizar a sua utilização em rações de poedeiras como agente corante da gema dos ovos (BRAZ *et al.*, 2007).

No farelo do resíduo da semente de urucum foram encontrados os seguintes valores com base em matéria seca: 13,5% de proteína bruta, 45,7% de fibra em detergente neutro, 1,5% de extrato etéreo, 6,2% de matéria mineral e 63,8% de extrativo não nitrogenado (ANSELMO; MATA; RODRIGUES, 2008; TONANI *et al.*, 2000).

Oliveira (2004) cita que pesquisas têm sido realizadas utilizando o urucum, rico em bixina, na pigmentação de gemas de ovos de poedeiras, principalmente quando se utiliza uma fonte energética de pouca ação pigmentante, como o sorgo, a quirera de arroz, o milheto, a farinha de mandioca, entre outras, em substituição ao milho amarelo.

Utilizando níveis crescentes (0%; 5%; 10%; 15%; 20%) do farelo de urucum na alimentação de suínos, foi verificado que a melhor conversão alimentar, ingestão de matéria seca e ganho de peso foram obtidos com a inclusão de 5% do subproduto do urucum na dieta (TONANI, 1995; GONÇALVES, 2004).

Moraes *et al.* (2008) avaliaram os balanços nitrogenados de caprinos alimentados com dietas contendo subproduto de urucum em diferentes níveis de inclusão. As inclusões de subproduto de urucum nas dietas foram de 18%, 36%, 46% e 72%. Os balanços nitrogenados em função do nível de inclusão do subproduto apresentaram significância entre as dietas, apesar de todos os níveis apresentarem balanço nitrogenado positivo.

Em bovinos, Tonani (1995) concluiu que, em níveis de 26% na dieta, o resíduo de semente processada de urucum não alterou a digestibilidade dos nutrientes e nem o desempenho e a conversão alimentar dos animais. Apenas

houve a constatação de que a ingestão de matéria seca tende a ser reduzida à medida que há um aumento na porcentagem de resíduo de urucum na dieta.

Em animais não ruminantes houve redução no ganho de peso de frangos, quando substituiu o milho pelo resíduo de urucum em 30 a 50%, provavelmente devido ao aumento do teor de fibra bruta e redução dos níveis de energia da dieta (TONANI, 1995; GONÇALVES, 2004).

O resíduo de semente processada de urucum é um alimento que apresenta coeficientes de digestibilidade para energia e proteína de, respectivamente, 63,2 e 59,7% para suínos em crescimento, proporcionando 2365 kcal/kg de energia digestível e 8,8% de proteína digestível (UTIYAMA, 2001).

Embora muitas pesquisas tenham sido realizadas com o farelo da semente para ração animal, não foram encontradas pesquisas relacionadas ao seu uso em alimentação humana.

2.2 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os resíduos agroindustriais são gerados no processamento de alimentos, fibras, couro, madeira, produção de açúcar e álcool, etc., sendo sua produção, geralmente, sazonal, condicionada pela maturidade da cultura ou oferta da matéria prima (MATOS, 2005).

Na indústria de alimentos, são conhecidos como “resíduos, partes das matérias primas não utilizadas no processamento do produto principal” (EVANGELISTA, 2005), constituídos pelos restos de plantas não aproveitados comercialmente (MATOS, 2005).

O aparecimento de resíduos não só ocorre nas operações preparatórias da escolha e seleção da matéria prima cogitada, (beneficiamento), como também, nas diversas fases da fabricação de enlatados, onde os elementos residuais, constituídos por cascas e caroços, sementes, ramas, bagaços, etc., são ou devem ser empregados em subprodutos para utilização humana, reservando-se os detritos para o fabrico de ração animal, de adubos, etc. (EVANGELISTA, 2005). Esses materiais (cascas, caroços e outros), além de fonte de matéria orgânica, servem como fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento (COELHO *et al.*, 2001); embora, seja notória a necessidade de mais

estudos para se indicar o valor nutricional de cada resíduo, os fatores antinutricionais, bem como a sua proporção na dieta (NUNES *et al.*, 2007).

Segundo Rosa *et al.* (2011), as questões ambientais têm alavancado o interesse por fontes renováveis e os resíduos agroindustriais tornaram-se uma fonte importante para a produção de novos materiais, de produtos químicos e de energia. O desenvolvimento e implementação de processos sustentáveis capazes de converter biomassa em vários produtos com valor agregado é uma necessidade absoluta para aproveitar resíduos agroindustriais e gerar menor impacto ambiental. Os autores discutem conceitos importantes relacionados com a agregação de valor aos resíduos da agroindústria e ressaltam que o desenvolvimento de novos usos para esses resíduos é essencial para aperfeiçoar a eficiência do agronegócio e reduzir o impacto ambiental.

De forma geral, os resíduos da agroindústria de processamento de produtos de origem vegetal (frutas, oleaginosas, fibrosas, madeiras, etc.) e origem animal (laticínios, avicultura de corte, aquicultura, etc.) apresentam em suas composições diferentes constituintes, que abrem muitas oportunidades de agregação de valor (ROSA *et al.*, 2011).

Os subprodutos (resíduos) da agroindústria do doce, suco, da cervejaria e dos extratos vegetais, encontrados em abundância nas diversas regiões do país, vêm despertando interesses por serem aproveitados como possíveis ingredientes de rações animais. O uso desses subprodutos na ração animal justifica-se pelo baixo custo, por serem atóxicos e não fazerem parte da dieta humana. Além disso, quando não aproveitados, podem poluir o meio ambiente (SILVA, 2003).

Experimentos visando à utilização de resíduos industriais de alimentos como fontes de proteína vêm sendo conduzidos com frequência na tentativa de suprir as necessidades nutricionais diárias com fontes de proteínas eficientes e economicamente viáveis à população em geral (NUNES *et al.*, 2003).

2.3 FATORES ANTINUTRICIONAIS

A biodisponibilidade de um nutriente relaciona-se com a capacidade do organismo utilizá-lo após sua ingestão, porém os alimentos possuem em sua composição certos componentes químicos capazes de causar uma diminuição da utilização orgânica de alguns nutrientes, sendo tais compostos denominados fatores

antinutricionais (SOUZA *et al.*, 2005). Estes podem ser divididos em quatro grupos: 1- fatores que afetam a utilização e digestão de proteínas (inibidores de protease, taninos e lectinas); 2- fatores que afetam a utilização de minerais (fitatos, gossipol, oxalatos, glucosinolatos); 3- antivitaminas; 4- fatores variados como as micotoxinas, alcalóides, saponinas, nitratos, fitoestrógenos e outros (FRANCIS; MAKKAR; BECKER, 2001).

Esses fatores quando encontrados em sementes de algumas leguminosas e em cereais podem levar a um decréscimo da digestibilidade da proteína e seu uso como alimento fica restrito. Além disso, causam hipertrofia e hiperplasia pancreática, inibem o crescimento de animais experimentais (LIERNER, 1994), causam aumento do fígado e diminuem a massa muscular (OLIVEIRA; PUSZTAI; GRANT, 1988).

Os grãos de leguminosas contêm uma variedade de fatores antinutricionais que podem provocar efeitos fisiológicos adversos ou diminuir a biodisponibilidade de certos nutrientes. Danos crônicos leves devidos à prolongada ingestão de antinutrientes são muito difíceis de avaliar. Como consequência, existem muitas controvérsias em estudos de biodisponibilidade *in vivo* a respeito da extrapolação de resultados de sistemas experimentais, para seres humanos que se alimentam com dietas complexas.

A maior questão sobre os riscos à saúde provocados por antinutrientes é o desconhecimento dos níveis de tolerância, do grau de variação do risco individual e da influência de fatores ambientais sobre a capacidade de detoxificação do organismo (SILVA; SILVA, 1999).

Muitos dos fatores antinutricionais são sensíveis ao calor e podem ser inativados por diferentes tratamentos (AKPAPUNA; SEFA-DEDEH, 1997), melhorando a qualidade nutricional das proteínas vegetais.

Os fatores residuais, ou seja, os não inibidos pelo tratamento térmico são responsáveis pela baixa qualidade das proteínas mesmo que estas apresentem um alto escore químico de aminoácidos (SEENA; SRIDHAR; JUNG, 2005).

O papel dos fatores antinutricionais tem sido rediscutido, em função de descobertas recentes que evidenciam o potencial de algumas dessas substâncias em exercer funções benéficas ao organismo humano. A habilidade do ácido fítico em atuar como anticarcinogênico, antioxidante e prestar contribuição nutricional no tratamento de diabetes, através da ação inibidora de α -amilases, são exemplos da diversidade de atuação dessas substâncias.

Em revisão sobre o papel do ácido fítico (fitato), pesquisadores descrevem os conhecimentos atuais em relação a esse composto que está presente de forma natural em muitos alimentos derivados de plantas, principalmente legumes. Seus efeitos antinutricionais estão relacionados com a forte capacidade de formar complexos com proteínas e minerais, e existem vários métodos para diminuir este efeito, tais como, cozimento, germinação, fermentação e adição de enzimas. No entanto, o inositol hexafosfato tem sido objeto de novos interesses pela prevenção do câncer e/ou em sua terapia, e por seu efeito anticolesterolêmico (URBANO *et al.*, 2000). Cerca de 75% do ácido fítico está associado com componentes da fibra solúvel presentes na semente (TORRE; RODRIGUES; SAURA-CALIXTO, 1991).

Fenóis comuns em plantas não são considerados tóxicos em quantidades e condições normais, com exceção dos taninos, que possuem a habilidade de complexar e precipitar proteínas de soluções aquosas (SALUNKHE; CHAVAN; KADAM, 1990). Em leguminosas e cereais, os taninos têm recebido considerável atenção, por causa de seus efeitos adversos na cor, sabor e qualidade nutricional (SALUNKHE *et al.*, 1982).

Os taninos são antioxidantes, inibidores de determinadas enzimas e influenciam negativamente a digestibilidade de proteínas, no entanto, os seus efeitos em seres humanos ainda são desconhecidos (NACZK *et al.*, 1994; SILVA; SILVA, 1999). Ocorrem em uma ampla variedade de vegetais, podendo ser encontrados nas raízes, na casca, nas folhas, nos frutos, nas sementes e na seiva (AGUILAR *et al.*, 1999).

A concentração de taninos nas plantas varia de acordo com os tecidos vegetais, bem como em função da idade e tamanho da planta, da parte coletada, da época ou, ainda do local de coleta (BERNARDES *et al.*, 2011; MONTEIRO; ALBUQUERQUE; AMORIM, 2005).

Elevados teores de taninos hidrolisáveis foram encontrados na porção aquosa existente entre as sementes e a casca do urucum quando avaliada por testes químicos, espectroscopia no infravermelho e difração de raios-x em policristais, justificando assim a atividade anti-inflamatória encontrada neste material (LIMA *et al.*, 2006), porém, as sementes não foram avaliadas pelos autores.

Os inibidores de proteases são proteínas de ampla distribuição no reino vegetal, capazes de inibir as atividades da tripsina, quimotripsina, amilase e carboxipeptidase (SILVA; SILVA, 2000). Causam crescimento do pâncreas, aumento

da secreção enzimática e redução na taxa de crescimento por excessiva perda fecal de proteínas (CARDOSO *et al.*, 2007).

Dentre as substâncias antinutricionais, os inibidores de tripsina são os mais estudados por afetarem a digestibilidade das proteínas de leguminosas (CARDOSO *et al.*, 2007), os quais têm impacto no crescimento e/ou metabolismo basal de diferentes espécies animais (BRUNE *et al.*, 2010). E junto com as lectinas são considerados instáveis ao tratamento térmico (SILVA; SILVA, 2000).

O alto teor de inibidores de proteases nas sementes de muitas espécies de plantas tem despertado o interesse quanto a sua função fisiológica, sugerindo atuação no armazenamento de nutrientes, ação protetora contra o ataque de animais, insetos e microrganismos (CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002).

Alguns autores obtiveram inativação total de inibidores de tripsina em feijões (*Phaseolus vulgaris*) embebidos em água destilada por uma noite e submetidos à temperatura de 97°C por 7,5 minutos. Esse fato demonstra, segundo os autores que inativação total do inibidor de tripsina pode ser alcançada em feijões embebidos em água e aquecidos a 100°C por 5 a 10 minutos (ANTUNES; SGARBIERI, 1980).

Segundo Cardoso *et al.* (2007) que estudaram a atividade de inibidores de proteases em linhagens de soja geneticamente melhoradas, as variações genéticas das linhagens de soja reduziram a atividade inibitória da tripsina, sendo necessário um menor tempo de processamento térmico para a redução da atividade inibitória de tripsina.

2.4 PROTEÍNAS

Proteínas são as mais abundantes macromoléculas biológicas e representam o principal componente estrutural e funcional de todas as células do organismo (DE ANGELIS; TIRAPEGUI, 2007).

As proteínas são consideradas nutrientes predominantemente plásticos, isto é, sua principal função é atuar na formação de tecidos no processo de renovação dos mesmos e, principalmente, no crescimento. Além da função estrutural das proteínas (esqueleto, musculatura, tecidos conjuntivos e epiteliais, tecido nervoso, etc), as proteínas desempenham várias funções imprescindíveis ao bom funcionamento do organismo, tais como: hormônios, anticorpos, ativação dos ácidos

graxos (ACP), transporte de nutrientes e metabólitos, através de membranas biológicas, nos diversos fluidos fisiológicos (SGARBIERI, 1987a; ETTINGER, 2005).

A proteína foi o primeiro nutriente considerado essencial para o organismo, sendo formada por combinações dos 20 aminoácidos em diversas proporções (TIRAPEGUI; CASTRO; ROSSI, 2005; TIRAPEGUI; ROGERO; LAJOLO, 2008). Portanto o valor nutritivo da proteína depende de sua composição percentual de aminoácidos (DE ANGELIS; TIRAPEGUI, 1997).

As melhores fontes protéicas são as de origem animal, no entanto, ingestão de misturas de cereais e leguminosas fornece também quantidades de aminoácidos necessárias para a síntese proteica (TIRAPEGUI; ROGERO; LAJOLO, 2008).

Estudos isotópicos sugerem que muitas proteínas da dieta, incluindo caseína e glúten, são digeridas em geral com uma eficiência maior que 90% (EVANGELISTA, 2005).

A qualidade nutricional de uma proteína pode ser avaliada por diferentes procedimentos *in vivo* ou *in vitro*, e reflete a capacidade desta em fornecer aminoácidos essenciais nas quantidades necessárias ao crescimento e à manutenção. Alguns alimentos contêm altos teores de proteína, enquanto outros contêm baixos teores. O fato de um alimento específico ser uma fonte rica de proteínas não implica que seja suficiente para sustentar o crescimento ou a manutenção do organismo (CARDOSO, 2006; TIRAPEGUI; CASTRO; ROSSI, 2005; TIRAPEGUI, ROGERO; LAJOLO, 2008).

Na avaliação da qualidade nutricional de proteínas não se deve considerar apenas sua composição de aminoácidos essenciais, mas principalmente a capacidade de utilização desses pelo organismo, cuja eficiência dependerá de vários outros fatores envolvidos no processamento do alimento proteico (TIRAPEGUI; CASTRO; ROSSI, 2005).

O valor nutritivo de uma proteína irá depender dos seguintes aspectos: composição, digestibilidade, biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais, ausência de toxidade e/ou propriedades antinutricionais (SGARBIERI, 1996).

A deficiência aguda de proteína causa um desequilíbrio geral da homeostase, dos processos metabólicos e de defesa do organismo. O equilíbrio imunológico (reações antígeno/anticorpo) fica inteiramente alterado (SGARBIERI, 1987a).

A desnutrição proteico-energético (PEM) é um termo que descreve uma classe de distúrbios clínicos que resultam de várias combinações e graus de

deficiência de proteínas e energia, normalmente acompanhadas por lesões adicionais fisiológicas e ambientais e estresse. As principais formas de PEM são marasmo, kwashiorkor e kwashiorkor marásmico (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998).

O marasmo é uma carência global de proteínas e calorias de maneira mais ou menos balanceada. Caracteriza-se por um atraso ou paralisação de crescimento, acompanhado de perdas progressivas da musculatura e das reservas lipídicas, podendo atingir estados alarmantes de magreza (SGARVIERI, 1987a).

O Kwashiorkor é caracterizado pela deficiência protéica, que leva a hipoalbuminemia, edema de corrosão e aumento de fígado gorduroso. A gordura subcutânea é normalmente preservada, mas a perda muscular é freqüentemente mascarada por edema. O kwashiorkor marásmico é caracterizado pela deficiência tanto de proteína quanto de energia, combina os sintomas de ambos os estados de deficiência, a perda de gordura subcutânea se torna muito aparente quando o edema é reduzido nos primeiros estágios do tratamento (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998).

A hipovitaminose A pode se instalar em decorrência do Kwashiorkor, uma vez que as enzimas do metabolismo e do transporte dessa vitamina não se formam adequadamente. A hepatomegalia e a esteatose hepática são também observados no Kwashiorkor (WAIZTBERG; LOGULLO, 2006).

2.5 MINERAIS

Os minerais são elementos com funções orgânicas essenciais que atuam tanto na forma iônica quanto constituintes de compostos (enzimas, hormônios e proteínas do tecido orgânico); além de serem nutrientes vitais, que compõe cerca de 4% do peso corporal (WIEGERT; CALIXTO-LIMA; COSTA, 2012).

Os minerais atuam regulando o metabolismo enzimático, mantêm o equilíbrio ácido básico e a pressão osmótica; facilitam a transferência de compostos pelas membranas celulares e compõem tecidos orgânicos. Têm funções sinérgicas entre si, visto que o excesso ou deficiência de um interfere no metabolismo de outro (BORGES *et al.*, 2006).

Ferreira e Falesi (1989) verificaram os teores de nutrientes nas sementes, na casca e na placenta de seleções de urucuzeiro (Verdinha, Wagner, Branca, Jari e Pastelão) e chegaram à conclusão que na semente do urucum os teores de

nutrientes superaram os da casca. A média dos teores encontrados na semente pelos autores nas 5 seleções de urucuzeiro foram fósforo 3,74 mg/g, potássio 19,2 mg/g, cálcio 1,82 mg/g, magnésio 2,22 mg/g, zinco 0,0354 mg/g, cobre 0,0046 mg/g, ferro 0,085 mg/g e manganês 0,023 mg/g.

Vieira, Cabral e De Paula (1999) encontraram os seguintes valores de minerais na soja (*Glycine max* L. Merrill) cultivar EMBRAPA: manganês, 2,79mg/g; potássio, 15,67mg/g; sódio, 11,99mg/g; cálcio, 313,93mg/g e ferro, 13,39mg/g.

2.5.1 CÁLCIO (Ca)

O cálcio, mineral mais abundante no organismo, constitui cerca de 1,5 a 2% do peso corporal e 39% dos minerais do corpo humano. Aproximadamente 99% do cálcio estão nos ossos e dentes (ANDERSON, 2005). O cálcio possui grande importância no desenvolvimento, na manutenção e na integridade dos ossos, (KASS-WOLFF, 2004). O 1% restante do cálcio está no sangue e nos fluidos extracelulares e dentro das células de todos os tecidos, o qual regula muitas funções metabólicas importantes (ANDERSON, 2005; KASS-WOLFF, 2004).

É um mineral importante nos processos de coagulação sanguínea, excitabilidade neuromuscular e transmissão dos impulsos nervosos, contração muscular, mineralização de ossos e dentes, ativação enzimática e secreção hormonal, responsável pelo transporte de vitamina B₁₂ pelo trato gastrintestinal, essencial à manutenção e a função das células da membrana (BORGES *et al.*, 2006).

A deficiência desse mineral pode estar presente em algumas situações clínicas: diabetes, síndrome do intestino curto, *by-pass* jejunoileal, gastrectomias, doença hepática ou renal hipertireoidismo; na deficiência de vitamina D, na terapia com diuréticos; na menopausa; na ingestão de álcool por diminuição da absorção (BORGES *et al.*, 2006).

As hortaliças de folhas verdes escuras, como couve, folhas de mostarda e brócolis; sardinhas, salmão enlatado, moluscos e ostras; sementes, cereais, nozes e batata, ou a combinação desses alimentos são boas fontes de cálcio (ANDERSON, 2005; MILLER; JARVIS; MCBEAN, 2001). A soja também contém grandes quantidades de cálcio. O ácido oxálico limita a disponibilidade desse mineral no

espinafre, acelga e folhas de beterraba. O *tofu* preparado pela precipitação de cálcio também é uma fonte de cálcio (ANDERSON, 2005).

Segundo a Empresa de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA) citado por Anselmo (2008), a cada 100g de semente de urucum tem 7 mg de cálcio.

2.5.2 MAGNÉSIO (Mg)

A maior parte do magnésio do corpo dos animais está associada com o esqueleto. Uma pequena parte aparece dissolvida nos fluidos extracelulares, podendo ser facilmente absorvido na superfície dos ossos (SGARBIERI, 1987b; NONINO-BORGES; BORGES, 2008). A ingestão inadequada e a absorção prejudicada de magnésio podem contribuir para várias patologias em seres humanos como a hipertensão, arteriosclerose, edemas e doenças cardíacas.

O magnésio é indispensável para a respiração celular, especialmente para a fosforilação oxidativa que conduz à formação de adenosina trifosfato (ATP) (SGARBIERI, 1987a). Importante também na ativação de sistemas enzimáticos que controlam o metabolismo dos carboidratos, gorduras, eletrólitos, síntese proteica, integridade e transporte na membrana celular, mediador das contrações musculares e transmissões de impulsos nervosos (BORGES *et al.*, 2006).

A deficiência desse mineral poderá ser causada por doenças como: infecções renais, alcoolismo crônico, má nutrição, síndrome tetânica do recém-nascido, hiperparatireoidismo, cirrose hepática ou diurese provocada por drogas (SGARBIERI, 1987). Essa deficiência causa alteração na função cognitiva, cefaléia, parestesia, glossite, sensação de queimação na língua, cáries, taquicardia, redução da função leucocitária, fadiga, anemia hipocrômica e microcítica (BORGES *et al.*, 2006); tremores, espasmos musculares, mudanças de personalidade, anorexia, náusea e vômito. A tetania, movimentos abruptos, convulsões e coma também foram relatados em indivíduos com deficiência de magnésio (ANDERSON, 2005); hipertensão, arteriosclerose, edemas e doenças cardíacas (SABATIER *et al.*, 2002; GONG *et al.*, 2003).

O magnésio está amplamente distribuído nas fontes alimentares vegetais e animais, porém em diferentes concentrações (MAFRA; COZZOLINO, 2005) e a dieta comum deve fornecer normalmente quantidades adequadas. Boas fontes são as sementes, nozes, leguminosas e cereais integrais moídos, assim como hortaliças de

folhas verde-escuras porque o magnésio é um constituinte essencial da clorofila. O leite é uma boa fonte de magnésio, especialmente porque, ao lado de outros laticínios, é amplamente consumido. O magnésio é perdido durante o refinamento do cereal de trigo e o processamento de alimentos, como o açúcar e, não é geralmente repostado como parte do enriquecimento de cereais (ANDERSON, 2005).

Segundo Ferreira e Falesi (1989), o farelo da semente do urucum possui 2,22mg/g de magnésio.

2.5.3 FERRO (Fe)

O ferro é o componente essencial de enzimas: hemoglobina, mioglobina e desidrogenases do músculo esquelético, metaloenzimas teciduais de funções respiratórias, oxiativas e de fosforilação, responsáveis na neutralização de radicais tóxicos. É importante para o metabolismo aeróbico (transporte de elétrons para os citocromos) (BORGES *et al.*, 2006) e na síntese de DNA (EISENSTEIN; ROSS, 2003). É um mineral essencial para o crescimento e desenvolvimento do organismo (FREITAS; MENEHINI, 2001).

A sua deficiência causa alteração da função cognitiva, cefaleia, parestesia, glossite, sensação de queimação na língua, cáries, taquicardia, redução da função leucocitária, fadiga, anemia hipocrômica, microcítica (BORGES *et al.*, 2006).

A anemia por deficiência de ferro ainda é comum no século XXI, apesar da ampla disponibilidade de alimentos ricos em ferro (ANDERSON, 2005). Resulta de uma série de fatores biológicos (doenças genéticas, infecções, deficiência de outros nutrientes), sociais, econômicos e culturais (ALMEIDA *et al.*, 2004).

De longe, a melhor fonte de ferro da dieta é o fígado, seguido por frutos do mar (ostras e peixes), rim, coração, carne bovina magra e aves. Os feijões secos e hortaliças são as melhores fontes vegetais. Alguns outros alimentos fontes de ferro são frutas secas, melão escuro, pães de grão integral e os enriquecidos, vinhos e cereais (ANDERSON, 2005).

Na semente do urucum, segundo a EMEPA citado por Anselmo *et al.* (2008), a cada 100g de semente do urucum tem 0,8mg de ferro.

2.5.4 ZINCO (Zn)

O zinco é essencial para mobilização hepática da vitamina A; componente de metaloenzimas, estabilizador de polisomos durante a síntese proteica e de membranas para circulação de elementos celulares; exerce funções fisiológicas específicas: atuando em crescimento e replicação celular; maturação sexual, fertilidade e reprodução; função fagocitária, imunitária, celular e humoral; paladar e apetite (BORGES *et al.*, 2006; VALLUE; FALCHUK, 1993; MACDONALD, 2000).

A deficiência de zinco provoca alterações de comportamento, apetite; diminuição do paladar; hipogonadismo, hipospermia e retardamento do crescimento e da maturação sexual; deficiências de imunidade; intolerância à glicose; alopecia, lesões de pele, alergia cutânea; redução da lipoproteína de alta densidade (HDL-C); anorexia; defeito no crescimento fetal; intolerância à glicose; restrição da utilização da vitamina A; desordens de comportamento/aprendizado/memória; diarreia; danos neuropsicológicos; cicatrização lenta; dermatite; lesões oculares (BORGES *et al.*, 2006; DÍAS-GÓMEZ *et al.*, 2003; HAMBIDGE, 2000; MAFRA; COZZOLINO, 2004).

O zinco está presente em uma variedade de alimentos, porém, é encontrado em altas concentrações em alimentos de origem animal, particularmente nos órgãos e/ou carne bovina, suína, avícolas, peixes e moluscos e em quantidades menores em ovos e produtos derivados do leite (HOTS; BROWN, 2004). As ostras e outros mariscos, fígado, cereais de grãos integrais, feijões secos e nozes são boas fontes de zinco. Em geral, a ingestão de zinco correlaciona-se bem com a ingestão de proteína (ANDERSON, 2005).

O teor de zinco encontrado por Ferreira e Falesi (1989) no farelo da semente do urucum foi de 0,0354mg/g.

2.5.5 MANGANÊS (Mn)

O manganês é essencial para o metabolismo do colesterol, crescimento corpóreo e reprodução; co-fator de metaloenzimas: superóxido dismutase e piruvato carboxilase; importante para a síntese e ativação de protrombina na presença de vitamina K, e das enzimas glicosiltransferases; participa da síntese de mucopolissacarídeos, intervindo indiretamente na condrogênese e osteogênese (BORGES *et al.*, 2006).

Os sintomas de deficiência são: perda de peso, dermatite temporária e, ocasionalmente, náusea e vômito, alteração na cor do cabelo e crescimento lento de cabelo e pelos (ANDERSON, 2005); modificações nas estruturas celulares: deformações específicas do esqueleto (BORGES *et al.*, 2006).

As fontes de manganês são os grãos integrais, leguminosas, nozes e chá. Os tecidos animais, frutos do mar e laticínios não são boas fontes. Quantidades relativamente altas ocorrem no café e chá instantâneos (BORGES *et al.*, 2006).

Ferreira e Falesi (1989), encontraram 0,23mg/g de manganês no farelo da semente do urucum. Já Vieira *et al.* (1999) encontram, para o mesmo mineral, na soja cultivar EMBRAPA 2,79mg/g.

2.5.6 SÓDIO (Na)

O sódio é o principal cátion do fluido extracelular, água e substâncias dissolvidas nos espaços fora das células. Como íon predominante do fluido extracelular, o sódio regula o seu volume e o volume do plasma sanguíneo, e também auxilia na condução de impulsos nervosos e no controle da contração muscular. As causas de deficiência aguda são: letargia, fraqueza, progredindo rapidamente para convulsões e morte. As causas menos agudas são anorexia, diarreia, oligúria, hipotensão e fadiga (BORGES *et al.*, 2006).

A principal fonte de sódio é o cloreto de sódio ou sal de mesa comum, do qual o sódio constitui 40% em peso. Os alimentos de origem proteica geralmente contêm mais sódio de ocorrência natural do que os vegetais e grãos, enquanto as frutas contêm pouco ou nenhum sódio. A adição de sal comum, sais aromatizados, intensificadores de paladar e conservantes durante o processamento alimentar é responsável pelo alto teor de sódio da maioria dos produtos de conveniência e *fast food* (BORGES *et al.*, 2006).

Vieira, Cabral e De Paula (1999) encontraram na soja cultivar EMBRAPA, 11,99mg/g de sódio.

2.5.7 COBRE (Cu)

O cobre é um componente de muitas enzimas e as manifestações clínicas da deficiência de cobre são atribuíveis a falhas enzimáticas (ANDERSON, 2005). O

cobre participa na hematopoiese, formação da mielina, síntese do pigmento melanina, síntese de tecido conjuntivo, mineralização do esqueleto, participação no sistema imunológico (KAIDO *et al.*, 2005), crescimento infantil, força óssea, maturação de glóbulos vermelhos e brancos, transporte de ferro e no desenvolvimento cerebral (OLIVARES; UAUY, 2005).

A importância do cobre na nutrição dos mamíferos foi estabelecida desde a descoberta, em 1982, de que o cobre juntamente com o ferro é requerido para prevenir a anemia em animais mantidos em leite de vaca como única fonte de nutrientes (SGARBIERI, 1987a).

A deficiência de cobre é caracterizada por anemia, neutropenia e anormalidades esqueléticas, especialmente desmineralização. Outras alterações também podem ocorrer inclusive hemorragias subperiosteais, despigmentação do cabelo e pele e formação de elastina defeituosa. A falha de eritropoiese, assim como a degeneração cerebral e cerebelar, pode levar à morte (ANDERSON, 2005).

O cobre é um elemento traço essencial distribuído extensamente nos alimentos (NAGANO *et al.*, 2005). Os alimentos ricos em cobre são mariscos (ostras), vísceras (fígado, rim), carnes de músculos, chocolate, nozes, grãos de cereais, leguminosas secas e frutas secas (ANDERSON, 2005).

O valor de cobre encontrado por Ferreira e Falesi (1989) na semente do urucum foi 0,0046 mg/g.

2.5.8 POTÁSSIO (K)

O potássio, principal cátion do fluido intracelular, está presente em pequenas quantidades no fluido extracelular. Juntamente com o sódio, o potássio está envolvido na manutenção do equilíbrio hídrico normal, equilíbrio osmótico e o equilíbrio ácido-base. Juntamente com o cálcio, ele é importante na regulação da atividade neuromuscular. O potássio também promove o crescimento celular. O conteúdo de potássio no músculo está relacionado à massa muscular e armazenamento de glicogênio; portanto, se o músculo está sendo formado, um suprimento adequado de potássio é essencial (BORGES *et al.*, 2006).

A deficiência de potássio acarreta na diminuição dos reflexos, paralisia, parestesia, confusão mental, vômitos, distensão peritoneal, polidipsia, arritmia

cardíaca, diminui a respiração, dispneia, diminui a filtração glomerular, dores musculares e hipotensão (BORGES *et al.*, 2006).

Em geral, frutas, hortaliças, carne fresca e produtos de laticínio são boas fontes de potássio (BORGES *et al.*, 2006).

Ferreira e Falesi (1989) determinaram potássio no farelo da semente do urucum e encontraram o valor de 19,2mg/g. Vieira, Cabral e De Paula (1999) obtiveram 15,67mg/g para o mesmo mineral, na soja cultivar EMBRAPA.

2.6 SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS

A solubilidade de proteínas é a propriedade funcional que deriva da interação proteína-água. Em geral, é a primeira propriedade investigada na avaliação de suas propriedades funcionais, por isso, é um indicador importante do potencial de utilização funcional de proteínas, em especial na formação e estabilidade de emulsão e espuma, na formação de gel, na capacidade de absorção e ligação de água e no aumento de viscosidade (LOURENÇO, 2000).

A solubilidade de uma proteína é afetada por fatores como massa molar e conformação das moléculas; densidade e distribuição das cargas elétricas, que é influenciada pelo pH; natureza e concentração de íons ou força iônica; polaridade do solvente, temperatura e condições de processamento (IGUTI, 2007; ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Em geral, a solubilidade funcional da proteína é influenciada pela maior ou menor afinidade das moléculas de proteína com o solvente, que no caso de alimentos é a água. Em razão disso, a solubilidade é classificada como sendo uma propriedade hidrofílica (SGARBIERI, 1996b).

O pH de menor solubilidade é denominado ponto isoelétrico (PI), que possui igual número de cargas positivas e cargas negativas (carga igual à zero), apresentando máxima interação eletrostática entre os grupos carregados e interação mínima com a água ocorrendo agregação e precipitação (LOURENÇO, 2000; MARZZOCO; TORRES, 2007; IGUTI, 2007).

A solubilidade das proteínas é um importante fator para otimização de suas propriedades funcionais. Um produto mais solúvel é também mais fácil de ser utilizado na formulação de certos alimentos (WOLF; COWAN, 1971).

2.7 ENSAIO BIOLÓGICO

O ensaio biológico segundo Sgarbieri (1987b) é um método biológico para avaliação das propriedades nutritivas dos alimentos, de uma dieta ou de um nutriente específico a ser determinado nesse alimento. Avalia parâmetros como variação de peso, crescimento, aspecto e atividade física, determinações feitas nas fezes, urina e no sangue de animais de experimento (CHAMPE; HARVEY, 2009).

Para o uso desses animais, de acordo com comitê de ética e pesquisa, é para garantir o melhor tratamento possível aos animais, evitando que sintam dor e que sejam maltratados (SGARBIERI, 1987b). Devem ser preparadas dietas específicas para cada tipo de experimento, pois segundo Reeves, Nielsen e Fahey Junior (1993) estes podem ser avaliados com rações para crescimento, manutenção e lactação, conhecendo o efeito que terá em cada fase.

A vantagem dos métodos biológicos é que se determina a biodisponibilidade dos nutrientes diretamente para a espécie usada no teste de alimentação. As simples verificações do valor nutricional de uma dieta para humanos normalmente são feitas com animais experimentais em laboratório, pela maior facilidade e economicidade dos experimentos com animais em condições de laboratório (SGARBIERI, 1987b).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a qualidade nutricional do farelo do resíduo da semente de Urucum (*Bixa orellana L.*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição centesimal do farelo da semente de urucum.
- Avaliar os teores de minerais: cobre, potássio, sódio, zinco, manganês, cálcio, magnésio e ferro.
- Determinar os fatores antinutricionais: taninos, ácido fítico e inibidores de proteases (lectina e inibidores de tripsina).
- Extrair a proteína do farelo da semente de urucum e obter o isolado proteico.
- Determinar a composição de aminoácidos do isolado proteico e o escore químico dos aminoácidos da semente de urucum.
- Realizar ensaio biológico para avaliação da qualidade da proteína da semente de urucum.
- Determinar os níveis de glicose, colesterol total, creatinina, triglicerídeos, lipoproteína de muito baixa densidade - VLDL, alanina aminotransferase/transaminase glutâmico pirúvica - ALT/TGP, aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico oxalacético - AST/TGO no sangue dos animais ao final do ensaio biológico.
- Avaliar a qualidade da proteína do farelo do urucum determinando os índices de Digestibilidade Verdadeira (DV), Taxa de Eficiência Proteica (PER), Valor Biológico (VB), Balanço Nitrogenado (BN) e Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA).
- Observar possível toxicidade do farelo do resíduo do urucum e do isolado proteico.

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAL

O resíduo da semente de urucum estudado foi obtido através de doação, junto à indústria alimentícia CHR HANSEN, no município de Valinhos, São Paulo. Este resíduo foi oriundo das sementes de urucum (*Bixa orellana* L., variedade Piave) submetidas ao processo de extração dos carotenoides, segundo o fluxograma, fornecido pela indústria, ilustrado na figura 6.

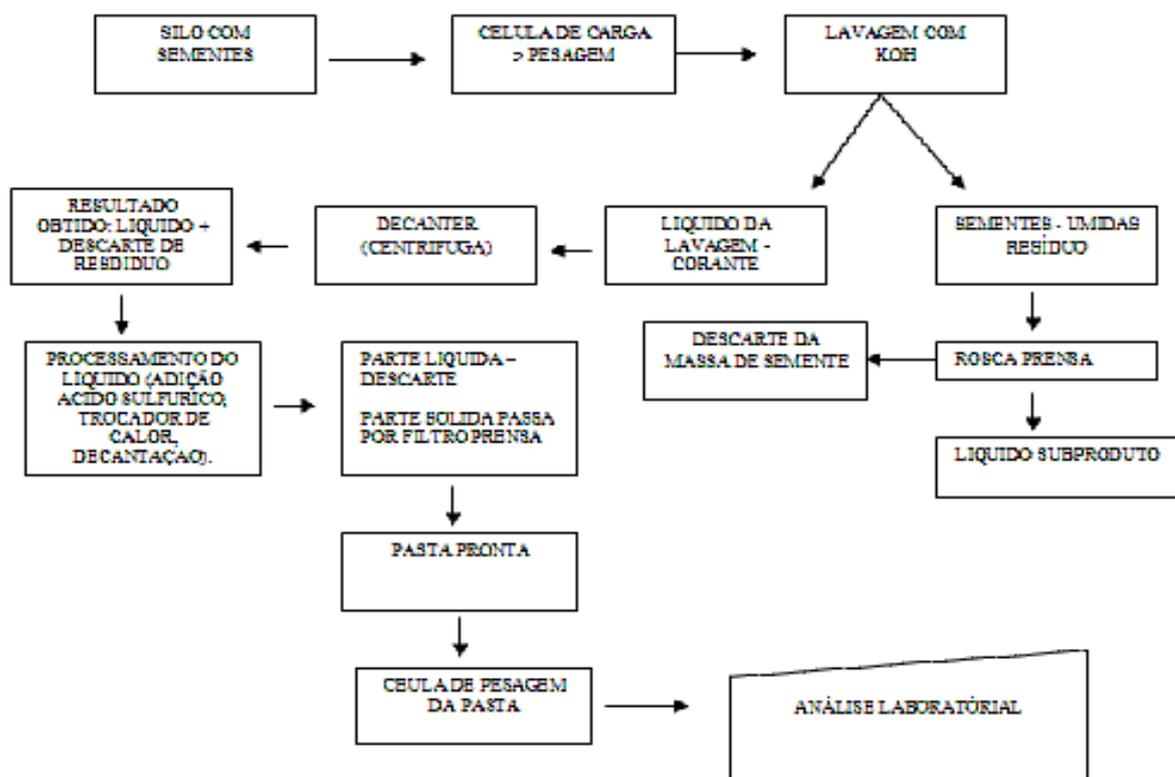


Figura 5 – Extração dos carotenóides das sementes de urucum.

Fonte: Chr. Hansen

4.2 MÉTODOS

4.2.1 OBTENÇÃO DO FARELO DO RESÍDUO

O resíduo da semente do urucum úmido e com impurezas (pedaços de galhos do urucuzeiro) foi embalado em sacos plásticos e transportado, refrigerado, via correio, em caixa térmica. No laboratório de físico-química da Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública (UTASP) da UFMS foi submetido à secagem por 24 horas em estufa com circulação forçada de ar, em temperatura de 50°C. Em seguida, no laboratório de sementes da Embrapa Gado de Corte - MS, foi peneirado em peneiras 10mm para a retirada das impurezas maiores (o resíduo e as impurezas não ficaram retidas) e 1,4mm para impurezas mais finas. Depois de peneirado, foi colocado no separador de sementes (*Seed Blower*, modelo “757 South Dakota”, marca Seedburo – Empresa *Seedburo Equipament Company*, abertura 70) para a retirada das impurezas mais leves, como ilustrado nas figuras 7 e 8. As impurezas remanescentes foram retiradas manualmente. As sementes limpas foram trituradas e peneiradas em tamis malha nº 20 e 28 para a obtenção do farelo.



Figura 6 – Resíduo da semente de urucum (*Bixa orellana* L.)
Foto: Melissa Alessandra Valério.



Figura 7 – Laboratório de Sementes da EMBRAPA, primeira Limpeza do resíduo da semente do urucum.

Fotos: Melissa Alessandra Valério

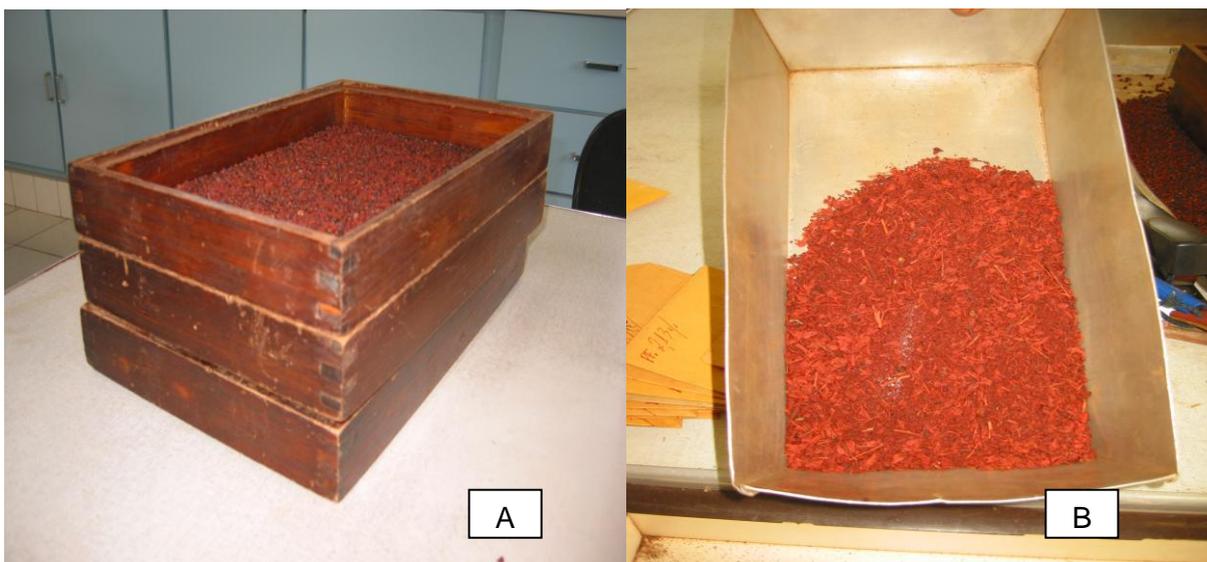


Figura 8 – Laboratório de sementes da EMBRAPA, segunda limpeza do resíduo da semente do urucum para retirar sujidades em tamis – A; Sujidades – B.

Fotos: Melissa Alessandra Valério

4.2.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO FARELO DO RESÍDUO DA SEMENTE DO URUCUM

4.2.2.1 UMIDADE

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005a).

Foram pesados 5g da amostra em cápsula de porcelana, previamente tarada, sendo em seguida, aquecida em estufa a 105°C. A primeira pesagem foi feita após 3 horas, com esfriamento prévio em dessecador por 30 minutos. A operação de pesagem foi repetida até peso constante.

4.2.2.2 CINZAS OU RESÍDUO MINERAL FIXO

Para determinar as cinzas, foi utilizado o método gravimétrico segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005a).

Foram pesados 5g da amostra em cadinho de porcelana, previamente aquecido em mufla e tarado. A amostra pesada foi carbonizada totalmente em bico de Bunsen e levada à mufla (550°C) até destruição de toda a matéria orgânica. A incineração foi completada quando a cinza mostrou cor uniforme e sem presença de pontos de carvão. O cadinho com as cinzas foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado.

4.2.2.3 LIPÍDEOS

Os lipídeos foram determinados pelo método de extração direta com solvente éter de petróleo, em aparelho de Soxhlet segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005a).

Cerca de 7g do material foram transferidos quantitativamente para o cartucho, realizando-se a extração em aparelho de Soxhlet com éter de petróleo por 6 horas. O resíduo obtido, após a evaporação do solvente, foi colocado em estufa a 105°C e em seguida, resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado, repetindo-se este procedimento até peso constante.

4.2.2.4 PROTEÍNAS

As proteínas foram determinadas através do conteúdo de nitrogênio total (%), segundo o método de micro-kjeldahl, usando-se o fator 6,25 para a conversão do nitrogênio em proteínas, conforme descrito na *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1992).

Utilizou-se amostra de 50-100mg, a qual foi digerida juntamente com a mistura catalítica e H₂SO₄ concentrado. A destilação foi realizada em destilador marca TECNAL TE 036/1. O nitrogênio total do destilado foi quantificado por titulação com ácido clorídrico 0,02M.

4.2.2.5 CARBOIDRATOS

Os carboidratos foram avaliados através do método de Lane-Eynon, utilizando soluções de Fehling, de acordo com metodologias descritas nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005a). Os açúcares foram avaliados quantitativamente e os resultados apresentados em porcentagem de sacarose e de amido.

4.2.2.6 FIBRAS

O teor de fibras foi determinado pelo método Detergente Neutro descrito nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005a). Pesou-se 0,5g da amostra e adicionou-se 15mL de NaOH 0,5N, por 15 minutos, sob agitação à temperatura de 37°C. A solução foi neutralizada com 15mL de ácido acético 0,5N. Foi feito o tratamento enzimático através da adição de 1mL de amiloglicosidase (solução - 2,5% em tampão acetato 0,2M, pH 4,8), sob agitação por 1 hora à temperatura de 37°C. Adicionou-se 100mL de solução detergente neutro e deixou-se em ebulição durante 1 hora. A solução foi filtrada, sob vácuo (em cadinho previamente tarado), e o resíduo, lavado com água quente e acetona, secado em estufa à 105°C e pesado (até peso constante).

4.2.2.7 VALOR CALÓRICO TOTAL (VCT)

O valor calórico total foi calculado utilizando-se os seguintes fatores de conversão: carboidratos, 4 kcal/g; proteínas, 4 kcal/g; gorduras, 9 kcal/g (BRASIL, 2003) - conforme a equação 1.

EQUAÇÃO 1:

$$\text{VCT} = (\text{lipídio} \times 9) + (\text{proteína} \times 4) + (\text{carboidrato} \times 4) = \text{ kcal/100g}$$

4.2.3 MINERAIS

Pesou-se 1g da amostra em tubo de digestão, adicionando-se em seguida 4 mL de solução de ácido nítrico e ácido perclórico 2:1 ($\text{NHO}_3:\text{HClO}_4$) e pérolas de vidro. Este material foi mantido em repouso durante a noite. A digestão foi realizada em bloco digestor, aumentando-se a temperatura, gradativamente, até 100°C, durante 45 minutos. Depois de resfriado, adicionou-se 2mL da mistura $\text{NHO}_3:\text{HClO}_4$ (2:1). A amostra foi digerida novamente em temperatura com elevação gradativa de 15°C, a cada 20 minutos, até 200°C, por aproximadamente 1 hora, até clarear a mistura. Após o resfriamento, foram adicionados 15mL de água destilada, fazendo-se aquecimento em bico de Bunsen na capela. O material, resfriado, teve seu volume elevado para 50mL com água destilada; constituindo-se no extrato utilizado para avaliação dos diferentes minerais (MORAES; RABELO, 1986; SALINAS; GARCIA; GARCÍA, 1985). As determinações dos minerais foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Água (LAQUA) do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Para a determinação da concentração de cobre, zinco, manganês, cálcio, ferro e magnésio utilizou-se espectrofotômetro de absorção atômica Varian (mod. SpectrAA 220FS), gás acetileno e ar sintético; sendo que, para o cálcio, utilizou-se o gás acetileno e Óxido nitroso. Empregou-se fotômetro de chama Varian (mod. SpectrAA 220FS) para determinação de sódio (589nm). A quantificação foi feita através de curva padrão de cada mineral (VARIAN, 1989).

4.2.4 COMPOSIÇÃO E ESCORE QUÍMICO DE AMINOÁCIDOS

As proteínas do farelo do resíduo da semente do urucum foram extraídas com 15 mL de cloreto de sódio a 4%, durante 1 hora, de acordo com Macedo e Damico (2000). As análises de aminoácidos foram realizadas de acordo com a metodologia de Henrikson e Meredith (1984), utilizando-se analisador de aminoácidos Pico-Tag (Waters system). A hidrólise proteica foi realizada com HCl 6M/fenol 1%, a 106°C por 24 horas, cujo hidrolisado reagiu com 20µL de solução de derivatização recentemente preparada (metanol: trietilamina: água: fenilisotiocianato, 7:1:1:1, v/v) por 1h em temperatura ambiente. Após derivatização, os aminoácidos foram identificados em coluna HPLC de fase reversa comparando-se os tempos de retenção dos aminoácidos da amostra com os dos padrões (Pierce). Resíduos de cisteína foram quantificados como ácido cistéico com os essenciais segundo Henley e Kuster (1994). As análises foram realizadas no laboratório de química de proteínas da Universidade de Campinas – UNICAMP.

O escore químico compara a composição de aminoácidos (aa) de uma proteína ou dieta com a de uma proteína específica de referência, geralmente a da albumina do ovo, considerada de alta qualidade. A determinação do escore químico envolve dois passos, inicialmente, o escore é calculado para cada aminoácido essencial ou indispensável (equação 2). Em seguida, os escores dos aminoácidos essenciais são comparados e, o menor deles é selecionado como aminoácido limitante, cujo valor percentual define o escore da proteína (WAITZBERG; LOGULLO, 2006).

EQUAÇÃO 2:

$$\text{Escore Químico} = \frac{\text{conteúdo do aa essencial em dieta-teste}}{\text{conteúdo do aa em dieta padrão (FAO/WHO 2007)}}$$

4.2.5 DETERMINAÇÃO DOS FATORES ANTINUTRICIONAIS

4.2.5.1 TANINOS

Os taninos foram determinados segundo a metodologia descrita nos métodos oficiais da *Association of Official Analytical Chemists* (1984).

Foram pesados 2 g da amostra em béquer de 250mL e adicionados 150mL de água destilada, levando-se à ebulição por 2 horas na chapa aquecedora. Após o resfriamento diluiu-se em um balão volumétrico de 200mL, filtrado e 10 mL da solução diluída foram transferidos para um erlenmeyer de 500 mL. Foram adicionados 8mL de solução de índigo de carmim e 300mL de água destilada. Esta solução foi titulada, com permanganato de potássio 0,0084M, até a mudança da cor azul para verde e, em seguida, para amarelo ouro. Titulou-se, semelhantemente, uma mistura de 9mL de índigo de carmim e 300 mL de água destilada considerada como branco.

A equação usada para quantificar os taninos na amostra foi $[(V_a - V_b) \times 6,23 \times 100] / (10 \times m)$, onde “ V_a ” é o volume gasto de permanganato de potássio utilizado na titulação da amostra do branco; “ V_b ” é o volume gasto de permanganato de potássio utilizado na titulação da amostra e “ m ” a massa da amostra em gramas. O resultado foi expresso em miligramas de tanino/100g amostra.

4.2.5.2 ÁCIDO FÍTICO

O teor de ácido fítico foi analisado segundo o método descrito por Latta e Eskin (1980), com algumas alterações.

Pesou-se 1g da amostra em erlenmeyer de 125mL. A esta amostra foram adicionados 20mL de HCl 2,4%. A mistura foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 1 hora em agitador magnético. Após a extração, a amostra foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com HCl 2,4%. A solução foi filtrada e transferida para tubos de centrífuga e, centrifugados por 30 minutos. Foi transferido 1mL do sobrenadante do extrato para balão volumétrico de 25mL e completado com água destilada.

Preparou-se previamente uma coluna de vidro preenchida com 1,5g de resina AG® 1-X8 200-400 mesh chloride form (Bio Rad), sendo que no início e final da

coluna foi colocada uma pequena quantidade de lã de vidro. A coluna foi equilibrada passando 25mL de NaCl 0,7M e, em seguida, cerca de 30mL de água destilada até o eluato não apresentar mais NaCl o qual foi testado com AgNO_3 e cromato de potássio.

Em seguida, foram transferidos 10mL do extrato pela coluna o qual foi eluído com 15mL de água destilada, 15mL de NaCl 0,1M e, por último, 15mL de NaCl 0,7M. Apenas este último eluente foi recolhido em balão volumétrico de 25mL, sendo o volume completado com NaCl 0,7M. Transferiu-se, volumetricamente, uma alíquota de 3mL para um tubo de centrífuga de 15mL, adicionando-se 1mL de reativo de Wade (0,03% de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,3% de ácido sulfossalicílico, em água destilada). O tubo foi agitado por 5 segundos e centrifugado por 10 minutos. O sobrenadante separado teve a intensidade de coloração medida através da absorbância empregando-se espectrofotômetro ajustado em 500nm com água destilada como branco.

A concentração de ácido fítico na amostra foi determinada através da equação da reta obtida a partir dos dados da curva de calibração do ácido fítico (padrão), considerando as diluições realizadas. O resultado foi expresso em mg de ácido fítico/100g de amostra.

A curva de calibração foi construída com soluções em concentrações de 0 a $70\mu\text{g}$ de ácido fítico/mL, utilizando-se solução estoque de ácido fítico 50% w/w. Para isso, pesou-se 1g de ácido fítico, diluiu-se para 100mL em balão volumétrico (5mg/mL). Foram pipetados 10mL desta solução e diluiu-se novamente para 100mL ($500\mu\text{g/mL}$). A partir desta solução foram preparadas diferentes concentrações de padrão, como mostra a Tabela 1:

Tabela 1 – Concentração da solução de ácido fítico, para o preparo de curva padrão.

BV (50 mL)	Volume solução AF (500µg/mL) mL	Concentração Final AF µg/mL
1	1,0	10
2	2,0	20
3	3,0	30
4	4,0	40
5	5,0	50
6	6,0	60
7	7,0	70

BV= Balão Volumétrico; AF= Ácido Fítico

A partir das soluções do padrão transferiu-se, volumetricamente, 3mL de cada diluição para tubos de centrifuga e acrescentou-se 1mL do reagente de Wade. Como zero de ácido fítico utilizou-se 3mL de água destilada + 1mL do reagente de Wade e agitação por 5 segundos. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos e os sobrenadantes separados. A coloração desenvolvida foi medida através da absorbância empregando espectrofotômetro ajustado em 500nm com água destilada (branco).

Foi elaborado um gráfico utilizando os valores de absorbância (y) em função das concentrações de ácido fítico (x) e, por regressão linear, obteve-se uma equação que melhor representou os pontos experimentais. O coeficiente de correlação linear demonstrou a linearidade segundo a Lei de Beer-Lambert ($r \geq 0,990$).

4.2.5.3 INIBIDORES DE PROTEASES

A atividade inibitória para a tripsina bovina, segundo a metodologia descrita por Erlanger, Kokowsky e Cohen (1961), foi determinada pela medida da atividade hidrolítica residual da mesma para o substrato N-benzoyl-L-arginine-pnitroanilide (BAPNA).

Foi adicionado em cada poço, um volume variável de tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0, seguido de 10 µL de tripsina (0,312 mg/mL) e diferentes concentrações do

inibidor. Após incubação a 37°C por 20 minutos, 100µL de BAPNA a 1mM foram adicionados, completando um volume final de 200 µL/poço. O ensaio durou 30 minutos. Foi utilizado o leitor de microplacas Model 680XR Microplate Reader (Bio Rad) para detectar a mudança na absorbância a 405 nm subtraída a leitura da solução do branco.

A atividade de hemaglutinação foi realizada em microplacas de 96-poços em um volume final de 100µL contendo 50µL de suspensão de eritrócitos humano 2% previamente lavados 3 vezes em uma solução salina, e 50µL de uma série de diluições da solução de urucum. A aglutinação foi determinada depois de 1 hora à 37°C quando a diluição mais alta de urucum foi detectada (WITISUWANNAKUL R; WITISUWANNAKUL C; SAKULBORIRUG, 1998).

4.2.6 OBTENÇÃO DO ISOLADO PROTÉICO

Primeiramente foi determinado o perfil da solubilidade em diferentes valores de pH e, em seguida, obtido o isolado protéico através da exploração do seu ponto isoelétrico (PI).

4.2.6.1 SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA FRENTE AO pH

A solubilidade foi determinada conforme descrito por Glória e Regitano-d'arce (2000), com algumas modificações.

Pesou-se 1g da amostra em erlenmeyer de 125mL e adicionou-se 70mL de água destilada. Este procedimento foi realizado 21 vezes, sendo que em cada erlenmeyer, o pH foi ajustado em 2,0; 2,4; 2,8; 3,0; 3,2; 3,4; 3,6; 3,8; 4,0; 4,2; 4,4; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10; 11 e 12 com HCl ou NaOH 10%. Aguardaram-se 10 minutos e verificou-se o pH novamente. Os erlenmeyers foram agitados por 1 hora – as soluções foram transferidas para balões de 100 mL e o volume completado com água destilada, e em seguida filtrados e centrifugados por 10 minutos. Do sobrenadante de cada solução foram retirados 10 mL com pipeta volumétrica para a determinação de nitrogênio total pelo método microKjeldahl conforme AOAC (1992). Após a determinação de nitrogênio total, verificou-se o ponto isoelétrico (PI) e o pH onde a proteína foi mais solúvel.

4.2.6.2 ISOLADO PROTEÍCO

O isolado proteico foi determinado pela metodologia descrita por Glória e Regitano-d'arce (2000), com algumas modificações.

Foram pesados 500g da amostra e adicionados 2,5L de NaOH 0,2% ajustando o pH da solução para 12. Esta solução foi agitada por 3 horas para extração das proteínas. Em seguida, foi filtrada em meia de nylon fina. O sobrenadante foi armazenado e, no precipitado, foram adicionados 2,5L de NaOH 0,2% para uma nova extração de 3 horas. Essa nova solução foi filtrada novamente. Os dois sobrenadantes foram reunidos e o precipitado descartado.

O pH do sobrenadante foi ajustado novamente, agora para o ponto isoelétrico encontrado, pH 3,8. Após o ajuste, o sobrenadante foi agitado por 1 hora para extração das proteínas nesse pH e verificou-se o pH novamente. O sobrenadante ficou em repouso de um dia para o outro, filtrado a vácuo em funil de Buchner e o precipitado reservado.

Esse processo foi repetido 10 vezes até se extrair a proteína de 5 kg da matéria-prima.

4.2.7 ENSAIO BIOLÓGICO

4.2.7.1 AMOSTRA E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 40 ratos, Wistar, *Rattus norvegicus*, albinos machos com 21 dias de vida, recém-desmamados, pesando 30-50g. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos, com 10 animais, sendo que cada grupo recebeu um tipo de ração. Grupo 1: ração aprotéica; Grupo 2: ração padrão/controle – caseína; Grupo 3: ração teste com o farelo da semente de urucum (Teste 1); Grupo 4: ração teste com o isolado protéico do farelo (Teste 2).

O ensaio biológico foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa (Anexo – Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – CEUA).

4.2.7.2 PROCEDIMENTO

O experimento foi realizado em ambiente limpo e calmo, com temperatura controlada em torno de 25°C e luminosidade adequada, alternando-se períodos de 12 horas em claro e escuro, com duração de 28 dias. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais (figura 9) e tratados com água e alimento por todo o período do experimento. O consumo da ração e o peso dos animais foram monitorados. Com as fezes e urinas dos animais de cada grupo, que foram coletadas durante todo o experimento, foram realizadas as análises para a quantificação de nitrogênio excretado pelo método de Kjeldahl, descrito pela *Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1992)*. A partir destes resultados, foram calculados os índices que forneceram informações sobre a qualidade da proteína do farelo do resíduo da semente do urucum.

Ao término do período experimental os animais sofreram eutanásia em câmara de gás carbônico (CO₂). O experimento foi realizado no biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFMS.



Figura 9 – Gaiolas metabólicas utilizadas no ensaio biológico.
Foto: Melissa Alessandra Valério

4.2.7.3 ELABORAÇÃO DAS RAÇÕES

A qualidade nutricional das proteínas da semente do urucum foi realizada através de ensaio biológico com ratos e foram preparados quatro tipos diferentes de rações:

1. Ração aprotéica (sem adição de proteína na formulação) (Figura 10);
2. Ração padrão/controle – caseína (uso da proteína caseína na formulação) (Figura 10);
3. Ração teste com o farelo da semente de urucum (Figura 11);
4. Ração teste com isolado protéico do farelo (Figura 11).

As rações foram elaboradas de acordo com o procedimento descrito pelo *American Institute of Nutrition* (AIN-G 93) (REEVES; NIELSEN; FAHEY JUNIOR, 1993).

Todos os componentes foram pesados individualmente e em seguida misturados e homogeneizados, com adição de água. Posteriormente, foi realizada a extrusão e a secagem em estufa de circulação de ar a 50°C.

A composição química das rações foi determinada através dos mesmos métodos utilizados na determinação da composição centesimal do farelo da semente de urucum, com a finalidade de confirmar as quantidades pré-estabelecidas de cada nutriente.



Figura 10 – Ração aprotéica (sem adição de caseína) – A e Ração padrão/controle – caseína (uso da proteína caseína) – B

Fotos: Melissa Alessandra Valério



Figura 11 – Ração teste com farelo do urucum (Teste 1) – A e ração teste com isolado proteico do farelo (Teste 2) - B.

Foto: Melissa Alessandra Valério

4.2.8 ÍNDICES DA QUALIDADE BIOLÓGICA PROTÉICA

Para avaliar a qualidade biológica da proteína foram utilizados os seguintes índices de qualidade: Taxa de Eficiência Proteica (PER), Valor Biológico (VB), Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA), Balanço Nitrogenado (BN) e Digestibilidade Verdadeira (DV).

4.2.8.1 TAXA DE EFICIÊNCIA PROTÉICA (PER)

Uma variedade de técnicas tem sido usada para determinar a qualidade de alimentos proteicos e combinações alimentares em estudos com animais de laboratório. O mais simples é a taxa de eficiência protéica (PER), que é igual ao ganho em peso de um animal em crescimento, dividido por sua ingestão de proteína durante o período de estudo (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998; TIRAPEGUI; CASTRO; ROSSI, 2005). Essa taxa pode ser descrita conforme a equação 3.

EQUAÇÃO 3:

$$\text{PER} = \frac{\text{Variação do peso do animal (g)}}{\text{Proteína ingerida pelo animal (g)}}$$

4.2.8.2 VALOR BIOLÓGICO (VB)

O valor biológico (VB) usa técnicas de balanço de nitrogênio para determinar a fração de nitrogênio absorvido e nitrogênio retido no organismo para o crescimento ou manutenção (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998; TIRAPEGUI; CASTRO; ROSSI, 2005). Podendo ser determinado conforme a equação 4.

EQUAÇÃO 4:

$$VB = \frac{\text{Nitrogênio retido}}{\text{Nitrogênio absorvido}}$$

4.2.8.3 COEFICIENTE DA EFICÁCIA ALIMENTAR (CEA)

O coeficiente de eficácia alimentar (CEA) ou índice de eficiência alimentar (IEA) é o ganho de peso médio por animal dividido pelo consumo médio de ração por animal (SOUZA, 2003). Avalia a eficiência com que a dieta promove o ganho de peso corporal, portanto, avalia o alimento como um todo e não só a eficiência e qualidade das proteínas (BORGES *et al.*, 2010; PELLET; YOUNG, 1980; SGARBIERI, 1987a). Podendo ser ilustrado como a equação 5.

EQUAÇÃO 5:

$$CEA = \frac{\text{Variação de peso (g)}}{\text{Quantidade de ração consumida (g)}}$$

4.2.8.4 DIGESTIBILIDADE VERDADEIRA (DV)

A digestibilidade verdadeira (DV), segundo Sgarbieri (1996) e Tirapegui *et al.* (2005), é determinada pela medida do nitrogênio ingerido com a dieta, subtraindo-se

o nitrogênio eliminado nas fezes, encontrando-se a porcentagem da proteína absorvida pelo organismo. Podendo ser resumida na equação 6.

EQUAÇÃO 6:

$$DV = \frac{\text{Nitrogênio ingerido} - \text{Nitrogênio fecal} \times 100}{\text{Nitrogênio ingerido}}$$

4.2.8.5 BALANÇO NITROGENADO (BN)

O balanço nitrogenado (BN) é calculado pela diferença entre a quantidade de nitrogênio ingerido e a soma do nitrogênio excretado nas fezes e na urina (SGARBIERI, 1996). Como mostra a equação 7.

EQUAÇÃO 7:

$$BN = \text{Nitrogênio ingerido} - (\text{Nitrogênio fecal} + \text{Nitrogênio urinário})$$

4.2.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os parâmetros bioquímicos glicose, colesterol total, creatinina, triglicerídeos, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), alanina aminotransferase/transaminase glutâmico pirúvica (ALT/TGP) e aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico oxalacética (AST/TGO) foram analisados no final do período experimental, após jejum de 12h. A coleta do sangue foi realizada a partir do seio orbital após os animais serem anestesiados com Zoletil 50[®] (Virbac). As amostras foram coletadas em tubos heparinizados, centrifugadas e armazenadas a -20 °C.

A glicose, o colesterol total, VLDL, creatinina, ALT/TGP, AST/TGO e triglicerídeos foram determinados por meio de kits específicos para cada amostra e a

leitura realizada em sistema automatizado Cobas Integra[®] 400 plus (Roche), no Laboratório de Bioquímica da Unidade de Farmácia Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. As metodologias utilizadas foram as descritas no manual do equipamento.

A coleta do sangue foi realizada apenas no final do experimento, pois o objetivo principal da pesquisa era a verificação da qualidade da proteína na ração. Considerando que as condições iniciais do experimento eram iguais, para todos os grupos, a coleta do material poderia estressar os animais ocasionando provavelmente uma perda de peso indesejada.

4.2.9.1 GLICOSE

A determinação da glicose envolve um método enzimático onde a hexoquinase (HK) catalisa a fosforilação da glicose pela adenosina-5-trifosfato (ATP), dando origem a glicose-6-fosfato e adenosina difosfato (ADP). Em seguida, uma segunda enzima, a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), é utilizada para catalisar a oxidação de glicose-6-fosfato pela nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺), dando origem ao NADPH.

4.2.9.2 COLESTEROL TOTAL

O método colorimétrico enzimático foi utilizado para a determinação do colesterol total. Os ésteres de colesterol são clivados através da ação do colesterol esterase (CE), produzindo colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol oxidase (CO) catalisa a oxidação do colesterol para colest-4-em-3-ona e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Na presença da peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado afeta o acoplamento oxidativo do fenol e da 4-aminoantipirrina, formando um corante vermelho de quinona-imina.

4.2.9.3 TRIGLICERÍDEOS

A determinação de triglicerídeos baseia-se na utilização de uma lipase lipoproteína (LPL) de microrganismos para hidrólise rápida e completa dos triglicerídeos para glicerol, seguida de oxidação para fosfato de di-hidroxiacetona e

peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio produzido reage posteriormente com 4-aminofenazona e 4-clorofenol sob a ação catalítica da peroxidase, para formar um corante vermelho. A intensidade cromática do corante vermelho formado é diretamente proporcional à concentração de triglicerídeos, podendo ser determinada fotometricamente.

4.2.9.4 LIPOPROTEÍNA DE MUITO BAIXA DENSIDADE (VLDL)

A determinação da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) foi através do método de Friedewald, Lery e Ferderickson (1972), utilizando para cálculo a equação 8.

<p>Equação 8 :</p> $VLDL = 0,2 \times TG$

Onde VLDL = Fração VLDL em $mg.dL^{-1}$ e TG = triglicerídeos em $mg.dL^{-1}$.

4.2.9.5 CREATININA

A determinação da creatinina foi através da reação cinética tamponada sem desproteinização. Teste compensado para soro/plasma.

4.2.9.6 ALANINA AMINOTRANSFERASE/ TRANSAMINASE GLUTÂMICO PIRÚVICA (ALT/TGP) E ASPARTATO AMINOTRANSFERASE/ TRANSAMINASE GLUTÂMICO OXALACÉTICA (AST/ TGO)

A ALT/TGP e AST/TGO foram determinadas através do método em conformidade com a International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), mas sem piridoxal-5-fosfato (BERGMEYER; HERDER; REJ, 1985; ECCLS, 1989).

4.2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados através do software BioEstat, versão 4.0 para realizar a análise da variância e teste de Tukey, mantendo-se o nível de significância de 5% em todas as análises ($p < 0,05$) (AYRES *et al.*, 2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO RESÍDUO DA SEMENTE DO URUCUM

Dados sobre a composição de alimentos são importantes para inúmeras atividades, tais como: avaliar o suprimento e o consumo alimentar de um país, verificar a adequação nutricional da dieta de indivíduos e de populações, avaliar o estado nutricional, para desenvolver pesquisas sobre as relações entre dieta e doença, em planejamento agropecuário, na indústria de alimentos, além de outros. Assim, a obtenção de dados referentes à composição de alimentos brasileiros tem sido estimulada com o objetivo de reunir informações atualizadas, confiáveis e adequadas à realidade nacional (HOLDEN, 1997; TORRES *et al.*, 2000).

O farelo da semente do urucum apresentou na sua composição, mostrada na tabela 2, elevados teores de proteína (11,5%), de resíduo mineral fixo (5,22%), carboidratos (42,2%) e fibras (28,48%).

O teor de proteína (11,5%) encontrada no farelo analisado foi ligeiramente superior aquele registrado por Carvalho *et al.*(1991) 10,8%, porém, inferior aos valores obtidos por outros autores como Bressani (1983), Wursts e Torreblanca (1983), Tonani *et al.* (2000) e Anselmo, Mata e Rodrigues (2008), os quais variaram de 13 a 17%. O valor encontrado foi similar ao obtido por Pedrosa, Cirne e Neto (1999), 12,67% na semente do urucum e por Pires *et al.* (2006), 11,56%, na farinha de trigo. Sabe-se que as proteínas cumprem funções estruturais, reguladoras, de defesa e de transporte no fluídos biológicos (ANDERSON *et al.*, 2005) e representam o principal componente estrutural e funcional de todas as células do organismo, proteção imunológica, formação hormonal, além de participarem como catalisadores de reações orgânicas e de servirem como substratos para obtenção de energia (DE ANGELIS; TIRAPEGUI, 2007). A deficiência deste nutriente durante o crescimento provoca em crianças a doença conhecida como *kwashiorkor* com profundas alterações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas (TIRAPEGUI; CASTRO; ROSSI, 2005; TIRAPEGUI; ROGERO; LAJOLO, 2008).

A desnutrição proteica, considerada uma das deficiências nutricionais mais importantes, tem sido vista como um problema de grande magnitude para parte da humanidade e frequentemente aparece como causa de várias alterações no desenvolvimento humano (MALAFAIA, 2008).

Segundo Malafaia, Martins e Silva (2009) depois de avaliarem a desnutrição proteica em ratos, concluíram que a deficiência proteica, mesmo que por um curto período de tempo, é capaz de proporcionar efeitos prejudiciais sobre os aspectos físicos dos animais principalmente no que tange à massa corpórea e à massa de vários órgãos vitais dos mesmos. Reforçando a importância do estado nutricional na manutenção da homeostasia do organismo, uma vez que, foi observado que não há necessidade de longos períodos de deficiência proteica para que os primeiros efeitos apareçam.

Segundo Tirapegui, Castro e Rossi (2005) as melhores fontes proteicas são as de origem animal, no entanto a ingestão de misturas de cereais e leguminosas fornece também quantidades necessárias de aminoácidos para a síntese proteica.

Segundo Tonani *et al.* (2000), o urucum é rico em proteína, daí recomenda-se a utilização das sementes na composição das rações para animais.

Embora o resíduo tenha apresentado porcentagem elevada de fibras (28,45%), o mesmo foi inferior aos 45,7% encontrados por Tonani *et al.* (2000); 45,5%, por Anselmo, Mata e Rodrigues (2008) e 45,10%, por Pereira *et al.* (2009) no resíduo da semente do urucum. O percentual de fibras constatado no presente estudo, no entanto, foi próximo aos 36,8% obtidos por Utiyama *et al.* (2002) e muito superior aos 16% encontrado por Bressani (1983). As fibras são de grande interesse nutricional, uma vez que dietas ricas em fibras estão associadas à melhor saúde do cólon, incidência reduzida de diabetes em adultos e pressão arterial e nível de colesterol menor. Além de serem importantes para o bom funcionamento do intestino (MAIAHA *et al.*, 2006; MATTOS; MARTINS, 2000).

Pela composição centesimal, o resíduo da semente de urucum se assemelha muito ao farelo de trigo, por apresentar teores semelhantes especialmente de fibra (40,10%) e proteína bruta (16%) (HARRIS; ASPLUND; CRAMPTON, 1968; ROSTAGNO *et al.*, 2011; TONANI *et al.*, 2000).

O percentual de resíduo mineral fixo do resíduo de urucum foi de 6,75%. Esse percentual foi superior aos 5,05%, encontrados por Moraes (2007) e, comparável aos 6,32% e 6,2%, obtidos, respectivamente, por Pereira *et al.* (2009) e Tonani *et al.* (2000). Quando comparado ao teor de cinzas apresentado por Silva *et al.* (2006b) no resíduo de soja (5,20%), o mesmo se mostrou ligeiramente superior, enquanto que esteve muito acima ao teor de cinzas encontrado por Frota, Soares e Areas (2008) no feijão caupi (2,65%). Os minerais são elementos existentes no resíduo mineral

fixo com funções orgânicas essenciais atuando tanto na forma iônica quanto como constituintes de compostos tais como enzimas, hormônios, secreções e proteínas do tecido orgânico (BORGES, 2006).

O teor de 42,2% de carboidratos totais encontrado é elevado, porém, foi inferior ao obtido por Moraes (2007) (78,11%). Sabe-se que os carboidratos constituem o mais abundante dos compostos orgânicos e são considerados a fonte primária de energia para o organismo, fornecendo, primariamente, combustível para o cérebro, medula, nervos periféricos e células vermelhas do sangue. Dessa forma, a ingestão alimentar insuficiente desse macronutriente traz prejuízos ao sistema nervoso central, além da produção concomitante de corpos cetônicos, com graves prejuízos ao organismo. É conhecido também o efeito “protetor” dos carboidratos no metabolismo da proteína, o que os tornam um “economizador da proteína” poupando-as de serem utilizadas com combustível, mantendo suas funções essenciais (DEMONTE, 2008).

Embora o farelo de urucum tenha apresentado teor de umidade baixo (6,75%), segundo Anselmo, Mata e Rodrigues (2008), o extrato seco de urucum é um produto extremamente higroscópico, ou seja, de acordo com as condições ambientais de armazenagem do produto e da permeabilidade da embalagem, esse produto, tende a entrar em equilíbrio com as condições termodinâmicas do ar ambiente, perdendo ou ganhando água.

Ao avaliar os valores diários de referência estabelecidos pela RDC nº 360/2003 (BRASIL, 2003) com base em dieta de 2000 kcal, verifica-se que as proteínas contidas em 100g de farelo do resíduo do urucum representam 15,33% do valor recomendado e que o teor de fibras (28,48g/100g) representa cerca de 1,14 vezes o valor estabelecido por esta resolução. Comparando esses teores com a IDR de referência e a classificação de um alimento como rico ou fonte de um elemento nutritivo quando proporciona 30 ou 15% da ingestão recomendável em 100g, respectivamente, de acordo com a Portaria nº 27/1998 – Secretaria de Vigilância em Saúde - MS (BRASIL, 1998), o farelo da semente de urucum pode ser classificado como rico em fibras e fonte de proteínas, proporcionando 113,92 e 15,33% da IDR de referência.

Tabela 2 – Composição centesimal do farelo do resíduo da semente do urucum expressa em g/100g de amostra integral*

Determinações	Média ± DP*	%VD	VDR (g)**
Umidade	6,75 ± 0,089	-	-
Resíduo mineral fixo	5,22 ± 0,35	-	-
Lipídeos totais	2,23 ± 0,11	4,05	60
Proteínas	11,50 ± 0,06	15,33	75
Carboidrato total	42,2 ± 0,69	14,06	300
Sacarose	11,78 ± 0,02	-	-
Amido	30,42 ± 0,58	-	-
Fibra	28,48 ± 0,91	113,92	25
Valor calórico total (kcal/100g**)	234,46	11,72	2000

* Valores médios de 3 determinações ± desvio padrão;

** Valores Diários de Referência com base em dieta de 2000kcal (BRASIL, 2003).

5.2 MINERAIS

Na avaliação dos minerais do resíduo da semente do urucum os maiores teores foram encontrados para sódio 35,61mg/g e para potássio 70,77mg/g, seguido do manganês (0,25mg/g), cálcio (0,11mg/g) e cobre, ferro e magnésio com 0,03mg/g (Tabela 3).

Tabela 3 – Teores de minerais do farelo da semente do urucum expressos em mg/g e a comparação com a ingestão Diária Recomendada (IDR)*.

Minerais	Média ± DP*	%IDR	IDR adultos (mg/g)
Cobre	0,03 ± 0,0008	3,33	0,90
Ferro	0,03 ± 0,0008	0,21	14
Sódio	35,61 ± 0,54	2,37	1500***
Zinco	0,04 ± 0,008	0,57	7
Magnésio	0,03 ± 0,0002	0,01	260
Potássio	70,77 ± 3,96	1,50	4700***
Manganês	0,25 ± 0,02	10,87	2,3
Cálcio	0,11 ± 0,03	0,01	1000

*IDR: Ingestão Diária Recomendada para adultos segundo a RESOLUÇÃO RDC NO 269 DE 22 DE SETEMBRO DE 2005 (BRASIL, 2005b); **Média e Desvio Padrão; ***Dietary Reference Intakes for potassium, Sodium (2005) segundo Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes. Elements Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. National Academies (Institute of Medicine, 2005).

A quantidade de cálcio detectada, 0,11mg/g, no farelo foi superior ao valor apresentado na composição de sementes de urucum realizada pela EMEPA (0,07mg/g), citado por Anselmo, Mata e Rodrigues (2008); porém, inferior à encontrada por Ferreira e Falesi (1989), de 1,82mg/g. Já Vieira, Cabral e De Paula (1999) encontrou para a soja cultivar EMBRAPA valor superior de cálcio, 3,14mg/g. O cálcio é o mineral mais abundante no corpo humano e é essencial para a transmissão nervosa, coagulação do sangue e contração muscular; além de garantir uma boa formação e a maturação de ossos e de dentes (WIEGERT; CALIXTO-LIMA; COSTA, 2012).

O teor de ferro encontrado no farelo do resíduo da semente do urucum estudado (0,03mg/g), foi inferior ao obtido por Ferreira e Falesi (1989) (0,085mg/g) e por Vieira, Cabral e De Paula (1999) na soja cultivar EMBRAPA (0,13mg/g), porém superior ao da EMEPA, citado por Anselmo, Mata e Rodrigues (2008) (0,008mg/g). Sabe-se que o ferro é um elemento-traço fundamental ao organismo humano, necessário para o transporte e uso de oxigênio nas células e nos tecidos, pois servindo como um componente funcional de proteínas, incluindo hemoglobina,

mioglobina, citocromos, além de uma variedade de enzimas (WIEGERT; CALIXTO-LIMA; COSTA, 2012).

Os teores obtidos de potássio (70,77mg/g), zinco (0,04mg/g), cobre (0,03mg/g) e manganês (0,25mg/g), na amostra estudada, foram superiores aos encontrados por Ferreira e Falesi (1989), respectivamente, 19,2; 0,0354; 0,0046 e 0,023mg/g. Vieira, Cabral e De Paula (1999), verificaram que na soja cultivares EMBRAPA, o valor encontrado para o potássio (15,67mg/g) foi inferior ao do farelo da semente do urucum e o do manganês (0,027mg/g) foi superior.

Quanto ao magnésio, a quantidade encontrada no farelo do resíduo do urucum (0,03mg/g) foi inferior à detectada por Ferreira e Falesi (1989) (2,22mg/g).

Sabe-se que a deficiência de um mineral necessário apenas em quantidades mínimas pode ser igualmente ou mais prejudicial do que a deficiência de um mineral necessário em quantidades maiores (ANDERSON, 2005). Estes são nutrientes essenciais que exercem importantes funções no metabolismo (GALANTE; NOGUEIRA; MARI, 2007). Sendo assim, a presença destes elementos traços pode contribuir para a ingestão de uma alimentação mais nutritiva.

Os minerais quantificados no farelo ou resíduo do urucum mostraram-se com teores abaixo da recomendação estabelecida para adultos pela Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005b). A RDC estabelece o nível de ingestão dietética diária suficiente para atender às necessidades de um nutriente para todos os indivíduos saudáveis de um determinado grupo de mesmo gênero e estágio de vida (COZZOLINO, 2005). Entre os minerais avaliados, destaque maior pode ser dado ao manganês, cujo teor representou 10,87% da IDR.

5.3 FATORES ANTINUTRICIONAIS

5.3.1 TANINOS

Os taninos ocorrem em uma ampla variedade de vegetais, podendo ser encontrados nas raízes, na casca, nas folhas, nos frutos, nas sementes e na seiva (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

Através da metodologia utilizada nesta pesquisa, não foi detectada a presença de taninos na amostra. Resultado semelhante ao encontrado por Bernardes *et al.* (2011) onde os testes revelaram baixos teores de taninos

condensados e fenóis totais nas cascas dos frutos da aroeira. Lima *et al.* (2006) encontraram elevados teores de taninos hidrolisáveis na porção aquosa existente entre as sementes e a casca do urucum quando avaliada por testes químicos, espectroscopia no infravermelho e difração de raios-x em policristais, porém, as sementes não foram avaliadas pelos autores.

A ausência de taninos na amostra estudada é um resultado favorável, pois embora sejam considerados como antioxidantes são inibidores de determinadas enzimas e influenciam negativamente a digestibilidade de proteínas, no entanto, os seus efeitos em seres humanos ainda são desconhecidos (SILVA; SILVA, 1999; NACKZ *et al.*, 1994). Segundo Salunkhe *et al.* (1990) fenóis comuns em plantas não são considerados tóxicos em quantidades e condições normais, com exceção dos taninos, que possuem a habilidade de complexar e precipitar proteínas de soluções aquosas.

5.3.2 ÁCIDO FÍTICO

Não foi detectada a presença de ácido fítico na amostra avaliada. Esse ácido está presente de forma natural em muitos alimentos vegetais, principalmente legumes. Durante o amadurecimento, sementes de legumes e de cereais acumulam uma quantidade substancial de ácido fítico. A maioria dessas sementes e de seus coprodutos contêm 1-2% de ácido fítico, o que representa mais de 60% do fósforo total dos mesmos (LEI; PORRES, 2003). Em relação a algumas outras culturas, Fukuji *et al.* (2008) constataram o ácido fítico no milho na proporção de 1,5% enquanto que na farinha de milho, de 0,15%. Mohamed, Ahmed e Babiker (2010) determinaram os teores de ácido fítico na farinha de milho, mais especificamente nas cultivares Ashna e Dembi, registrando, respectivamente, os seguintes valores: 728,21 e 722,31mg/100g. Na soja, cultivar VMAZ, Moreira *et al.*(2011) detectaram 1,236g de ácido fítico/100g.

Há registros de efeitos antinutricionais bem como de efeitos benéficos do ácido fítico. Efeitos antinutricionais estão relacionados com a forte capacidade que apresentam de formar complexos com proteínas e minerais; existindo, no entanto, meios para se diminuir tal efeito, como, cozimento, germinação, fermentação e adição de enzima (URBANO *et al.*, 2000). Para alguns autores o ácido fítico pode atuar como anticarcinogênico, antioxidante, útil na prevenção de cálculos renais,

além de prestar contribuição nutricional no tratamento de diabetes, através da ação inibidora de α -amilases (URBANO *et al.*, 2000; MESSINA; BARNES, 1991; JARIWALLA, 1992; ZHOU *et al.*, 1995; GRASES *et al.*, 1996; EMPSON; LABUZA; GRAF, 1991).

5.3.3 INIBIDORES DE PROTEASES

Na amostra analisada não foram detectados inibidores de proteases, podendo ser recomendado para o consumo com relação a essas substâncias, diferente das leguminosas onde são encontrados esses fatores como na soja (BRUNE *et al.*, 2010), no feijão comum (BONETT *et al.*, 2007), feijão preto (DUARTE *et al.*, 2010), ervilhas (PARK *et al.*, 2010). Para estes alimentos existe a necessidade de aquecimento para a inativação dos fatores antinutricionais (SILVA; SILVA, 2000). Segundo Liener (1994) estes antinutrientes apresentam especificidade de inibir as enzimas proteolíticas e, conseqüentemente, reduzir a digestão proteica de alimentos, proporcionando diminuição no ganho de peso e no crescimento dos animais. Para Silva e Silva (2000), os malefícios dos inibidores de proteinases são relatados em estudos com animais, sendo observada hipertrofia pancreática.

Brune *et al.* (2010) observaram que na soja *in natura*, os grãos livres de inibidor de tripsina Kunitz e lectina apresentaram uma inibição trípica significativamente menor quando comparada aos grãos da soja convencional.

5.4 OBTENÇÃO DO ISOLADO PROTÉICO

A avaliação do perfil da solubilidade demonstrou que a proteína foi mais solúvel em pH 12 (37,44%) e o ponto isoelétrico encontrado foi em pH 3,8 (16,27%). Estes resultados foram utilizados para a extração do isolado proteico com recuperação de cerca de 45% de proteína.

A curva de solubilidade encontrada para a proteína do farelo da semente do urucum é a demonstrada na figura 12.

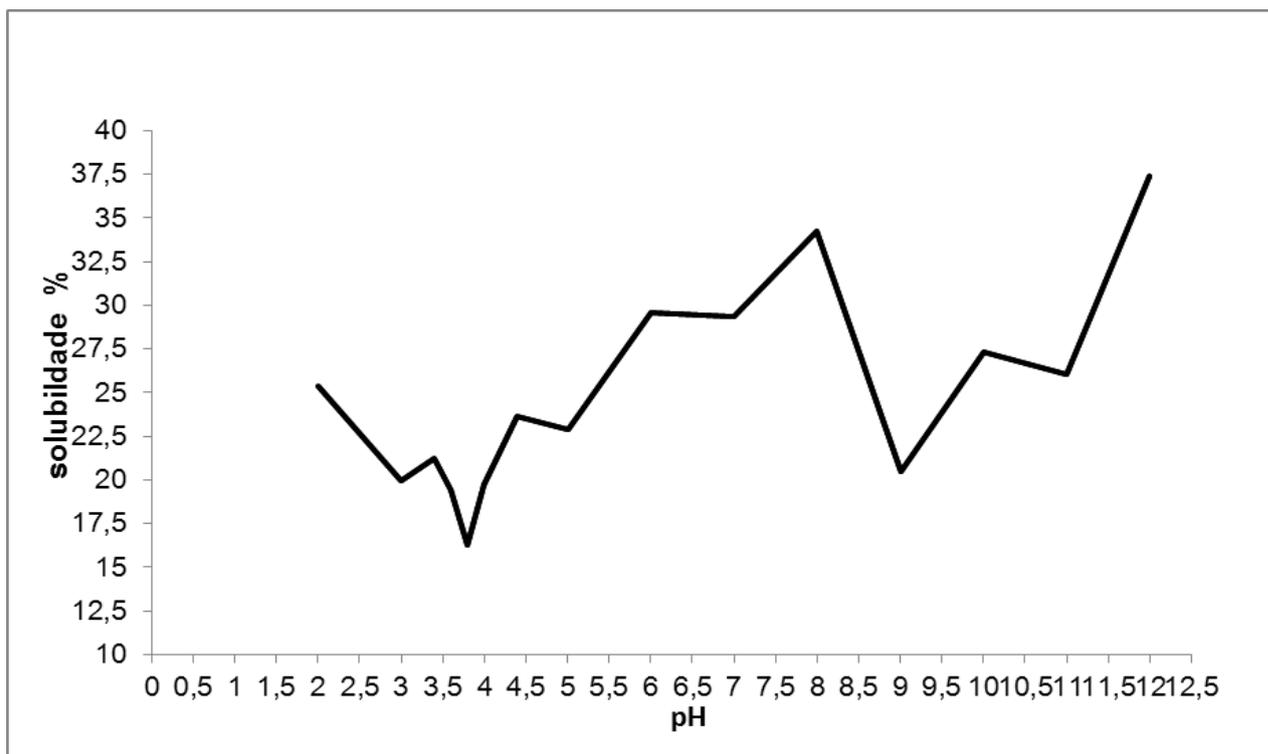


Figura 12– Curva de solubilidade da proteína do resíduo da semente do urucum.

O valor do pH obtido para a maior solubilidade proteica na amostra estudada (pH 12) foi igual ao encontrado por Glória e Regitano-d'arce (2000) ao estudarem o isolado da soja, diferenciando no ponto isoelétrico que foi em pH 2 (49,11%) e para a semente do urucum em pH 3,8 (16,27%).

Segundo Carvalho *et al.* (2009), o pH utilizado para maior solubilidade proteica na obtenção do isolado proteico de sementes de cupuaçu foi o pH 9 e para o ponto isoelétrico foi o pH 3,5.

5.5 COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS E ESCORE QUÍMICO

A composição em aminoácidos realizada a partir do isolado proteico obtido do farelo da semente do urucum apresentou os resultados mostrados na tabela 4. Os resultados foram expressivos para os aminoácidos lisina (76,7mg/g), isoleucina (59,3mg/g), leucina (83,9mg/g) e fenilalanina + tirosina (100,2mg/g). Comparando esses resultados aos recomendados pela FAO/WHO (2007), para adultos, observa-se que os mesmos foram superiores já que as recomendações de consumo são de 45, 30, 59 e 30mg/g de proteína respectivamente.

Tabela 4 – Composição e escore químico (EQ) de aminoácidos do isolado protéico (IP) da semente do urucum e comparação com as exigências da FAO/WHO para adultos.

	IP (mg/g proteína)	EQ	FAO * (mg/g proteína)
Aminoácidos Essenciais			
Lisina	76,7	1,70	45
Histidina	7,2	0,48**	15
Treonina	10,9	0,47**	23
Valina	8,5	0,22**	39
Metionina	12,8	0,8**	16
Metionina + Cisteína	12,8	0,58**	22
Isoleucina	59,3	1,98	30
Cistina	nd	nd	6
Leucina	83,9	1,42	59
Fenilalanina + Tirosina	100,2	3,34	30
Aminoácidos não Essenciais			
Aspartato (Asp)	105,5	nd	-
Glutamato (Glu)	159,2	nd	-
Serina (Ser)	57,9	nd	-
Glicina (Gly)	71,2	nd	-
Arginina (Arg)	49,3	nd	-
Alanina (Ala)	68,5	nd	-
Prolina (Pro)	53,4	nd	-

*FAO/AHO (2007) Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. Report of the joint FAO/WHO/UNU expert consultation on protein and amino acid requirements in Human Nutrition. Geneva: United Nations University. WHO Technical Report, (2007);

**Aminoácidos limitantes; nd: não determinado.

Na amostra estudada, os valores encontrados dos aminoácidos não essenciais, alanina (68,5mg/g), aspartato (105,5mg/g), glutamato (159,2mg/g) e serina (57,9mg/g), foram superiores aos obtidos por Rodrigues *et al.* (2001) em uma das amostras analisadas no estudo, denominada milho 1, sendo 6,8; 5,3; 17,3 e 4,4 mg/g de alanina, aspartato, glutamina e serina, respectivamente. Ost *et al.* (2007)

encontraram valores para os mesmos aminoácidos não essenciais na amostra farelo de soja 1, valores respectivamente de 21,4; 42,4; 63,6 e 20,5mg/g. Esses valores foram maiores que os encontrados por Rodrigues *et al.* (2001) na amostra milho 1 e inferiores aos encontrados no isolado proteico da semente do urucum estudada.

Os aminoácidos não essenciais são igualmente importantes na estrutura proteica; no entanto, se houver deficiência na ingestão de um deles, ele pode ser sintetizado em nível celular a partir de aminoácidos essenciais ou de precursores contendo carbono e nitrogênio (TIRAPEGUI; ROGERO; LAJOLO, 2008).

O escore químico do aminoácido da proteína estudada foi obtido através da relação entre o teor do aminoácido e o valor recomendado pela FAO/WHO (2007), e permitiu determinar o aminoácido limitante. Segundo Pires *et al.* (2006) uma proteína que apresenta escores químicos maiores que o valor 1,0, para todos os aminoácidos, é considerada de alto valor nutricional. Enquanto que os aminoácidos que apresentarem escore químico menor que 1,0 são chamados de aminoácidos limitantes, sendo que o menor valor é considerado o primeiro aminoácido limitante ou o aminoácido mais limitante, com deficiência também em outros aminoácidos. Sendo assim, os aminoácidos histidina, treonina, valina, metionina e metionina + cisteína são considerados como limitantes, porém, o mais limitante é o aminoácido valina, com escore químico de 0,22.

Através da identificação do aminoácido limitante, é possível, obter informações sobre possíveis complementações com outras fontes proteicas (TIRAPEGUI; CASTRO; ROSSI, 2005).

Segundo Pires *et al.* (2006), o aminoácido limitante encontrado no resíduo da soja foi a metionina + cisteína. Já Corrão-Panizzi e Mandarino (1998) e Carvalho *et al.* (2009) encontraram a metionina como aminoácido limitante para o isolado proteico da soja (0,5) e isolado proteico do cupuaçu (0,01).

Tabela 5 – Comparação dos aminoácidos essenciais (mg/g proteína) do isolado proteico do farelo do resíduo da semente do urucum (IPU), isolado proteico da soja (IPS) e do isolado proteico da semente do cupuaçu (IPC).

Aminoácidos Essenciais	IPU	IPS*	IPC**
Lisina	76,7	40	4,99
Histidina	7,2	-	1,09
Treonina	10,9	22,5	5,42
Valina	8,5	29,38	5,54
Metionina	12,8	8,13	0,25
Metionina + Cisteína	12,8	16,26	2,38
Isoleucina	59,3	30,63	4,07
Cistina	-	8,13	2,13
Leucina	83,9	48,75	7,52
Fenilalanina + Tirosina	100,2	56,88	9,04

*Corrão-Panizzi e Mandarino (1998); ** Carvalho *et al.* (2009).

O isolado proteico da semente do urucum apresentou valores superiores para os aminoácidos lisina, isoleucina, leucina e fenilalanina + tirosina em relação aos encontrados por Corrão-Panizzi e Mandarino (1998) no isolado proteico da soja, os quais foram 40; 30; 48,75 e 56,88 mg/g de proteína, respectivamente. Já em relação aos outros aminoácidos encontrados pelos mesmos pesquisadores, os teores foram maiores do que os obtidos nesta pesquisa.

Os valores obtidos para os aminoácidos essenciais no isolado proteico do farelo da semente do urucum, foram todos superiores aos encontrados por Carvalho *et al.* (2009) no isolado proteico da semente do cupuaçu (Tabela 5).

As exigências proteicas são determinadas em função do atendimento das necessidades metabólicas em aminoácidos e nitrogênio (OST *et al.*, 2007). Do ponto de vista nutricional, duas categorias foram inicialmente propostas: aminoácidos essenciais e não essenciais, sendo essenciais aqueles que não podem ser sintetizados pelo organismo animal, a partir de substâncias ordinariamente disponíveis para as células, em uma velocidade proporcional à demanda para atender o crescimento normal (TIRAPEGUI; CASTRO; ROSSI, 2005).

Segundo Tirapegui, Castro e Rossi (2005) e Tirapegui, Rogero e Lajolo (2008), pode-se concluir que a composição de aminoácidos tem a mesma

importância que a quantidade de proteína consumida na dieta, uma vez que o consumo contínuo e isolado de uma proteína, parcial ou totalmente incompleta, poderia interferir negativamente em vários processos metabólicos. Isso pode levar o organismo a recorrer aos mecanismos fisiológicos adaptativos, até chegar ao comprometimento total das funções vitais.

5.6 ENSAIO BIOLÓGICO

Os valores de ganho de peso dos animais durante os 28 dias de experimento estão apresentados na tabela 6. Como era esperado, houve um decréscimo no peso dos animais no grupo apteico, pois a proteína desempenha função estrutural no organismo, além de outras funções indispensáveis. Os grupos caseína e teste 2 ou isolado proteico, foram os que ganharam mais peso durante o experimento 64,87 e 65,74g, respectivamente, embora não tenham diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre estes grupos e o grupo teste 1 ou farelo de urucum (55,08g).

O peso corpóreo inicial dos animais do grupo caseína (32,88g), apteico (33,93g), teste 1 (33,39g) e teste 2 (35,01g) não apresentou diferença significativa entre os grupos, mostrando desse modo, que os animais iniciaram o experimento nas mesmas condições.

O peso final dos grupos caseína (97,76g), teste 1 (88,47g) e teste 2 (100,75) não mostrou diferença significativa, indicando que a proteína apresentou o mesmo comportamento entre esses grupos. O grupo apteico, como era de se esperar, foi o único grupo onde houve perda de peso devido à falta de proteína da ração oferecida. Sabe-se que a proteína exerce um papel estrutural fundamental no organismo, pois cumprem funções estruturais, reguladoras, de defesa e de transporte nos fluidos biológicos (ANDERSON, 2005; TIRAPEGUI; ROGERO; LAJOLO, 2008). Sua falta ocasiona alterações nos processos bioquímicos e fisiológicos e na síntese proteica (ANDERSON, 2005).

Tabela 6 – Ganho de peso e média dos pesos corpóreos inicial e final dos grupos submetidos às dietas caseína (CA), apteica (AP), farelo de urucum (Teste 1) e isolado proteico (Teste 2) durante o ensaio biológico.

Peso (g)	CA	AP	Teste 1	Teste 2
Peso corpóreo inicial	32,88 ± 4,87a	33,93 ± 5,13a	33,39 ± 7,77a	35,01 ± 4,74a
Peso corpóreo final	97,76 ± 13,05a	27,81 ± 2,95b	88,47 ± 18,99a	100,75 ± 2,38a
Variação de peso	64,87 ± 12,95a	-6,11 ± 2,49b	55,08 ± 19,42a	65,74 ± 19,57a

*médias na mesma linha seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

A evolução do peso dos animais está representada na figura 13. Observa-se o decréscimo de peso do grupo apteico e o aumento, pareado, de peso dos grupos caseína, teste 1 e teste 2.

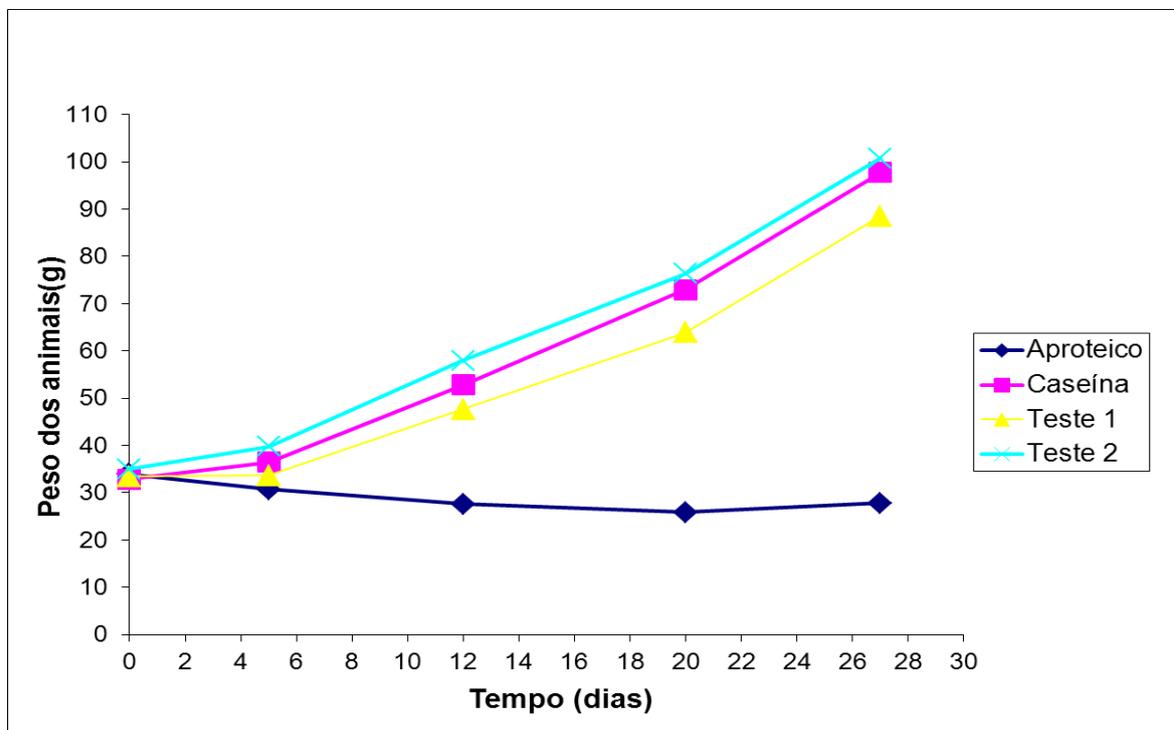


Figura 13 – Evolução de peso dos animais dos grupos apteico, caseína, teste 1 e teste 2 durante o período experimental.

A tabela 7 mostra a ingestão alimentar dos 4 grupos de animais. O grupo teste 2 foi o que ingeriu a maior quantidade de ração no final do experimento

(415,27g). Mesmo com o maior consumo alimentar entre os grupos, o grupo 2, não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos caseína (392,45g) e teste 1 (384,74g). O grupo aprotéico foi o único que mostrou diferença significativa em relação aos demais grupos, pesando em média 105,28, isto pode ser explicado, pelo consumo de dieta com ausência de proteína na sua composição.

Não houve diferença significativa quanto à ingestão de ração entre os grupos caseína (392,45g), teste 1 (384,74g) e teste 2 (415,27g), conforme a tabela 7. Este fato indica que a qualidade das proteínas das três rações oferecidas foi a mesma, tendo em vista que não houve diferença na quantidade de ração oferecida entre os grupos. A qualidade de uma proteína refere-se a sua capacidade de fornecer os aminoácidos essenciais para o organismo (NONINO-BORGES; BORGES, 2008).

Tabela 7 – Ingestão alimentar dos grupos submetidos à dieta caseína (CA), aprotéica (AP), farelo de urucum (Teste 1) e isolado proteico (Teste 2) durante o ensaio biológico.

	CA	AP	Teste 1	Teste 2
Ingestão (g)	392,45 ± 73,36a	105,28 ± 23,72b	384,74 ± 60,54a	415,27 ± 69,16a

* Médias na mesma linha seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

5.6.1 ÍNDICES DA QUALIDADE PROTÉICA

Em geral, proteínas de menor qualidade nutricional são mais acessíveis por apresentarem custo inferior ao das proteínas de maior qualidade. Portanto, esforços para a otimização do balanço aminoacídico devem ser estimulados para que populações de menor renda também tenham acesso a misturas proteicas de melhor qualidade nutricional, fundamentais ao adequado crescimento e à manutenção do estado de saúde (TIRAPÉGUI; CASTRO; ROSSI, 2005).

A qualidade nutricional proteica está relacionada à capacidade de satisfazer as necessidades básicas do ser humano, promovendo um crescimento normal em crianças e a manutenção no indivíduo (TIRAPÉGUI; CASTRO; ROSSI, 2005; TIRAPÉGUI; ROGERO; LAJOLO, 2008), sendo, no entanto, variável de acordo com sua origem. As proteínas de origem vegetal são de baixo valor biológico,

principalmente porque são deficientes em alguns aminoácidos essenciais, ou a relação entre eles é desequilibrada (PECHNICK; GUIMARÃES; PANEK, 1962).

Considerando-se os índices de qualidade da proteína (Tabela 8) verifica-se que não houve diferença significativa entre o grupo teste 1 e o grupo teste 2 em relação a taxa de eficiência proteica (PER) ($p < 0,05$), embora ambos tenham diferido do grupo caseína.

A taxa de eficiência proteica (PER) avalia o quanto de peso o animal ganhou para cada grama de proteína. O ganho de peso por proteína, tabela 8, nos grupos teste 1 (1,71g) e teste 2 (2,10g) não foi tão eficiente quanto o grupo caseína (2,57g). Em termos de valor absoluto entre o grupo teste 1 (1,71g) e teste 2 (2,10g) houve uma diferença de 0,39g entre eles, muito próximo ao desvio padrão dos mesmos.

Embora a qualidade da proteína seja baixa em vegetais, a taxa de eficiência proteica (PER) encontrada no estudo para o grupo teste 1 foi inferior e para o teste 2 superior as encontradas por Pires *et al.* (2006), na farinha de trigo (0,98g), e farinha de soja (1,75g). E também superiores, aos valores obtidos por Borges *et al.* (2010) no pão de sal com 10% (0,94g) e 15% (1,45g) de farinha de linhaça. Segundo Tirapegui, Rogero e Lajolo (2008), o valor da PER obtida para a soja foi de 2,1g e para o trigo 1,5g.

Tabela 8 – Índices de qualidade da proteína do farelo da semente de urucum nos grupos caseína (CA), farelo de urucum (Teste 1) e isolado proteico (Teste 2).

Índices de qualidade da proteína	CA	Teste 1	Teste 2
Taxa de Eficiência Proteica (PER) (g)	2,57 ± 0,25a	1,71 ± 0,41b	2,10 ± 0,33b
Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) (g)	0,17 ± 0,02a	0,14 ± 0,03a	0,16 ± 0,02a
Valor Biológico (VB) (%)	99,01 ± 0,22a	94,89 ± 1,24b	95,95 ± 0,52b
Balanço Nitrogenado (BN) (g)	3,64 ± 0,67a	4,08 ± 0,94a	4,39 ± 0,82a
Digestibilidade Verdadeira (DV) (%)	96,43 ± 0,76a	87,99 ± 2,53c	92,63 ± 1,14b

* médias na mesma linha seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

O coeficiente de eficácia alimentar (CEA), que verifica a qualidade do alimento com o um todo, mostrou uma pequena variação de 0,14 a 0,16 g. Como as rações analisadas não apresentaram CEA diferentes entre si, pode-se afirmar que a qualidade do alimento foi boa e, igual nos três grupos. A qualidade da proteína é o que vai diferenciar as rações entre si.

Borges *et al.* (2010) verificaram para o pão de sal com adição de 10% de farinha de linhaça na sua preparação, o valor do coeficiente de eficácia alimentar (CEA) de 0,09g, inferior ao encontrado nos grupos teste 1 (farelo da semente do urucum) - 0,14g, e teste 2 (isolado proteico do farelo da semente do urucum) - 0,16g. O CEA encontrado no pão de sal com adição de 15% de farinha de linhaça, no entanto, 0,14g, foi similar ao obtido para o grupo teste 1 (0,14g) e, ligeiramente, inferior ao encontrado no grupo teste 2 (0,16g).

O valor biológico (VB) quantifica o nitrogênio de proteína retida no organismo do total absorvido. Quanto maior o nitrogênio retido, melhor será a qualidade da proteína experimental (NONINO-BORGES; BORGES, 2008). Houve diferença significativa do valor biológico dos grupos teste 1 (94,89%) e teste 2 (95,95%) com o grupo caseína (99,01%). Porém, são valores altos quando comparados com a digestibilidade das proteínas de origem vegetal e estão abaixo (4-3%) ao valor encontrado para o padrão do grupo caseína, mostrando seu potencial para o ganho de peso e massa magra do animal.

Os valores biológicos constatados nos grupos teste 1 e 2, embora tenham sido inferiores ao do grupo caseína, foram superiores aos obtidos por Antunes *et al.* (1995) para o feijão cultivares rico 23 (58,90%), pirata-1 (49,7%) e carioca (39,40%).

Uma grande variabilidade genética tem sido observada no que tange às concentrações de proteína nas diferentes cultivares de sorgo (REDDY; ESWARA, 2002). No entanto, a proteína do grão de sorgo integral é considerada de baixo valor biológico por ser deficiente em lisina, aminoácido essencial ao organismo humano (QUEIROZ *et al.*, 2009).

Quanto ao balanço nitrogenado (BN), os grupos não mostraram diferenças e variaram de 3,64g (grupo caseína) a 4,39g (grupo teste 2). Por essa razão, conclui-se que boa parte da proteína é retida, conseqüentemente, mostrando-se uma proteína de boa qualidade. MORAES *et al.* (2008) verificaram o balanço nitrogenado em dietas com níveis crescentes de inclusão (18, 36, 46 e 72%) de subproduto de urucum, sendo que os valores obtidos foram respectivamente 3, 4,67, 4,46 e 5,86g. Os valores encontrados nas dietas com 36 e 46% de inclusão do subproduto foram similares ao encontrado no grupo teste 1 (4g) e teste 2 (4,39g). Já com a inclusão de 72% (5,86g) foi superior aos grupos teste 1 e 2. O valor determinado no grupo caseína (3,64g) foi similar ao encontrado na dieta com inclusão de 18% (3g) do subproduto.

A digestibilidade é o primeiro fator que reflete a eficiência da utilização proteica da dieta, portanto, pode ser considerada uma condicionante de sua qualidade (CHIARADIA, 1997).

A digestibilidade verdadeira (DV) encontrada na ração teste 1, (87,99%), e na ração teste 2 (92,63%) foram diferentes estatisticamente entre si, assim como em relação à ração caseína (96,43%). Apesar das rações testes apresentarem digestibilidade inferior a da ração padrão de caseína, foram próximas a encontrada por Pires *et al.* (2006), na farinha de trigo (89,44%), por Tirapegui, Rogero e Fajolo (2008) no trigo (91%) e na soja (95%); e superior à da farinha de soja (71,76%) observada por Pires *et al.* (2006). A digestibilidade verdadeira obtida por Borges *et al.* (2010) nos pães de sal com 10% de farinha de linhaça (90,33%) e com 15% (91,87%), foi superior a encontrada no grupo teste 1 (88,19%) e inferior a grupo teste 2 (92,63%).

Como era de se esperar, o grupo caseína apresentou maior digestibilidade em função de ser uma proteína de origem animal. O valor determinado no teste 2 (isolado proteico) apresentou-se superior e com diferença significativa quando comparado com o valor do grupo 1 (farelo do urucum). Isso se deve, possivelmente, aos tratamentos realizados para a obtenção do isolado proteico que pode ter levado à possível desnaturação parcial das proteínas favorecendo, desse modo, o ataque de ácidos e enzimas no processo digestivo aumentando a sua digestibilidade verdadeira.

5.6.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os resultados referentes aos parâmetros de glicose, colesterol total, creatinina, triglicerídeos, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), alanina aminotransferase/transaminase glutâmico pirúvica (ALT/TGP) e aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico oxalacético (AST/TGO) estão apresentados na tabela 9.

Santos *et al.* (2010) avaliaram parâmetros bioquímicos plasmáticos em ratos adultos *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar produzidos no biotério da Universidade Federal de Sergipe, com objetivo de estabelecer valores de referência para glicose, frutamina, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL e LDL, uréia

e creatinina e outros parâmetros, os quais podem ser comparados aos resultados observados nesta pesquisa com padrão de caseína e os grupos testes.

Os valores obtidos de glicose, tabela 9, no grupo caseína (72,4mg.dL⁻¹), grupo teste 1 (59,33mg.dL⁻¹) no grupo teste 2 (70,20mg.dL⁻¹) não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si, porém, foram inferiores ao encontrado por Santos *et al.* (2010), 85 mg.dL⁻¹. O valor encontrado por Souza (2001) de glicose no grupo com doses de bixina de 70, 350 e 700mg depois de seis meses de experimento foram 144,20, 114,40 e 136,95mg.dL⁻¹. Houve a diminuição da glicose com o aumento da dose da bixina.

A semelhança entre os resultados obtidos de glicose para os três grupos pode indicar que as rações oferecidas continham teores próximos de açúcares. A glicose é o principal carboidrato utilizado como fonte de energia pelo organismo, devendo o nível sanguíneo ser mantido na faixa de 60 a 99mg/dL. Valores aumentados estão relacionados à hiperglicemia e podem gerar complicações renais, cardiovasculares, oculares, dentre outras (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Tabela 9 – Parâmetros bioquímicos dos grupos submetidos às dietas caseína (CA), farelo de urucum (Teste 1) e isolado proteico (Teste 2) ao final do ensaio biológico.

Parâmetros (mg.dL ⁻¹)	CA	Teste 1	Teste 2
Glicose	72,40 ± 14,64a	59,33 ± 12,72 ^a	70,20 ± 15,29 ^a
Colesterol total	75,00 ± 10,65b	82,5 ± 5,96ab	94,83 ± 9,43 ^a
Creatinina	0,3 ± 0,00a	0,2 ± 0,00b	0,23 ± 0,05b
Triglicerídeos	47,60 ± 19,48a	48,83 ± 16,58 ^a	68,17 ± 17,89 ^a
VLDL	12,17 ± 7,68a	9,83 ± 3,37 ^a	13,67 ± 3,72 ^a
ALT/TGP (UI/L)	24,17± 6,82a	32,17± 5,49 ^a	27,67 ± 5,65 ^a
AST/TGO (UI/L)	155,5 ± 24,94a	149,33 ± 45,22 ^a	152,33 ± 48,19 ^a

*médias na mesma linha seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (p<0,05)

Houve diferença significativa entre os valores encontrados para o colesterol total entre os três grupos - caseína (75mg.dL⁻¹), teste 1 (82,5mg.dL⁻¹) e teste 2 (94,83mg.dL⁻¹).

Para os dados obtidos para o colesterol total, somente o grupo caseína, (75mg.dL^{-1}) foi igual ao obtido por Santos *et al.* (2010) (75mg.dL^{-1}). Os grupos teste 1 e teste 2 tiveram valores superiores ao encontrado pelos mesmos autores ($82,5\text{mg.dL}^{-1}$ e $94,83\text{mg.dL}^{-1}$, respectivamente). Souza (2001) determinou o colesterol total em ratos alimentados com bixina na concentração de 700mg e obteve $101,3\text{mg.dL}^{-1}$ de colesterol, já com a bixina nas concentrações de 70 e 350mg foram respectivamente $82,20$ e $90,97\text{mg.dL}^{-1}$, mostrando diferentes efeitos deste carotenoide de acordo com a concentração aplicada.

Os valores de triglicerídeos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, embora o teste 1 e teste 2 tenham sido ligeiramente superiores ao do padrão caseína. Os triglicerídeos dos grupos teste 1 ($48,83\text{mg.dL}^{-1}$) e teste 2 ($68,17\text{mg.dL}^{-1}$) foram superiores ao valor de referência de parâmetros bioquímicos independentes da linhagem BALB/c e C57BL6, $21,11$ a $29,68\text{mg.dL}^{-1}$ avaliada por ALMEIDA *et al.* (2008), mas próximos ao de Santos *et al.* (2010), $47,6\text{mg.dL}^{-1}$.

As concentrações de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), alanina aminotransferase/ transaminase glutâmico pirúvica (ALT/TGP) e aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico oxalacético (AST/TGO), não mostraram diferenças significativas entre os grupos avaliados, embora pequenas variações numéricas fossem detectadas.

Não houve diferenças significativas tanto nos valores de ALT - entre o grupo caseína ($24,7\text{UI/L}$), teste 1 ($32,17\text{UI/L}$) e teste 2 ($27,67\text{UI/L}$); e nos valores de AST - grupo caseína ($155,5\text{UI/L}$), teste 1 ($149,33\text{UI/L}$) e teste 2 ($152,33\text{UI/L}$). O aumento da atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT) reflete alterações em vários tecidos, as quais, porém, por exibirem maior atividade no tecido hepático, tem grande validade no diagnóstico de hepatites virais, tóxicas e doenças necróticas do fígado (OLIVEIRA *et al.*, 2012). O fígado é integrante da maioria das funções metabólicas do corpo e desempenha papel principal no metabolismo de carboidrato, proteína e gordura; no armazenamento e ativação das vitaminas e minerais; formação e excreção de bile; conservação da amônia em ureia; metabolismo esteroide e ação como filtro e câmara de irrigação (HASSE; MATARESE, 2002).

Segundo Souza (2001), que estudou o efeito da bixina, em diferentes concentrações, sobre parâmetros bioquímicos, mostrou que a bixina foi capaz de auxiliar a regeneração das lesões hepáticas, como na provável intoxicação por

cobre, onde os níveis de AST/ALT foram reduzidos no grupo que recebeu bixina, além de reduzir os níveis de triglicérido. Nesse mesmo estudo, o autor obteve 59,25UI/L de ALT depois de seis meses de experimento sem adição de bixina; com adição de bixina, na concentração de 700mg, o valor obtido foi de 72,25UI/L de ALT. Para os mesmo parâmetros de tempo e concentração de bixina, Souza constatou 87,75UI/L e 116,5UI/L para AST.

Os valores de creatinina entre os grupos teste 1 (0,2mg.dL⁻¹) e teste 2 (0,23mg.dL⁻¹) não apresentaram diferenças significativas entre eles, porém houve diferença para o valor encontrado no grupo padrão caseína (0,3mg.dL⁻¹). Verificou-se que os valores encontrados tanto no grupo teste 1 quanto no grupo teste 2 foram inferiores ao do grupo padrão caseína. A proteína dos grupos teste 1 e teste 2 pode baixar o nível de creatina. Sabe-se que a falta de correlação entre a creatinina urinária e a creatinina plasmática irá apontar uma disfunção renal (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A elevação da creatinina no sangue se dá na insuficiência renal, na nefrite incipiente, na glomerulonefrite crônica. Nas obstruções urinárias, por afecções da próstata, bexiga ou ureter, bem como na oligúria reflexa provocada pela nefrolitíase, verificam-se índices muito elevados, mas reversíveis pela remoção da causa da obstrução (LIMA *et al.*, 2001a).

A creatina muscular é utilizada como uma fonte de energia para as células musculares, uma vez que ela pode ser fosforilada em fosfocreatina. Cerca de 1 a 2% de creatina é transformada por dia em creatinina. Em virtude de a creatinina ser de produção endógena e ser liberada nos líquidos corporais a uma taxa constante e seus níveis plasmáticos se manterem em valores dentro de limites estreitos, sua depuração pode ser determinada como um indicador de taxa de filtração glomerular. Assim, pode ser realizado, também, o exame clearance de creatinina, no qual se tem uma estimativa dessa taxa, que indicará com precisão, o estado da função renal do indivíduo (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A principal função do rim é manter o equilíbrio homeostático com relação aos líquidos, eletrólitos e solutos orgânicos (WILKENS, 2002).

Todos os valores de creatinina encontrados nos três grupos foram inferiores ao de Santos *et al.* (2010) (0,6mg.dL⁻¹) e os grupos testes diferiram estatisticamente do grupo padrão caseína.

Entre os parâmetros bioquímicos avaliados, diferenças significativas entre os grupos foram encontradas apenas para o colesterol total e creatinina. Houve

diferença quanto ao parâmetro creatinina do grupo caseína com os grupos teste 1 e teste 2 e, no colesterol total, onde não se constatou diferença significativa entre o grupo caseína e grupo teste 1, assim como, também, entre o grupo teste 1 e grupo teste 2. Ocorreu diferença entre o grupo caseína e o grupo teste 2, sendo superior neste último grupo.

Franco (2008a) induziu coelhos a hiperlipidemia e após o período de indução, administrou diferentes doses de bixina com o objetivo de obter um fitoterápico e/ou um suplemento alimentar, voltado ao tratamento da hiperlipidemia em animais. Verificou ao final do experimento a redução do colesterol sanguíneo, aumento do HDL e ausência de efeito hipotriglicéridico, porém verificou que existe necessidade de cuidados quanto à dosagem de bixina administrada, pois a mesma em dose de 10% mostrou-se tóxica aos animais.

Em outro estudo com coelhos, Lima *et al.* (2001b) induziram hiperlipidemia com uma dieta contendo colesterol. Acrescida a esta ração, foram testados os carotenóides bixina, norbixina e o flavonóide quercetina, provenientes de urucum. Após 28 dias de tratamento, foi determinada a dosagem sorológica de colesterol de alta densidade (HDL) e triglicérides. A bixina apresentou a maior redução de colesterol (40%), em relação ao padrão, superior à redução obtida com a norbixina (25,35%) e quercetina (35,07%). A bixina apresentou, também, a menor redução do HDL, sendo isto uma vantagem, visto que o HDL transporta o colesterol da circulação sanguínea para o fígado, onde é metabolizado.

Segundo Lima *et al.* (2003), o efeito antioxidante da bixina e norbixina tem importância na prevenção de aterosclerose, uma vez que as lesões ateroscleróticas iniciam-se após algum tipo de lesão no endotélio, cujo dano é causado principalmente pela lipoproteína LDL oxidada, a inibição da oxidação, resulta na proteção do endotélio.

6. CONCLUSÕES

- Na determinação da composição centesimal do resíduo da semente do urucum foram encontrados teores altos de proteínas, carboidratos, fibras e mineral fixo, sendo o mesmo considerado como um alimento rico em fibra e fonte de proteína.
- Não foram detectados fatores antinutricionais avaliados (taninos, ácido fítico e inibidores de proteases).
- Os minerais mais abundantes encontrados no farelo do resíduo da semente do urucum foram o potássio e o sódio.
- O perfil da solubilidade mostrou que a proteína foi mais solúvel no pH 12 e o ponto isoelétrico no pH 3,8.
- A composição em aminoácidos mostrou concentrações importantes de lisina, isoleucina, leucina e fenilalanina + tirosina, os quais são superiores aos valores recomendados pela FAO/WHO (2007), para adultos.
- O aminoácido limitante foi a valina com escore químico de 0,22.
- O farelo do resíduo da semente do urucum e o isolado proteico apresentaram valor biológico inferior ao da proteína padrão, porém superiores a valores encontrados em outros vegetais, que se caracterizam por terem baixa qualidade proteica.
- A qualidade da proteína do resíduo da semente do urucum e da proteína do isolado não mostraram diferenças significativas.
- O colesterol total foi o único parâmetro que mostrou diferença significativa entre os grupos.
- Nos parâmetros bioquímicos o valor da creatinina dos grupos teste 1 (farelo da semente do urucum) e teste 2 (isolado proteico) diminuíram, indicando que a proteína do farelo e isolado proteico pode reduzir a creatinina.
- Os testes bioquímicos enzimáticos realizados no sangue dos animais no final do experimento não indicaram toxicidade hepática.
- Embora a pesquisa realizada tenha mostrado aspectos favoráveis ao aproveitamento do resíduo da semente na alimentação humana, é necessário a continuidade da mesma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar C, Augur C, Viniegra-González G, Favela E. A comparison of methods to determine Tannin Acyl Hydrolase Activity. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 1999; 42(3):355-361.
- Akrapunam MA, Sefa-Dedeh S. S. Some physicochemical properties and anti-nutritional factors of raw, cooked and germinated Jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Food Chem.* 1997; 59:121-5.
- Almeida JL, Almeida FCG, Nunes RP, Almeida FAG. Indução de enraizamento na micropropagação do urucuzeiro. *Rev. Fac. Agron.* 1995; 21:129-135.
- Almeida CAN, Ricco RG, Ciampo LA, Souza AM, Pinho AP, Oliveira JED. Fatores associados à anemia por deficiência de ferro em crianças pré-escolares brasileiras. *J. Pediatr.* 2004; 80:29-234.
- Almeida AS, Faleiros ACG, Teixeira DNS, Cota UA, Chica JEL. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *Bras. Patol. Mod. Lab.* 2008; 44(6):429-432.
- Anderson JJB. Minerais. In: Mahan LR, Escott-Stump S. Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. São Paulo: Roca. 2005; p. 115-155.
- Anselmo GCS, Mata MERMC, Rodrigues E. Comportamento Higroscópico do extrato seco de urucum (*Bixa orellana* L.). *Ciênc. Agrotec.* 2008; 6:1888-92.
- Antunes PI, Sgarbieri VC. Processing effects on heat treatment on the toxicity value of dry bean (*Phaseolus vulgaris* var. Rosinha) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chem.* 1980; 28(5):935:8.
- Antunes PL, Bilhalva AB, Elias MC, Soares GJD. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivares rico 23, carioca, pirata-1 e rosinha-G2. *Rev. Brás. de Agrociência.* 1995; 1(1):12-18.

Armour JC, Perera RLC, Bucham WC, Grant G. Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat treatment. *J. Sci. Food Agric.* 1998; 78(2):225-231.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 14a Ed. Official Methods of Analysis. Tannin in cloves and allspice. Official method 30.018; 30.019. 1984. p.364.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International, 12 ed. Washington; 1992. 1115p.

Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL, Santos AAS. BioEstat versão 4.0: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas. Belem: UFPA, 2005.

Barbosa Filho JM. *Bixa orellana*: Retrospectiva de usos populares, atividades biológicas, fitoquímica e emprego na fitocosmética, no continente americano. In: SIMBRAU – Simpósio Brasileiro de Urucum; 2006 abril 117-20; João Pessoa, Brasil.

Battestin V, Matsuda LK, Macedo GA. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alim. Nutr.* 2004; 15(1):71-80.

Bergmeyer HU, Herder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartato aminotransferase. *J. Clin. Chem. Biochem.* 1986; 24:497-510.

Bernardes NR, Glória LL, Nuntas CR, Pessanha FF, Muzitano MF, Oliveira DB. Quantificação dos teores de taninos e fenóis totais e avaliação da atividade antioxidante dos frutos de aroeira. *Vértices.* 2011; 13(3):117-128.

Bonett LP, Baumgartner MST, Klein AC, Silva LI. Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). *Arg. Ciênc. Saúde Unipar.* 2007; 11(3):235-46.

Borges VC, Ferrini MT, Waitzberg DL, Oliveira GPC, Boltoni A. Minerais. In: Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. Waitzberg DL. São Paulo: Atheneu. 2006; p. 117-150.

Borges JTS, Pirozi MR, Costa NMB, Bidigal JG. Qualidade porteica de pão de sal contendo farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.). Alim. Nutr. 2010; 21(1):109-117.

Brasil, Ministério da Saúde (SVS/MS). Secretaria da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Informação Nutricional Complementar. D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de janeiro de 1998.

Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2005a.

Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas e minerais. Brasília: Ministério da Saúde, 2005b.

Braz NM, Fuentes MFF, Freitas ER, Sucupira FS, Moreira RF, Lima RC. Semente residual do urucum na alimentação de poedeiras comerciais: desempenho e características dos ovos. Acta Sci. Anim. Sci. 2007; 29(2):129-133.

Bressani R. Chemical Composition, Amino Acid Content and Nutritive value of protein of the annatto seed (*Bixa orellana*). Arch Latinoameric. Nutr. 1983; 33(2):356-376.

Brune MFSS, Pinto MO, Peluzio MCG, Moreira MA, Barros EG. Avaliação bioquímica-nutricional de uma linhagem de soja livre do inibidor de tripsina Kunitz e de lectinas. Ciênc. Technol. Aliment. 2010; 30(3):637-63.

Cardoso MA. Nutrição Humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Cardoso LR, Oliveira MGA, Mendes FQ, Pires CV, Ribeiro FR, Santana RCO, Moreira MA. Atividade de inibidores de proteases em linhagens de soja geneticamente melhoradas. Alim. Nutr. 2007; 18(1):19-26.

Carlini CR, Grossi-de-sa MF. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. Toxicon. 2002; 40:1515-39.

Carvalho PRN, Carvalho CRL, Mantovani DMB. Estudo da composição de sementes, cachopas, folhas e galhos do urucuzeiro. In: Seminário Internacional de Corantes Naturais para alimento, 2. 1991; Campinas. Resumos: Campinas: ITAL, 1991. p. 317.

Carvalho AV, Garcia NHP, Farfán JA, Wada JKA. Caracterização de concentrado e isolado proteico extraído de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum). Braz. J. Food. Technol. 2009; 12(1):01-08.

Carvalho NPR, Silva PRG, Gomes M, Fabri E, Rocha TP, Spatti AL, Rodrigo L. Concentração de bixina e lipídios em sementes de urucum da Coleção do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Ciências Agrônômicas. 2010; 69(3):519-524.

Castro CB, Martins CS, Falesi IC, Nazaré RFR, Kato OR, Stein RLB, Venturieri MM. A Cultura do urucum. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. Brasília: Embrapa; 1994.

Cozzolino SMF. Recomendações de nutrientes. In: Cozzolino SMF. Biodisponibilidade de nutrientes. Barueri: Manoele; 2005. p.12-37.

Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Bioquímica Ilustrada. 4 ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.

Chaves MH, Barbosa AS, Moita Nesto JM, Aued-Pimentel S, Lago JHG. Química Nova. 2004; 27:404.

Chiaradia ACN. Determinação da estrutura de pigmentos de feijão e estudo da sua ação na qualidade proteica [Tese]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1997.

Coelho MAZ, Leite SGF, Rosa MF, Furtado AAL. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. Boletim do Ceppa. 2001; 19(1):33-42.

Constant PBL. Microencapsulamento de Bixina: agentes ecapsulantes, avaliação da qualidade e aplicações [Dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1999.

Constant PBL, Stringheta PC, Sandi D. Corantes Alimentícios. Boletim do Ceppa. 2002; 20(2):203-220.

Corrão-Panizzi MC, Mandarino JMG. Soja: Potencial de uso na dieta brasileira. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1998. (Documentos, 113)

Corrêa MP. Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF. 1978; 4:358-59.

Costa CLS, Chaves MH. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. Química Nova. 2005; 28(1):149-152.

De Angelis RC. Fisiologia da nutrição: fundamentos para nutrição e desnutrição. v. 1. São Paulo: EDART/Ed; 1997.

De Angelis RC, Tirapegui J. Fisiologia da Nutrição Humana: aspectos básicos, aplicados e funcionais. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2007.

Demonte A. Carboidratos. In: Dutra-de-Oliveira JE, Marchini JS. Ciências Nutricionais: Aprendendo a aprender. São Paulo: Savier; 2008; p.93-105.

Dias-Gómez NM, Domenech E, Barroso F, Castells S, Cortabarría C, Jiménez A. The effect of zinc supplementation on linear growth factors in preterm infants. *Pediatrics*. 2003; 111:1002-9.

Duarte MSL, Pereira CAS, Souza ECG, Conceição LL. Determinação da atividade *in vitro* de inibidores de tripsina do feijão (*P. vulgaris* L.) preto, albumina e globulina. *Alim. Nutr.* 2010; 21(3):373-6,

ECCLS. Determination of the catalytic activity concentration in serum of L-aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1, ASAT). *Klin Chem. Mitt.* 1989; 20:198-204.

Eisenstein RS, Ross KL. Novel roles for iron regulatory proteins in the adaptive response to iron deficiency. *J. Nutr.* 2003; 133:1510S – 1616S.

Empson KL, Labuza TP, Graf E. Phytic acid as a food antioxidant. *J. Food Sci.* 1991; 56(2):560-3.

Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1961; 95:271-5.

Ettinger S. Macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos. In: Mahan LR, Escott-Stump S. Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. São Paulo: Roca. 2005; p. 35-71.

Evangelista J. Tecnologia de alimentos. São Paulo: Atheneu; 2005.

Ferreira WA, Falesi IC. Características nutricionais do fruto e teor de bixina em urucum (*Bixa orellana* L.). Belém; Embrapa: CPATU. n. 97. 1989, 31p.

Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Evaluation on protein and amino acid requirements in Human Nutrition. Report of the joint FAO/WHO/UNU expert consultation on protein and amino acid requirement in human nutrition. Geneva: United Nation University. WHO Technical Report Series n° 935; 2007.

Francis G, Makkar HPS, Becker K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their affects in fish. *Aquaculture*. 2001; 199:197-227.

Franco CFO, Silva FCP, Cazé Filho J, Barreiro Neto M. Cultivo do urucuzeiro: técnicas e manejo. João Pessoa: Emepa; 2001.

Franco CFO, Silva FCP, Cazé Filho J, Barreiro Neto M, São José AR, Rebouças TNH, Fontinelli IS. Urucuzeiro: Agronegócio de Corantes Naturais. João Pessoa: Emepa, SAIA; 2002.

Franco CFO. O agronegócio do urucum na região nordeste. 1ª Reunião Nacional da Cadeia Produtiva do Urucum. 2007. CD-ROM.

Franco CFO. Corantes naturais de urucum (*Bixa orellana* L.) no tratamento da hiperlipidemia em animais e câncer em animais [Tese]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2008.

Franco CFO, Fabri EG, Barreiro Neto M, Manfiolli MH, Harder MNC, Rucker NCA. Urucum: Sistema de Produção para o Brasil. João Pessoa: Emepa; 2008.

Freitas JMD, Meneghini R. Iron and its sensitive balance in the cell. *Mutation Research*. 2001; 475:153-9.

Friedewald WT, Levy RI, Ferderickson DS. Estimation of the concentration of low-sensitivity lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972; 18:499-502.

Frota KMG, Soares RAM, Areas JAG. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2008; 28(2):470-6.

Fukuji TS, Ferreira DL, Soares AL. Prete CEC, Ida EI. Ácido fítico de híbridos de milho e alguns produtos industrializados. *Acta Sci. Agron*. 2008; 30(1):31-35.

Galante AP, Nogueira CS, Mari ETL. Biodisponibilidade de minerais. In: Silva SMCS, Mura JDP. Tratado de Alimentação, nutrição e dietoterapia. São Paulo: Roca; 2007. p. 105-114.

Giuliano G, Rosati C, Bramley PM. To dye or not to dye: Biochemistry of Annatto Unveiled. Trends in Biotechnology. 2003; 21:513-16.

Glória MM da, Regitano-d'arce MAB. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2000; 20(2):240-5.

Gonçalves JS. Valor Nutritivo e características fermentativas de silagens de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) cv. Roxo contendo níveis crescentes do subproduto da semente de urucum (*Bixa orellana* L.) [Monografia]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceara. 2004.

Gong H, Takami Y, Kitaoka T, Amemiya T. Corneal changes in Magnesium-deficient rats. Cornea. 2003; 22:448-56.

Grases F, Garcia-Ferragut L, Costa-Bauzá A, Mar JG. Study of the effects of different substances on the early stages of papillary stone formation. Nephron. 1996; 73(4):561-8.

Hasse JM, Matarese LE. Terapia clínica nutricional para distúrbios de fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: Mahan K, Escott-Stamp S. Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. São Paulo: Roca. 2002; p. 671-697.

Harris LE, Asplund JM, Crampton EW. An international feed nomenclature and methods for summarizing and using feed data to calculate diets. Utah Agricultural Expt. Sta. Bull. 1968.

Hambidge M. Human zinc deficiency. Journal of Nutrition. 2000; 130:1344S-1349S.

Henley EC, Kuster JM. Protein quality evaluation by protein digestibility – corrected amino acid scoring. *Food Technology*. 1994; 48(4):74-7.

Henrikson RL, Meredith SH. Amino acid analysis by reverse phase high performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136: 65-71.

Holden JM. Assessment of the quality of data in nutritional databases. *Bol. SBCTA*. 1997; 31(2):105-8v. 31, n. 2, p. 105-108, 1997.

Hots C, Brown KH. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food and Nutrition Boletim*. 2004; 25:S91-S203.

Iguti AM. Proteínas. In: Ribeiro EP, Seravalli EPG. *Química de Alimentos*. São Paulo: Blucher, 2007; p85-110.

Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Potassium, Sodium*. Washington: National Academy Press: 2005.

Jariwalla RJ. Anticancer effects of phytate. *Am J Clin Nutr*. 1992; 56(3):609.

Kaido T, Hashimoto H, Okamura H, Tsukaguchi K. Progressive severe anemia due to copper deficiency five years after subarachnoid hemorrhage. *J. Clin Neurosci*. 2005; 12:205-6.

Kass-Wolff JH. Calcium in Women: Healthy Bones and Much More. *Journal of Obstetric, Gynecologic and Neonatal Nursing*. 2004; 33:21-33.

Koul VK, Koul S, Tikoo CL. Process optimization for extraction and purification of bixin from annatto. *Indian J. Chem. Technol*. 2003;10:545-7.

Latta M, Eskin M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J. Agri. Food Chem*. 1980; 28:1313-15.

Lei XG, Porres JM. Phytase enzymology, applications and biotechnology. *Biotechnology letters*. 2003; 25(21):1787-94.

Lierner IE. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1994; 34(1):31-67.

Lima AO, Soares JB, Greco JB, Galizzi J, Cançado JR. Métodos de laboratório aplicados a clinica – Técnica e Interpretação. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001a.

Lima LRP, Oliveira TT, Nagen TJ, Pinto AS, Strigueta PC, Tinoco ALAS, Silva JF. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. *J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2001b; 38(4):196-200.

Lima LRP, Oliveira TT, Nagen TJ, Pinto AS, Lima EQ, Silva JF. Toxidade aguda de rutina e de *Bixa orellana*. *Acta Farm. Bonaerese*. 2003; 22(1):21-6.

Lima RJC, Moreno AJDM, Castro SFL, Gonçalves JRS, Oliveira ABO, Sasaki JM, Freire PTC. Taninos hidrolisáveis em *Bixa orellana*. *Quim. Nova*. 2006; 29(3):507-9.

Lourenço EJ. Tópicos de proteínas de Alimentos. Jaboticabal: FUNEP. 2000.

Macdonald RS. The role of zinc on growth and cell proliferation. *J. Nutr.* 2000; 130:1500-08.

Macedo MLR, Damico DCS. Effects of protein fractions from *Zea mays* L. on development and survival of Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus* (Boh.). *Insect Sci. Applplic.* 2000; 24(1):129-130.

Macedo MLR, Freire MGM, Cabrini EC, Toyama MH, Novello JC, Marangoni S, Matos DGG. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effects on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochim. Biophys. Acta.* 2003; 621:170-182.

Mafra D, Cozzolino SMF. The importance of zinc in human nutrition. *Revista de Nutrição*. 2004; 17:79-87.

Mafra D, Cozzolino SMF. Magnésio. In: Cozzolino SMF. Disponibilidade de Nutrientes. Barueri: 2005; p. 459-471.

Mahan LK, Escott-Stump S. Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 9 ed. São Paulo: Roca; 1998.

Maihara VA, Silva MG, Baldini VLS, Miguel AMR, Fávares DIT. Avaliação nutricional de dietas de trabalhadores em relação a proteínas, lipídeos, carboidratos, fibras alimentares e vitaminas. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2006; 26(3):672-7.

Malafaia G. O sinergismo entre a desnutrição proteica-calórica e a leishmaniose visceral. *Revista Saúde Com*. 2008; 4(2):134-147.

Malafaia G, Martins RF, Silva ME. Avaliação dos efeitos, em curto prazo, da deficiência proteica nos parâmetros físicos e bioquímicos de camundongos swiss. *Rev. Saúde e Biol*. 2009; 4(2):21-33.

Marzzoco A, Torres BB. *Bioquímica básica*. Guanabara. 2007

Matos AT de. Tratamento de resíduos agroindustriais. Curso sobre tratamento de resíduos industriais. Departamento de Engenharia Agrícola e Ambiental/UFV – Universidade Federal de Viçosa. Maio, 2005.

Mattos LL, Martins IS. Consumo de fibras alimentares em população adulta. *Rev. Saúde Pública*. 2000; 34(1):50-5.

Mercadante AZ, Pfander H. Carotenoids from annatto: a review. *Recent Research Developments in Agriculture and Food Chemistry*. 1998; 2:79-91.

Mercadante A, Pfander H. Caracterização de um novo pigmento minoritário de urucum. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2001; 21(2):193-6.

Messina M, Barnes S. The role of soy products in reducing risk of cancer. *Journal of National Cancer Institute*. 1991; 83(8):541-6.

Miller GD, Jarvis JK, McBean LD. The importance of meeting calcium needs with foods. *J. Am. Coll. Nutr.* 2001; 20:168S-185S.

Mohamed EA, Ahmed IAM, Babiker EE. Preservation of millet flour by refrigeration: changes in antinutrients, protein digestibility and sensory quality during processing and storage. *Res. J. Agric. Bio. Sci.* 2010; 6(4):411-6.

Monteiro JM, Albuquerque UP, Amorim ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*. 2005; 28(5):892-6.

Moraes JFV, Rabelo NA. Um método simples para a digestão de amostras de plantas. Brasília, DF: EMBRAPA – DDT/EMBRAPA – CNPAF, 1986. 12p. (EMBRAPA – CNPAF).

Moraes SA. Subprodutos da agroindústria e indicadores externos de digestibilidade aparente em caprinos [Tese]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

Moraes SA de, Saliba EOS, Neiva JNM, Borges I, Miranda PABB. Balanço Nitrogenado de caprinos alimentados com dietas contendo subproduto de urucum (*Bixa orellana* L.). In: V Congresso Nordestino de Produção Animal. Anais; 2008 nov 24-27; Aracaju, Brasil.

Moreira AA, Mandarino JMG, Neves-Souza RD, Leite RS. Comparação dos teores de ácido fítico entre as cultivares de soja Vmas e Vmas RR. In: I Simpósio de bioquímica e biotecnologia – SIMBBTEC; 2011, ago 15,16,17; Londrina, Brasil. Paraná: UEL; 2011.

Nacz M, Nichols T, Pink D, Sosulski F. Condensed tannins in canola hulls. *J. Agri. Food Chem.* 1994; 42(10):2196-2200.

Nagano T, Toyoda T, Tanabe H, Nagato T, Tsuchida T, Kitamrura A, Kasai G. Clinical features of hematological disorders caused by copper deficiency during long-term enteral nutrition. *Intrn Med.* 2005; 44:554-9.

Nonino-Borges CB, Borges RM. Macrominerais. In: Dutra-de-Oliveira JE, Marchini JS. *Ciências Nutricionais: Aprendendo a Aprender.* São Paulo: Sarviei. 2008; p. 93-105.

Nunes MC, Batista P, Raymundo A, Alves MM, Sousa I. Vegetable proteins and milk puddings. *Colloid Surface B.* 2003; 31:21-29.

Nunes H, Zanine AM, Machado TMM, Carvalho FC. Alimentos alternativos na dieta dos ovinos. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 2007; 15(4):141-151.

Olivares M, Uauy R. Essential nutrients in drinking water. In: *Nutrients in drinking water. Water, Sanitation and Health. Protection and the Human Environment.* World Health Organization – WHO. Geneva. 2005.

Oliveira JTA, Pusztai A, Grant G. Changes in organs and tissue an induced by feeding of purified kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins. *Nutri. Res.* 1988; 8(8):943-7.

Oliveira NTE. Energia metabolizável de alimentos e qualidade de ovos e carne de codornas japonesas alimentadas com rações contendo colorífico de urucum e niacina suplementar [Tese]. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2004.

Oliveira JS. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.) [Tese]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.

Oliveira MR, Fontes GG, Lima LM, Gomes AP, Vieira PAF, Siqueira-Batista R. Avaliação bioquímica do sangue. In: Calixto-Lima L, Reis NT. *Interpretação de exames laboratoriais aplicados à nutrição clínica.* Rio de Janeiro: Rubio. 2012.

Ordóñez JA, Rodriguez MSC, Alvarez LF, Sanz MLG, Miguilón GDGF, Perales LH, Cortecero MDS. Componentes dos alimentos e processos. 2005.

Ost PR, Rodrigues PB, Freitas RTF, Fialho ET, Bertechini AG, Silva HO. Aminoácidos digestíveis verdadeiros de alguns alimentos proteicos determinados em gatos cecotomizados e por equações de predição. *Tras. Zootec.* 2007; 36(6):1820-8.

Park SJ, Kim TW, Baik B. Relationship between proportion and composition of albumins, and *in vitro* protein digestibility of raw and cooked pea seeds (*Pisum sativum* L.). *J. Sci. Food Agric.* 2010; 90:1719-25.

Paschoini JR. Nutricum: a proteína e o corante natural do urucum. São Sebastião do Paraíso: Paschoini Agro Ltd; 2000.

Paz J, Baldochi MR, Paz K, Prado FO, Martins CHG, Lopes RA, Ribeiro AF, Sala MA. Estudo hematológico em ratos sob ação de plantas medicinais. XXXVIII. Ação da bixina, um corante alimentar natural extraído de *Bixa orellana* L. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2006; 8(4):157-161.

Pechnick E, Guimarães LR, Panek A. Sobre o aproveitamento da folha da mandioca (*Manihot* sp) na alimentação humana. *Arq. Bras.Nutr.* 1962; 18(1-2):11-23.

Pedrosa JP, Cirne LEMR, Neto JM M. Teores de bixina e proteína em sementes de urucum em função do tipo e do período de armazenagem. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* 1999; 1(1):121-123.

Pellet PL, Young VR. Nutritional evaluation of protein foods. Tokyo: The United Nations University. 1980.

Pereira ES, Regadas Filho JGL, Freitas ER, Neiva JNM, Cândido MJD. Valor energético de subprodutos da agroindústria brasileira. *Arch. Zootec.* 2009; 58(223):455-8.

Pimentel FA, Stringheta PC. Produção de corantes de urucum em pó, por meio de precipitação ácida, a partir de extratos obtidos em diferentes soluções extratoras. *Rev. Bras. Cor. Nat.* 1999; 3(1):53-7.

Pires CV, Oliveira MGA, Rosa JC, Costa NMB. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2006; 26(1):179-187.

Preston HD, Rickard MD. Extraction and chemistry of annatto. *Food Chem.* 1980; 5:47-56.

Queiroz VAV, Vizzoto M, Carvalho CWP, Martino HSD. O sorgo na alimentação humana. Circular Técnica, 133. Ministério da Agricultura Pecuária e Abatecimento. Sete Lagoas: Embrapa Sorgo e Milho. 2009.

Reddy NP, Eswara JM. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Acta Physiological Plantarum.* 2002; 24:285-290.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Junior GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition and HocWriting Committee on the reformulation of the AIN-76 A rodent diet. *J. Nutr.* 1993; 123(11):1939-1951.

Revista Globo Rural, 2007. O Brasil redescobre o urucum. http://revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg_article_print/1,3916,1649504-1641-1,00.html. Acesso em 20.04.2012.

Rodrigues PB, Rostagno HS, Albino LFT, Gomes PC, Barboza WA, Nunes RV. Aminoácidos digestíveis verdadeiros do milheto, do milho e subprodutos do milho, determinados com galos adultos cecectomizados. *Rev. Bras. Zootec.* 2001; 30(6S):2046-58.

Rosa LCC. Corantes naturais em alimentos: preferência do consumidor e aplicação industrial [Dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2004.

Rosa M F, Souza Filho MSM, Figueiredo MCB, Moraes JPS, Santaella ST, Leitão RC. Valorização de resíduos da agroindústria. In: II Simpósio Internacional sobre

gerenciamento de resíduos agropecuários e agroindustriais. mar 15-17; Foz do Iguaçu, Brasil. 2011; 1:98-105.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, Ferreira AS, Barreto SLT, Euclides RF. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3 ed. Viçosa: UFV, DZO; 2011

Sabatier M, Arnaud MJ, Kastenmayer P, Rytz A, Barclay DV. Meal effect on magnesium bioavailability from mineral water in healthy women. Am. J Clin. Nutr. 2002; 75:65-71.

Sandi MP, Cuen, Bacerra, Rosalba. Biodiversitas, El achiote, Boletín Bimestral de la comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. 2003; 7(46):7-11.

Salinas J, Garcia R, García R. Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Programa de Pastos Tropicalis. Cali, Colombia, 1985. 83p.

Salunkhe DK, Jadhav SJ, Kadam SS, Chavan JK. Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legume. Crit. Rev. Food Sci. Nutri. 1982; 17(3):277-305.

Salunkhe DK, Chavan JK, Kadam SS. Dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton: CRC Press. 1990.

Santos MRV, Souza VH, Menezes IAC, Bitencurt JL, Rezende Neto JM, Barreto AS, Cunha FA, Marçal RM, Teixeira Silva F, Wuíntans Júnior LJ, Barbosa APO. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo biotério central da Universidade Federal de Sergipe. Scientia Plena. 2010; 6(10):1-6.

Seena S, Sridhar KR, Jung K. Nutritional and protein quality evaluation of thermally treated seeds of *Canavalia maritima* in the rat. Nutrition Research. 2005; 25(6):587-596.

Sgarbieri VC. Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: Almed; 1987a.

Sgarbieri VC. Métodos de avaliação da qualidade nutricional dos alimentos. In: Sgarbieri VC. Alimentação e nutrição – fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: Almed; 1987b; p. 250-261.

Sgarbieri VC. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificações. São Paulo: Varela; 1996

Shuhama IK, Aguiar ML, Oliveira WP, Freitas LAP. Experimental production of annatto powders in spouted bed dryer. J. Food Eng. 2003; 59(1):93-7.

Silva, MR; Silva, MAAP. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. Rev. Nutr., Campinas, 12(1): 5-19, 1999.

Silva FCP, Franco CFO. Urucuzeiro: uma alternativa de Agronegócio. João Pessoa: EMEPA-PB, Banco do Nordeste; 2000.

Silva MR, Silva MAAP. Fatores Antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. Revista de Nutrição. 2000; 13(1):3-9.

Silva JHV. Produção científica em nutrição de aves. Contribuição da UFPB nos últimos cinco anos. Cananeiras: DAP/UFPB, 2003. 31p.

Silva JHV, Silva EL, Jordão Filho J, Ribeiro MLG. Efeitos da inclusão do resíduo da semente de urucum (*Bixa orellana* L.) na dieta para de frangos de corte: desempenho e características de carcaça. Rev. Bras. Zootec. 2005; 34(5):1606-13.

Silva JHV, Silva ED, Jordão Filho J, Ribeiro MLG, Costa FGP. Resíduo da semente de urucum (*Bixa orellana* L.) como corante da gema, pele, bico e ovário de poedeiras avaliado por dois métodos analíticos. Cienc. Agrotecnol. 2006a; 30(5):988-994.

Silva MS, Naves MMV, Oliveira RB, Leite OS. Composição química e valor proteico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2006b; 26(3):571-6.

Silva PI, Nachtigall AM, Stringheta PC. Fatores que influenciam a reação de saponificação dos carotenóides presentes no urucum (*Bixa orellana* L.) [edição especial]. Ciên. Agrotecnol. 2009; 3:1892-7.

Souza ECG. Efeito de bixina sobre os parâmetros bioquímicos séricos em ratos [Tese]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2001.

Souza AVC. Interpretando os índices de conversão alimentar (I.C.A) e de eficiência alimentar (I.E.A). Poli-Nutri Alimentos. Artigo tecnico. Setembro: 2003.

Souza EL, Pinto ICS, Oliveira MEG, Donato NR, Cambuim RB. Fatores antinutricionais: elementos de interferência sobre a biodisponibilidade de nutrientes. Higiene Alimentar. 2005; 19(131):19-23.

Souza LF. Ação antioxidante de compostos bioativos do urucum – bixina [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.

Teske M, Trentini AM. Herbarium Compêndio de Fitoterapia. 4 ed. Curitiba: Herbarium Lab. Bot. Ltda; 2001.

Tirapegui J, Castro IA, Rossi L. Biodisponibilidade de proteínas. In: Cozzolino SMF. Biodisponibilidade de Nutrientes. Barueri: Manole; 2005. p.67- 124.

Tirapegui J, Rogero MM, Lajolo FM. Proteínas e Aminoácidos. In: Dutra-de-Oliveira JE, Marchini JS. Ciências Nutricionais: Aprendendo a aprender. São Paulo: Sarvier. 2008; p. 53-91.

Tonani F. Estudo do valor nutritivo da semente do urucum (*Bixa orellan* L.) e seu efeito sobre o desempenho de bovinos de corte. Jaboticabal: FCAV/UNESP, Depto.

De Zootecnia de Não-Ruminantes, 1995. 11p. (Parecer técnico apresentado à Paschoini Agro Ltda, São Sebastião da Grama).

Tonani FL, Ruggieri AC, Guim A, De Andrade P, De Queiroz A C, Santos HQ, Milheiros EB. Avaliação Nutricional do resíduo de urucum (*Bixa orellana* L.), após a extração do corante. ARS Veterinária. 2000; 16(2):118-21.

Torre M, Rodrigues AR, Saura-Calixto F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1991; 1(1):1-22.

Torres EAFS, Campos NC, Duarte M, Garbelotti ML, Philippi ST, Minazzi-Rodrigues RS. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2000; 20(2):145-150.

Urbano GM, López-Jurado M, Aranda P, Vidal-Valverde C, Tenorio E, Porres J. Papel del ácido fítico en los legumbres (minirevisión), J. Physiol. Biochem. 2000; 56(3):283-294.

Utiyama CE. Utilização do resíduo de sementes processadas de urucum (*Bixa orellana* L.) na alimentação de suínos em crescimento [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2001.

Utiyama CE, Miyada VS, Figueiredo AN, *et al.* Digestibilidade de nutrientes do resíduo de semente processadas de urucum (*Bixa orellana*) para suínos. Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia. 39. Anais... Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2002. CD-ROM.

Vallue BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. Physiological Reviews. 1993; 73:79-118.

Varian Australia Pty Ltn. Flame Atomic Absorption Spectrometry (analytical methods). SpectrAA 220FS. Publication no. 85-100009-00. March, 1989.

Vieira CR, Cabral LC, De Paula ACO. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. *Pesq. agropec. bras.* 1999; 34(7):1277-83.

Waitzberg DL, Logullo P. Proteínas. In: Waitzberg DL. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica.* São Paulo: Atheneu. 2006; p. 35-54.

Weiss JF, Landauer MR. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. *Toxicology.* 2003; 189:1-20.

Wiegert EVM, Calixto-Lima L, Costa NMB. Minerais. In: Calixto-Lima L, Reis NT. *Interpretação de exames laboratoriais aplicados à nutrição clínica.* Rio de Janeiro: Rubio; 2012. P. 135-152.

Witisuwannakul R, Witisuwannakul C, Sakulborirug A. Lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry.* 1998; 36:899-905.

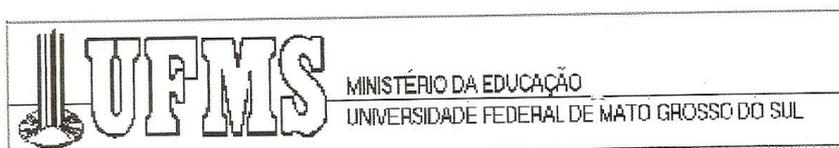
Wilkens KG. Terapia clínica nutricional nos distúrbios renais. In: Mahan K, Escott-Stump, S. Krause: *Alimentos, Nutrição e Dietoterapia.* São Paulo: Roca. 2002; p. 806-858.

Wolf WJ, Cowan JC. Soybeans as a food source. *CRC Critical Reviews in Food Technology,* 1971; 1:81-158.

Wurts ML, Torreblanca RA. Analisis de la semilla *Bixa orellana* L. (Achiote) y del desecho generado en la extracción de sus pigmentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 1983; 33(3):606-619.

Zhou JR, Fordyce J, Raboy V, Dickinson DB, Wong MS, Burns RA, Erdman JW. Reduction of phytic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats. *Journal of Nutrition.* 1992; 122(12):2466-73.

ANEXO



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 267 da Mestranda Melissa Alessandra Valério, sob a orientação da Prof^a **Maria Isabel Lima Ramos**, referente ao projeto de pesquisa "**Qualidade nutricional da semente do urucum (Bixa orellana L.) para uso em alimentação humana**", 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 19 de agosto de 2010.

Campo Grande (MS), 23 de agosto de 2010.

Dr^a Joice Stein

Presidente em exercício da CEUA