



CAMILA SALES DE REZENDE

**PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE ORA-PRO-
NOBIS (*Pereskia aculeata* Miller) POR USO DE
ÁLCOOL**

**LAVRAS – MG
2021**

CAMILA SALES DE REZENDE

**PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia
aculeata* Miller) POR USO DE ÁLCOOL**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Bacharel.

Prof^a. Dr^a. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo
Orientadora

MSc. Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2021**

CAMILA SALES DE REZENDE

**PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata*
Miller) POR USO DE ÁLCOOL**

**PRECIPITATION OF ORA-PRO-NOBIS PROTEINS (*Pereskia aculeata* Miller)
BY USE OF ALCOHOL**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Bacharel.

APROVADO em 05 de março de 2021.

Prof^a. Dr^a. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo UFLA

Prof. Dr. Jaime Vilela de Resende UFLA

MSc. Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira UFLA

Dr^a. Isabelle Cristina Oliveira Neves UFLA

Prof^a. Dr^a. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo
Orientadora

MSc. Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2021**

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares por sua confiança e presença, em especial aos meus pais, Sérgio e Ester, pois sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus amigos que se tornaram família, Paula, Thamires, Flávia e Sabrina.

À minha orientadora Lizzy pelo apoio e ajuda no primeiro passo nessa jornada do Trabalho de conclusão de curso e à minha coorientadora Ana Cristina por todas as orientações, apoio e auxílio neste trabalho.

Aos professores que dedicaram seu tempo e foram essenciais à minha formação profissional e evolução pessoal.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos pela estrutura, suporte e disponibilização dos materiais.

A todos, meu muito OBRIGADO!

RESUMO

A *Pereskia aculeata* Miller, conhecida como ora-pro-nobis (OPN) é uma planta perene, pertencente à família *Cactaceae* e tem o cultivo amplamente distribuído no território brasileiro, podendo ser encontrada desde a Bahia até o Rio Grande do Sul. Esta é um exemplo de planta alimentícia não convencional (PANC) que apresenta simplicidade de cultivo, alta produtividade e fácil propagação. A folha de ora-pro-nobis se destaca pelo seu alto conteúdo proteico, com proteínas de alta digestibilidade e pela presença de mucilagem e nutrientes. Diante disto, a obtenção das proteínas de OPN purificadas torna-se de grande importância. Uma técnica de purificação frequentemente utilizada é a precipitação alcoólica. Essa técnica tem potencial industrial, devido à sua eficiência, baixa toxicidade, possibilidade de recuperação do solvente e custo. Neste trabalho, estudou-se a precipitação das proteínas do ora-pro-nobis com o uso de álcool isopropílico. Para tanto, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial completo, no qual avaliou-se o efeito do pH (2; 3,5 e 5) do extrato de ora-pro-nobis e proporção de álcool isopropílico: extrato de ora-pro-nobis (1:1; 2:1 e 3:1 v/v) na precipitação dessas proteínas. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ao nível de significância de 5%. O ensaio que apresentou maior porcentagem de precipitação ($99,22 \pm 0,36$ %) foi obtido utilizando concentração intermediária de solvente (2:1) e pH 3,5. Os resultados indicam que o álcool isopropílico é um solvente orgânico eficiente na precipitação das proteínas do OPN.

Palavras-chave: Ora-pro-nobis. Proteína. Precipitação com solvente orgânico. Álcool isopropílico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ora-pro-nobis (<i>Pereskia aculeata</i> Miller)	12
Figura 2 - Solubilidade da proteína em função do pH.....	18
Figura 3 - Esquema do mecanismo de agregação das proteínas por interações eletrostáticas entre superfícies com cargas de sinais opostos em meio aquoso contendo solvente orgânico	20
Figura 4 - Estrutura química do álcool isopropílico.....	21
Figura 5 - Fluxograma do processo de preparo do extrato de ora-pro-nobis.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento experimental aplicado para a avaliação da precipitação das proteínas da ora-pro-nobis.....	25
Tabela 2 - Resultados médios da porcentagem de proteínas precipitadas em função dos tratamentos avaliados.....	27
Tabela 3 – Resultados médios da porcentagem de proteínas precipitadas em função dos tratamentos avaliados.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
OPN	Ora-pro-nobis
PANC	Planta Alimentícia não Convencional
%PP	Porcentagem de precipitação (%)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Ora-pro-nobis (<i>Pereskia aculeata</i> Miller)	12
2.1.1	Aplicação de ora-pro-nobis em novos produtos.....	13
2.2	Proteínas	15
2.2.1	Proteínas foliares	15
2.3	Processo de extração de proteínas.....	16
2.4	Precipitação de proteínas	17
2.4.1	Fatores que influenciam na precipitação das proteínas.....	17
2.5	Precipitação de proteínas a partir de álcool isopropílico.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1	Instalações	24
3.2	Materiais	24
3.3	Obtenção do extrato de ora-pro-nobis.....	24
3.4	Delineamento experimental	25
3.5	Precipitação das proteínas de OPN.....	26
3.6	Quantificação das proteínas da OPN.....	26
3.7	Análise estatística.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
4.1	Precipitação de proteínas	27
5	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

As proteínas estão presentes nos mais diversos alimentos em diferentes proporções. Os alimentos de origem animal como carnes, ovos, leite e derivados, são os que contêm maior quantidade deste macronutriente, também encontrado em menor proporção em cereais integrais, feijões, legumes e vegetais folhosos. Segundo a RDC n.º 269, de 22 de dezembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o índice de proteína ideal recomendado para adultos é de 50 g por dia. Análises estatísticas indicam que as necessidades anuais de proteína requerida pelos 7,3 bilhões de pessoas no mundo somam cerca de 202 milhões de toneladas (GEA, 2018).

Tradicionalmente, as proteínas de origem animal são as mais exploradas, contudo, visando atender às necessidades nutricionais da população e a demanda por macromoléculas alimentícias técnico-funcionais, a indústria de alimentos vem buscando otimizar e flexibilizar a extração de proteínas em diferentes fontes. Dessa forma, observamos a crescente preocupação da indústria em desenvolver e melhorar processos de fabricação industrial sustentáveis e um aumento no uso de proteínas de origem vegetal (GEA, 2018).

A pecuária representa uma fonte de proteína alimentar bastante explorada, porém demanda grande uso de recursos hídricos e de extensão de terra, o que não acontece com a proteína proveniente de plantas. Nesse contexto, o cultivo de plantas de baixo custo e fácil cultivo é uma atividade que vem crescendo cada dia mais. O uso de hortaliças não convencionais é uma forma interessante de oferecer alimentação de qualidade e em quantidade para a população (FAO, 2014).

As plantas alimentícias não convencionais (PANCs) se enquadram perfeitamente nesse contexto e são parte importante de nossa biodiversidade. As PANCs são caracterizadas por espécies que possuem uma ou mais partes comestíveis, sendo elas espontâneas ou cultivadas, nativas ou exóticas. Podem também ser entendidas como aquelas que não estão no cardápio cotidiano brasileiro ou não são produzidas em sistemas convencionais (KINUPP; BARROS, 2007). Grande parte se desenvolve espontaneamente em diferentes ambientes e climas, enquanto outros tipos necessitam de cultivo simples e de poucas exigências, com excelente adaptação ao meio sem a necessidade de fertilizantes ou agrotóxicos (FUHR, 2016; SOUZA et al., 2009).

A flora brasileira possui uma extensa biodiversidade de plantas com propriedades nutricionais significativas. Como exemplo, têm-se a *Pereskia aculeata* Miller ou

comumente conhecida como ora-pro-nobis. Esta planta alimentícia é encontrada em grande extensão do território nacional e é popularmente conhecida como “carne de pobre”, devido sua alta concentração proteica, além de conter fibras, vitaminas e minerais (MARTIN et al., 2017). Uma das técnicas bastante utilizada para purificação de proteínas é a precipitação.

A técnica de precipitação das proteínas é utilizada como uma etapa preliminar na purificação das proteínas e pode ser realizada pela via física, química e físico-química (WATANABE, 2007). É uma técnica simples e rápida para a concentração de proteínas e apresenta vantagens como a redução do volume do meio reacional para estágios posteriores (ZUÑIGA et al., 2003).

A precipitação de proteínas pode ser realizada empregando solventes orgânicos, entre eles etanol e álcool isopropílico. Estes promovem a desidratação molecular e redução da constante dielétrica do meio, de forma que facilitam a agregação molecular e consequentemente a precipitação (CAVALCANTI; SANTANA, 2019).

Nas últimas duas décadas, o interesse pela extração de proteínas vegetais apresentou um crescente aumento devido à demanda e necessidade de fontes alternativas de proteína com aplicações em alimentos e rações, além do desenvolvimento tecnológico e avanços biotecnológicos que podem facilitar a implementação industrial de processos de extração de proteína (SANTAMARÍA-FERNÁNDEZ; LUBECK, 2020). As propriedades funcionais das proteínas vegetais nos alimentos, podem ser usadas com a finalidade de melhorar a textura e estabilidade dos produtos, bem como sua capacidade de absorção de água e óleo auxilia na emulsificação, capacidade de formação de espuma e geleificação (RODRIGUES; COELHO; CARVALHO, 2012).

Neste contexto, concentrados proteicos foram obtidos por diferentes fontes vegetais, como folhas de *Ficus deltoidea* (ABDULLAH; CHUA; RAHMAT, 2017), de folhas de jaca (*Artocarpus heterophyllus Lam*) (CALDERON-CHIU et. al, 2021), leguminosas (FONSECA, 2019), farelo de oleaginosas (GRANDE, 2016), alfafa (*Medicago sativa*) (KOSHCHUH et al., 2004), fruto e folha do morangueiro (*Fragaria ananassa*) (MELLINGER, 2012), folhas de beterraba (*Beta vulgaris L.*) (TENORIO et. al, 2016), nervura central da folha de milho (*Zea mays L.*) (WANG et. al, 2016).

Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a precipitação da proteína de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) em função do pH e concentração de álcool isopropílico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller)

A espécie vegetal *Pereskia aculeata* Miller, mais conhecida como ora-pro-nobis (OPN), é pertencente à família *Cactaceae*, originária da América tropical e encontrada em grande extensão do território brasileiro, desde a Bahia até o Rio Grande do Sul. Apesar de estar presente em toda esta extensão, tem destaque como importância cultural nos estados de Minas Gerais e Goiás. O ora-pro-nobis também pode ser encontrada pelos nomes groselheira-das-antilhas, lobrobó, groselha-da-américa e groselheira-de-barbados (BRASIL, 2010; TOFANELLI; RESENDE, 2011).

Este vegetal é uma trepadeira arbustiva nativa da flora brasileira e tem como característica ser uma planta perene, semiereta e com folhas suculentas, como mostra a Figura 1. Suas flores, em cachos, são brancas ou podem conter listras róseas, sendo muitas vezes cultivadas por apicultores devido seu néctar e pólen. Os frutos são pequenas bagas amareladas e com espinhos (BRASIL, 2010). Sob o aspecto de cultivo o OPN se destaca, devido à sua alta resistência às restrições hídricas do solo e sua facilidade em adaptação ao clima quente, sendo, portanto, uma planta de fácil cultivo e propagação (TOFANELLI; RESENDE, 2011).

Figura 1 - Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller).



Fonte: BOTREL et. al (2018).

Esta espécie tem sido cultivada em pequena escala, utilizada como hortaliça, cultivada como cerca viva pela presença de espinhos e folhagem robusta e também para fins ornamentais (BOTREL et al., 2018). Contudo, vem sendo alvo de interesse da

indústria alimentícia, na forma desidratada para agregar valor nutricional em pães, massas e biscoitos ou até mesmo farmacêutica, quando aplicada para correção de sabor de fármacos ou para formulação de cremes e pomadas (ROCHA et al., 2008; SILVA; AZEVEDO; AZEVEDO, 2015).

Na culinária, devido à sua característica mucilagínosa, é aproveitada em sopas, refogados, mexidos e omeletes. No estado de Minas Gerais, as folhas são utilizadas em refogados ou em pratos principais com aves, que traz referência ao tradicional prato “frango com ora-pro-nóbis”, muito consumido em cidades históricas como Tiradentes e Sabará (BRASIL, 2010).

As folhas de *Pereskia aculeata* Miller possuem importantes qualidades nutritivas, como alto teor de carboidrato, lisina, cálcio, fósforo, magnésio, ferro, cobre e, principalmente, alto teor de proteínas (GARCIA, et al. 2019; TOFANELLI; RESENDE, 2011). Devido aos elevados teores de proteínas apresentados pelas cactáceas do gênero *Pereskia*, essa planta é denominada “carne de pobre” (ROCHA et al., 2008). Algumas pesquisas relatam que seu teor de proteína bruta varia de 17,4% a 25,4% em relação à matéria seca (ALMEIDA FILHO; CAMBRAIA, 1974; ROCHA et al., 2008).

Suas proteínas apresentam ainda alta digestibilidade (85%) e são constituídas de alto teor de aminoácidos essenciais, especialmente a lisina, cujo o conteúdo é maior quando comparado a alimentos semelhantes. Os níveis de proteína e aminoácidos encontrados são substancialmente mais altos do que a quantidade mínima recomendada pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) (CONCEIÇÃO, et al., 2014; TAKEITI et al., 2009).

Kinupp e Barros (2007) comparou o teor de ferro em alimentos não convencionais e observou como resultado um teor de 14 mg/100 g, em ora-pro-nóbis, valores expressivos quando comparada as espécies reconhecidas como fontes de ferro, como o espinafre (4,48 mg/100 g); a beterraba cozida (2,13 mg/100 g) e a couve-manteiga refogada (2,70 mg/100 g). Além disso, possuem alto teor de carboidratos, cálcio, fósforo, magnésio e cobre.

2.1.1 Aplicação de ora-pro-nobis em novos produtos

Na indústria de alimentos uma das áreas de grande destaque é o setor de desenvolvimento de novos produtos. Através de pesquisa de tendências de mercado,

verifica-se a necessidade de utilização de aditivos de fontes naturais. A utilização das folhas da OPN se torna interessante devido ao seu conteúdo de hidrocoloides.

As folhas desta planta contêm polissacarídeos complexos altamente ramificados. Encontra-se arabinofuranose, arabinopiranosose, galactopiranosose, galactopiranosil, ácido urônico e unidades de ramnopiranosose. Os mesmos são altamente aplicados como aditivos na tecnologia de alimentos. Em produtos de panificação os hidrocoloides auxiliam na melhora de textura, retardamento da retrogradação do amido e aumento da retenção de umidade (AMARAL et al., 2018; MARTIN et al., 2017).

Amaral e colaboradores (2018) desenvolveram um produto lácteo fermentado através de um *blend* de mucilagem de OPN, goma guar e goma Arábica. O experimento objetivou determinar uma mistura adequada dos hidrocoloides e avaliar, a partir das propriedades físico-químicas, reológicas e microestrutura da bebida, se a mistura poderia ser aplicada à bebidas lácteas fermentadas. Foi determinado que a mucilagem de OPN pode ser considerada um aditivo utilizado com a função gelificante e emulsificante, e assim viável para substituição de gordura e manutenção da qualidade durante o prazo de validade de bebidas lácteas fermentadas.

A mucilagem da OPN também foi estudada por Oliveira et al. (2019), para o desenvolvimento de um filme biodegradável para possível substituição de plástico. O experimento observou que a mucilagem da OPN tem capacidade de formar filmes podendo ser potenciais substitutos as embalagens provenientes do petróleo.

Contudo, as folhas de OPN podem ser de grande valor também no seu aspecto proteico. Além da mucilagem, a folha integral pode ser processada através de operações unitárias. A obtenção de um pó proteico viabiliza seu uso para suplementação nutricional, preocupação recorrente atualmente. Santana et al. (2018) desenvolveram um suplemento alimentar utilizando as folhas de OPN que após ser analisado, verificou-se um alto teor de proteínas e fibras, valores que ultrapassaram 25% do total nas folhas.

Rocha e colaboradores (2008), introduziram a OPN na massa de macarrão para enriquecimento nutricional da mesma. De acordo com Abimapi (2020), o Brasil é o terceiro produtor mundial e o quarto mercado consumidor de macarrão, assim, a adição de OPN possibilitaria a melhora nutricional de um produto altamente consumido e essencialmente composto por carboidrato. No trabalho adicionou-se apenas 2% de OPN desidratada para que a massa obtivesse aspecto firme e consistente e principalmente, elevando os teores de proteínas e fibras sem que prejudicasse aspectos sensoriais.

Além de sua utilização como alimento, na medicina, as folhas de OPN são empregadas na indústria farmacêutica compondo cremes, pomadas e também na correção do sabor de fármacos, além de efeitos anti-inflamatórios (SILVA; AZEVEDO; AZEVEDO, 2015) ou também podem ser empregadas para tratamentos de distúrbios renais, processos anti-inflamatórios e cura de feridas na pele (GARCIA, et al. 2019; TOFANELLI; RESENDE, 2011).

2.2 Proteínas

2.2.1 Proteínas foliares

É de conhecimento geral que as proteínas são macromoléculas de extrema importância nos mais diversos processos biológicos, atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através de membranas celulares e outros. Porém, para que possam ser utilizadas desenvolvendo funções tecnológicas é necessário a extração e purificação das mesmas (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

Quando se trata de proteína e seu valor biológico, a comunidade científica relata que as de origem animal são melhores do que as de origem vegetal. Contudo, pensando em poder aquisitivo, parte da população tem acesso limitado às proteínas animais. A busca por espécies vegetais com alto valor nutritivo, ricas em proteína, pode auxiliar no combate as deficiências nutricionais alimentares enfrentadas (KINUPP; BARROS, 2008). Segundo Fasuyi e Aletor (2005) as folhas representam uma importante fonte de proteínas.

O interesse por proteínas foliares também é justificado por sua abundância natural. Em termos agronômicos, uma produção baseada em kg por ano, a cada hectare plantado de proteína foliar, produz-se vinte vezes mais do que proteína láctea e até cem vezes mais do que a proteína bovina (GUERROUÉ et al., 1996). Outros fatores a serem considerados são disponibilidade de matéria prima, baixo custo e por não ser fonte de doenças transmitidas por alimentos (SILVA; AZEVEDO; AZEVEDO, 2015).

Além da melhora na qualidade nutricional, as proteínas vegetais contribuem para a estabilidade e textura dos produtos. Elas influenciam na emulsificação, na capacidade de formação de espumas e na gelificação. Contudo, essas propriedades vão depender das características físico-químicas das proteínas, como sua massa molecular, composição dos aminoácidos, carga líquida e hidrofobicidade (SILVA; AZEVEDO; AZEVEDO, 2015).

Algumas pesquisas reportam a obtenção de proteínas das folhas de mandioca (MODESTI et al., 2007; TEO et al., 2010), da folha do capim elefante (*Pennisetum purpureum schum*) (DERENZO; ALDEIA, 2003), da folha de ora-pro-nobis (MORAIS; NEVES; BATISTA, 2019), folhas de uva de urso (*Arctostaphylos uva-ursi sprengel*) (NACZK; PEGG; AMAROWICZ, 2011), empregando métodos de extração que visem alta eficiência do processo.

2.3 Processo de extração de proteínas

O processo de extração pode ser descrito como uma operação físico-química de transferência de massa, onde os sólidos solúveis e voláteis podem ser removidos de sua matriz devido ao contato com algum tipo de solvente (VEGGI, 2009). A transferência de sólidos biológicos para um solvente é uma operação tradicional na agroindústria e farmacêutica (POIROT et al., 2007). Contudo, o controle das condições do processo é fundamental para reprodutibilidade dos produtos finais e preservação de sua bioatividade.

Ao se utilizar plantas como matéria prima, o rendimento dos compostos presentes na planta é altamente influenciado pelas condições de processamento empregados. Fatores como solvente, temperatura de extração e ação mecânica devem ser cuidadosamente avaliados. Além disso, a matriz vegetal é vista como não homogênea e apresenta uma microestrutura complexa formada por células, espaços intracelulares, capilares e poros. A extração é influenciada pela estrutura molecular do soluto, o tamanho, localização e a ligação com outros componentes. As características químicas do solvente e a estrutura e composição diversas do produto natural asseguram que cada sistema material-solvente mostra comportamento peculiar, o qual não pode ser previsto facilmente (PINELO et al., 2004).

A extração de proteínas na indústria, quando se objetiva extrair ou separar diferentes componentes de sua matriz, é realizada comumente com uso de solventes, podendo ser orgânicos ou aquosos. No caso de proteínas, o princípio ao qual se baseiam é a solubilidade destas moléculas. Deste modo, é importante levar-se em consideração que proteínas vegetais são em sua maioria ácidas e assim vão ser solubilizadas em meios alcalinos. Portanto, a precipitação química é uma técnica bastante explorada para extração de proteínas e obtenção de extratos proteicos (GRANDE, 2016).

2.4 Precipitação de proteínas

O processo de precipitação e posterior recuperação de proteínas através de adição de reagentes ou de soluções é uma boa maneira de concentrar proteínas. É uma técnica relativamente simples e rápida, bastante empregada pelas indústrias como operação inicial em um processo de purificação (ZUÑIGA et al., 2003).

As propriedades funcionais das proteínas são facilmente afetadas por sua solubilidade. A solubilidade de uma proteína é o fenômeno termodinâmico do equilíbrio entre interações proteína-proteína e proteína-solvente (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Dentro das características de solubilidade, as principais são de natureza hidrofóbica e eletrostática. As interações hidrofóbicas são as que promovem interações do tipo proteína- proteína e resultam na diminuição da solubilidade. Em contra partida, as interações eletrostáticas promovem interações proteína-solvente, o que aumenta a solubilidade. A presença de cargas elétricas introduz dois tipos de forças repulsivas entre as moléculas da proteína em solução, favorecendo a solubilização das mesmas. A primeira envolve repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína pela presença de cargas elétricas similares (positivas ou negativas), em qualquer pH diferente do ponto isoelétrico. A segunda envolve a repulsão entre as camadas de hidratação ao redor dos grupos iônicos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Ainda segundo Damodaran, Parkin e Fennema (2010), a agregação das proteínas na água, que pode ocasionar insolubilidade, envolve equilíbrio entre interação eletrostática repulsiva, favorecendo a solubilidade e a interação das forças de atração de Van der Waals e hidrofóbicas, que favorecem a precipitação, entre as moléculas de proteína. Contudo, a solubilidade das proteínas não sofre influência somente de propriedades físico-químicas intrínsecas, mas também de condições presentes no meio como pH e solventes orgânicos.

2.4.1 Fatores que influenciam na precipitação das proteínas

A solubilidade de uma proteína é uma característica inerente às propriedades físico-químicas iniciais da macromolécula. Esta pode ser influenciada pelas condições presentes no meio, tais como pH, força iônica, temperatura e solventes orgânicos. Para o melhor entendimento do trabalho, destaca-se os fatores pH e solvente orgânico.

2.4.1.1 pH

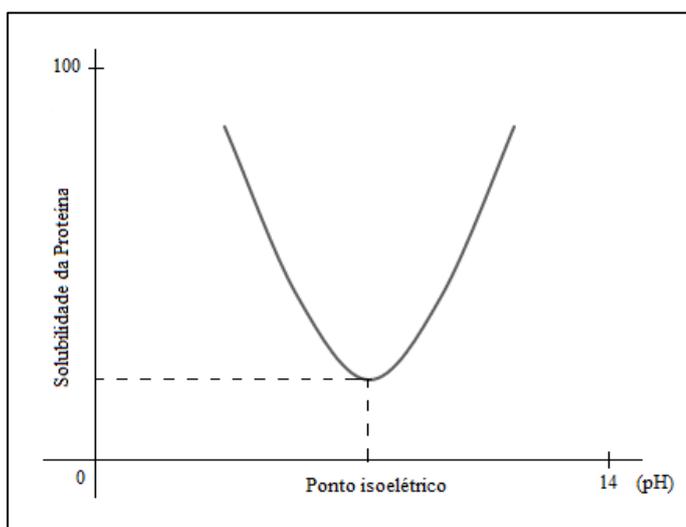
A precipitação de proteínas conduzida por meio do ajuste de pH é chamada de precipitação isoelétrica. Ao se tratar de pH, seu efeito na dissociação dos grupos funcionais da proteína está ligado a presença de cargas elétricas e, portanto, a magnitude das forças atrativas e repulsivas. Assim, é no ponto isoelétrico, pH no qual um íon dipolar se torna eletricamente neutro e com predominância de forças de atração, que a solubilidade será mínima (ARAÚJO, 2004; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

No ponto isoelétrico, a molécula de proteína apresenta carga líquida igual a zero, o que significa que apresenta máxima interação eletrostática entre grupos carregados e interação mínima com a água, provocando agregação e precipitação. É também no pI que os grupos carregados não estão disponíveis para interagir com as moléculas de água, ou seja, as proteínas são menos hidratadas e assim ocorre aumento das interações proteína-proteína (ARAÚJO, 2004; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Já, para um pH fora do pI, em virtude da presença de cargas elétricas e de forças repulsivas, a molécula de proteína se expande e interage mais com a água, contribuindo para aumento da solubilidade (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A forma geral de um gráfico plotado (pH x solubilidade), Figura 2, se dá em forma de U, onde o ponto mínimo da curva representa o pH do ponto isoelétrico (ARAÚJO, 2004).

Figura 2 - Solubilidade da proteína em função do pH.



Fonte: (Adaptado de ARAÚJO, 2004).

A ocorrência de agregação das proteínas tem como consequência a precipitação das mesmas. Isso se deve ao fato de que próximo ao ponto isoelétrico, as proteínas apresentam uma redução da sua carga elétrica superficial, assim há menor repulsão eletrostática entre essas moléculas e conseqüentemente haverá uma aproximação entre elas. Todavia, é possível que as proteínas ainda sejam solúveis no pH do ponto isoelétrico, quando as cargas elétricas naturalmente presentes nas proteínas forem eletricamente mais carregadas que as interações hidrofóbicas proteína-proteína (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Como as proteínas encontradas nos alimentos são de suma maioria ácidas, elas exibem solubilidade mínima em pH 4 a 5 e solubilidade máximas em pH alcalino (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

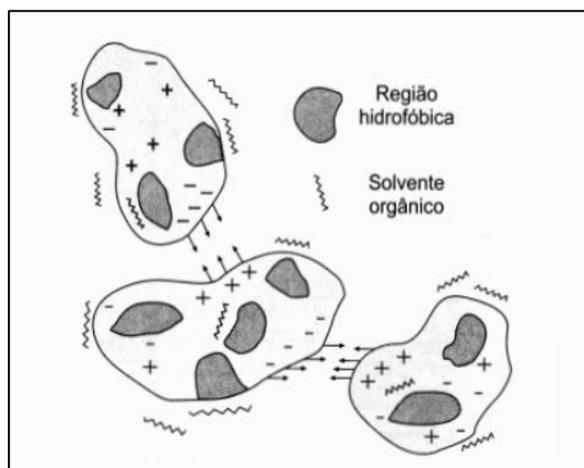
2.4.1.2 Solventes orgânicos

Uma das técnicas mais elucidadas de precipitação de proteínas é através da diminuição da solubilidade, por meio de modificações físico-químicas preconizadas por adição de solventes (AVELINO, 1997). Os solventes orgânicos são substâncias capazes de dissolver outras substâncias e formar uma solução conhecida como diluentes, dispersantes ou agentes de solubilização. Em sua maioria os solventes utilizados tem origem orgânica e como exemplo encontra-se benzeno, clorofórmio, metanol, etanol, acetona e álcool isopropílico (MAIA; LIMA; SOBRAL, 2009).

Os solventes alcoólicos tal como o álcool isopropílico, se apresentam como alternativa sustentável em comparação à solventes destilados de petróleo, como a hexana, por não gerarem resíduos tóxicos, por serem produzidos de forma biotecnológica, possuírem menor grau de inflamabilidade e por serem considerados menos prejudiciais à saúde humana (RODRIGUES, 2011; SAWADA, 2012).

Os solventes orgânicos, particularmente os álcoois, são miscíveis em água e promovem a precipitação das proteínas. Isso decorre principalmente pela redução da atividade de água pela diminuição da constante dielétrica do meio (AVELINO, 1997; PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2001). Esse efeito pode ser descrito pela imobilização parcial das moléculas de água através da hidratação do grupo polar do solvente orgânico, com simultâneo deslocamento das moléculas de água das zonas hidrofílicas e, então redução da camada de hidratação ao redor da proteína e da solubilidade conferida por estas zonas. O mecanismo de precipitação está demonstrado na Figura 3.

Figura 3 - Esquema do mecanismo de agregação de proteínas por interações eletrostáticas entre superfícies com cargas de sinais opostos em meio aquoso contendo solvente orgânico.



Fonte: (PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2001).

É devido também a redução da constante dielétrica do meio, que ocorre uma maior disponibilidade de cargas superficiais da proteína para que ocorra interação eletrostática com outras moléculas de proteínas. Essa interação proteína-proteína através de cargas elétricas de sinais opostos, propicia a agregação das mesmas e então, precipitação (PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2001; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Levando-se em conta a possibilidade de reciclar o solvente por meio de destilação simples, a precipitação com adição de solvente orgânico apresenta como vantagem a minimização dos impactos ambientais com a redução de efluentes (WATANABE et al., 2006). Outras vantagens que podem ser citadas são: ausência de resíduos indesejáveis no extrato contendo proteína após a precipitação, manutenção de cor e possibilidade de retirada de impurezas (PINHEIRO, 2016).

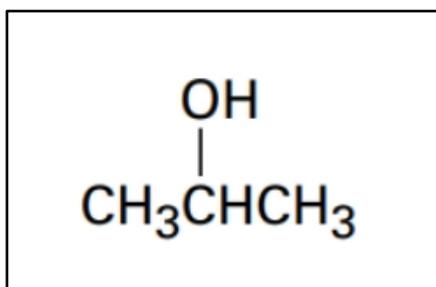
A desvantagem do uso deste método é a possível desnaturação das proteínas. Entretanto, ao se reduzir a temperatura na precipitação para valores próximos a 0 °C pode-se minimizar a desnaturação. À baixas temperaturas, a flexibilidade das biomoléculas é menor, diminuindo assim a capacidade de penetração do solvente e de qualquer desnaturação irreversível de enzimas (PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2001).

2.5 Precipitação de proteínas a partir de álcool isopropílico

Num processo de extração de compostos por uso de solventes, um fator determinante na escolha são as características do produto (RODRIGUES; OLIVEIRA, 2010). Diante disto, diversas áreas de pesquisa têm se preocupado em utilizar solventes mais seguros do ponto de segurança alimentar (sem resíduos tóxicos) e que causem menos danos ao meio ambiente, buscando a substituição de solventes derivados de petróleo pelos provenientes de fontes renováveis, como etanol, água, isopropanol (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012; MENEZES, 2016).

O álcool isopropílico, ou isopropanol, é constituído por uma cadeia de três carbonos e uma hidroxila ligada no carbono secundário (C_3H_7OH), como representado na Figura 4. Apesar de ser miscível em água, o álcool isopropílico tem uma estrutura que permite que ele tenha menor afinidade com a água, o que significa uma maior facilidade na sua separação (CAS et. al, 2016).

Figura 4 - Estrutura química do álcool isopropílico.



Fonte: (McMURRY, 2016).

Muitos solventes orgânicos miscíveis em água são capazes de precipitar proteínas, devido à sua constante dielétrica inferior à da água. Segundo Carey (2011), constante dielétrica é uma medida da capacidade do solvente de moderar a força de atração entre partículas com cargas opostas em relação a um padrão. A água possui uma constante dielétrica alta (80,3 a 20 °C), enquanto que a do isopropanol é de 18,30. Cavalcanti e Santana (2019), estudaram a precipitação alcoólica de ácido hialurônico com uso de álcool isopropílico, explorando sua menor constante dielétrica quando comparado ao etanol.

O que ocorre é o aumento da atração entre as moléculas de proteína e os agregados são formados até que as partículas atinjam proporções macroscópicas e precipitem (CORTEZ, 1999).

Cortez (1999) descreve o fenômeno como a remoção de água das esferas de hidratação das proteínas permitindo que as forças eletrostáticas forneçam regiões de cargas opostas na proteína. Com isso, a água é removida tanto por substituição em massa pelo solvente orgânico como por estruturação de toda a molécula orgânica. Por fim, a constante dielétrica é reduzida e isto leva a uma redução na solubilidade da proteína.

Um estudo sobre a precipitação utilizando álcool isopropílico foi realizado por Silva e Gonçalves (1990) analisando uma amostra de goma de alfarroba comercial. No trabalho foi avaliado e comparado as características macromoleculares e comportamento reológico das amostras purificadas e das amostras brutas. De acordo com a pesquisa, os resultados foram satisfatórios visto que foi feita uma purificação simples.

Chang (2019) ao estudar a redução de sabores indesejáveis em proteína isolada de lentilha relata que o uso de solventes orgânicos como acetona, etanol, álcool isopropílico têm sido amplamente utilizados para remover sabores desagradáveis de vegetais devido às suas propriedades anfifílicas e fácil transformação em plantas-piloto industriais.

Jian et. al (2014) avaliaram a caracterização do comportamento da precipitação de diferentes gomas através da adição de solventes orgânicos. A precipitação foi realizada em goma guar, goma de alfarroba e goma de feno-grego a partir de soluções puras de etanol e álcool isopropílico. Observou-se uma maior precipitação quando foi utilizado a concentração de 18,6% (v/v) de etanol ou 13,5% (v/v) de álcool isopropílico. O estudo relata que para atingir a mesma eficiência de precipitação, a quantidade de uso de isopropanol foi muito menor do que a de etanol, devido à baixa constante dielétrica do álcool isopropílico.

Outro estudo envolvendo precipitação com uso de solventes orgânicos foi desenvolvido para precipitação durante purificação de DNA plasmidial. Foi avaliado o uso de álcool isopropílico, etanol e acetona. Como resultados finais, observou-se que com o aumento da proporção de álcool isopropílico, houve maior precipitação de material genético. Contudo, analisando o precipitado por eletroforese, não foi verificado seletividade no método (PALMA; TURA, 2014).

A utilização de processos de purificação se faz muito presente na biotecnologia. A purificação de pectinametilesterase foi estudada aplicando o método de precipitação com álcool isopropílico. Na pesquisa foram obtidos fatores de purificação e recuperação da fase precipitada a partir de diferentes concentrações de álcool isopropílico. Como conclusão, verificou-se que a adição de concentrações de álcool isopropílico acima de 78% mostrou ser a condição experimental de melhor purificação e recuperação, mostrando ser um método eficiente para a enzima em questão (BUSTAMANTE et al., 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instalações

O trabalho foi executado no Laboratório de Separação e Purificação de moléculas (DCA 17) e no Laboratório de Refrigeração de Alimentos do Departamento de Ciências dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras.

3.2 Materiais

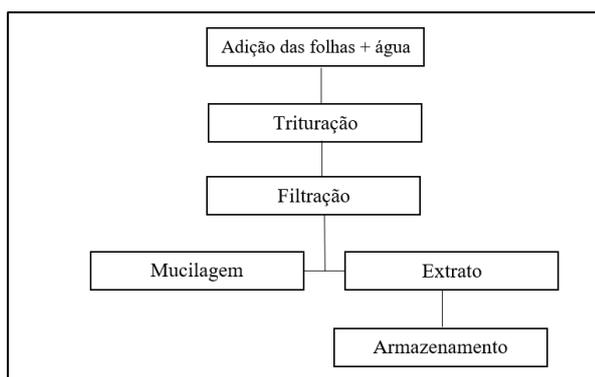
Para a execução do experimento foi utilizado folhas de ora-pro-nobis recém colhidas na cidade de Lavras - Minas Gerais. Os reagentes álcool isopropílico (99%), hidróxido de sódio (99%) e ácido fosfórico (99%) foram adquiridos da empresa Vetec (São Paulo, Brasil).

3.3 Obtenção do extrato de ora-pro-nobis

As folhas de ora-pro-nobis foram colhidas na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Minas Gerais, transportadas em isopor com gelo visando reduzir a atividade metabólica e enzimática da folha e então, processadas no Laboratório de Refrigeração de alimentos.

Para obtenção do extrato, utilizou-se a proporção de 1 kg de folha para 5 L de água, à temperatura de 10 °C e triturou-se por 10 min, utilizando-se um liquidificador industrial (Metvisa LG10, Brasil). Em seguida, a mistura obtida foi manualmente filtrada com tecido organza, para retirada das fibras e assim o líquido obtido foi submetido a uma filtração à vácuo por meio de um funil de Buchner acoplado a uma bomba de vácuo (Primar MC 1284, Brasil), utilizou-se como meio filtrante três camadas de organza (LIMA JUNIOR et al., 2013; CONCEIÇÃO et al., 2014). Por fim, o resíduo retido na filtração foi descartado e o extrato (líquido filtrado) foi armazenado em ultrafreezer até o momento das análises de precipitação. Um fluxograma do processo de preparo do extrato da OPN pode ser visualizado na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma do processo de preparo do extrato de ora-pro-nobis.



Fonte: Do Autor (2021).

3.4 Delineamento experimental

O processo de precipitação foi realizado seguindo um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial completo (Tabela 1) com três repetições. Foi avaliado o efeito da concentração de álcool isopropílico: extrato de OPN (1:1; 1:2 e 1:3) e do pH do extrato de OPN (2,0; 3,5 e 5,0) na precipitação das proteínas de OPN.

Tabela 1 – Delineamento experimental aplicado para a avaliação da precipitação das proteínas da ora-pro-nobis.

Tratamentos	Concentração de álcool	
	isopropílico: extrato de OPN	pH
1	1:1	2
2	2:1	2
3	3:1	2
4	1:1	3,5
5	2:1	3,5
6	3:1	3,5
7	1:1	5
8	2:1	5
9	3:1	5

3.5 Precipitação das proteínas de OPN

Para realização dos ensaios de precipitação, inicialmente 10 mL de extrato de OPN foram adicionados a tubos de centrífuga de 15 mL e foi feita a regulação do pH de acordo com o delineamento (Tabela 1). Foi usado ácido fosfórico e hidróxido de sódio para ajuste do pH. Em seguida para cada tratamento foi adicionado a respectiva quantidade de álcool isopropílico e o pH foi aferido novamente e quando necessário ajustado. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. Os tubos foram mantidos em banho termostático a 4 °C por 1 hora (CAVALCANTI; SANTANA, 2019). Por fim, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm (4677×g) por 20 min e alíquotas do sobrenadante foram coletadas para quantificação das proteínas.

3.6 Quantificação das proteínas da OPN

O conteúdo de proteínas antes e após o processo de precipitação foi determinado segundo o método de Bradford (1976), a 595 nm, por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro (Nova 200 UV, Brasil). Uma curva analítica foi construída usando solução de albumina de soro bovino (BSA) padrão com concentrações variando de 0,10 mg mL⁻¹ a 1,0 mg mL⁻¹ (APÊNDICE A).

A porcentagem (%) de proteína precipitada foi calculada a partir da equação 1:

$$\%PP = \frac{PI - PS}{PI} * 100 \quad (1)$$

Onde %PP é a porcentagem de proteína precipitada; PI é a concentração de proteína inicial (g/L); e PS é a concentração de proteína do sobrenadante (g/L).

3.7 Análise estatística

Os resultados experimentais obtidos a partir do fatorial completo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de média Tukey a 95% de significância usando SAS University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Precipitação de proteínas

Os resultados das leituras de absorvância do sobrenadante de cada tratamento, realizados em triplicata, estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados obtidos da leitura de absorvância do extrato proteico.

Tratamento	Concentração de solvente	pH	Absorvância		
			Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3
1	1:1	2	0,07	0,078	0,088
2	2:1	2	0,024	0,024	0,021
3	3:1	2	0,03	0,007	0,03
4	1:1	3,5	0,062	0,07	0,149
5	2:1	3,5	0,003	0,001	0,003
6	3:1	3,5	0,054	0,053	0,049
7	1:1	5	0,025	0,021	0,127
8	2:1	5	0,056	0,055	0,067
9	3:1	5	0,049	0,052	0,043

Os resultados experimentais do percentual de proteínas precipitadas em cada tratamento são apresentados na Tabela 3. Nota-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos estudados.

Tabela 3 – Resultados médios da porcentagem de proteínas precipitadas em função dos tratamentos avaliados.

Tratamentos	Porcentagem de Precipitação (%PP)
1	73,33 ± 2,19 ^{bc}
2	92,13 ± 1,28 ^{ab}
3	92,60 ± 4,22 ^{ab}
4	69,03 ± 12,79 ^c
5	99,22 ± 0,36 ^a
6	82,23 ± 2,44 ^{abc}
7	81,58 ± 17,67 ^{abc}
8	79,92 ± 0,51 ^{abc}
9	83,55 ± 3,05 ^{abc}

*Os valores médios seguidos de mesma letra para cada tratamento indicam que não há diferença estatística entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Verifica-se na Tabela 3 que o melhor tratamento de precipitação foi obtido na condição de pH 3,5 e concentração de álcool isopropílico 2:1 já que neste resultado verificou-se 99,22% de precipitação de proteína. Valores expressivos de %PP também foram encontrados nos tratamentos com pH 2 e concentração 2:1 e 3:1, respectivamente. Já os menores valores de precipitação foram observados no tratamento com concentração 1:1 e pH 3,5.

A maior precipitação da proteína foi obtida em pH 3,5, um pH superior a 1,7, que foi o ponto isoelétrico (pI) encontrado por Moraes et al. (2019) para as proteínas do extrato das folhas da OPN. Percebe-se que com a ação do solvente prevalece em relação a ação do pH (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A precipitação por solvente orgânico em soluções aquosas se baseia no fato de que o solvente propicia a redução da atividade de água da solução, ou seja, diminui a capacidade de solvatação da água na proteína. O solvente faz com que as moléculas de água sejam deslocadas para fora das partes hidrofóbicas da proteína, propiciando um aumento das interações hidrofóbicas. Como resultado, as proteínas se agregam e precipitam (ARAÚJO, 2004; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2001).

Outra possível explicação da agregação destas macromoléculas é pela constante dielétrica. O solvente orgânico tem a constante dielétrica menor do que a da água, isso significa que em uma solução aquosa, o uso do solvente reduz a constante dielétrica do meio e aumenta as forças eletrostáticas tanto repulsivas quanto atrativas. As forças repulsivas propiciam um desdobramento da molécula da proteína que estando em um meio de baixa constante dielétrica, ocorre ligação intermolecular das proteínas, dos seus grupos pépticos e a ligação de hidrogênio (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

O estudo realizado por Jian et al. (2014), onde foi caracterizado as frações do precipitado de goma galactomanona, demonstra que a precipitação ocorreu ao se utilizar 13,5% de álcool isopropílico. Foi demonstrado que na presença do solvente, as ligações de hidrogênio intramoleculares do polímero podem enfraquecer e assim sofrerem mudança conformacional, o que ocasiona precipitação.

Já Cavalcanti e Santana (2019) estudaram o processo de purificação de ácido hialurônico utilizando álcool isopropílico como agente precipitante. Os autores observaram que os melhores resultados de recuperação dos precipitados de ácido

hialurônico foram de $76,0 \pm 6,6\%$ e $72,0 \pm 7,5\%$, sendo obtidos nas condições experimentais de concentração de álcool isopropílico: caldo fermentado de ácido hialurônico 2:1 e em pH 3 e pH 7, respectivamente.

Os tratamentos que utilizaram maiores concentrações de solvente obtiveram resultados com valores de %PP acima de 79%. Com exceção do tratamento que foi conduzido em pH 3,5, utilizando uma razão de isopropanol:OPN 2:1, dentro de um valor fixo de pH nota-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Nota-se que alguns tratamentos com pH 2 apresentaram alta porcentagem de precipitação de proteínas da OPN, visto que é o pH mais próximo ao ponto isoelétrico delas. Neste pH as proteínas apresentam menor solubilidade e carga líquida nula, o que resultará em menor repulsão eletrostática e conseqüentemente precipitação dessas moléculas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Ainda sobre o estudo de Morais et al. (2019), que explorou a técnica de precipitação por *salting out*, verificou-se que o melhor resultado obtido foi de 69% de PP, utilizando-se sulfato de amônio na concentração de 1.0 mol/L. Ao comparar com os resultados obtidos neste trabalho utilizando a precipitação por solvente, pode-se concluir que os resultados apresentados aqui foram superiores aos obtidos por Morais e colaboradores (2019).

5 CONCLUSÃO

Através do presente estudo foi possível determinar as condições ótimas de pH e concentração de solvente orgânico álcool isopropílico, para obtenção de um concentrado proteico proveniente da precipitação alcoólica de extrato de ora-pro-nóbis.

O aumento na concentração de solvente orgânico propiciou aumento no teor de proteína precipitada, sendo que resultados expressivos foram encontrados nas concentrações de 2:1 e 3:1. O pH 2, mais próximo ao ponto isoelétrico da proteína de ora-pro-nóbis também favoreceu aumento na porcentagem de proteína precipitada.

Por fim, foi possível avaliar o uso de álcool isopropílico como agente de precipitação de proteínas das folhas de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller), e verificar que o mesmo se mostrou um solvente adequado para a operação de precipitação.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, F.I.; CHUA, L.S.; RAHMAT, Z. Comparison of protein extraction methods for the leaves of *Ficus deltoidea*. **Journal of fundamental and Applied Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 908, 2017.

ABIMAPI. Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães e Bolos Industrializados. O prato pode ficar ainda mais cheio. Brasil, 2020. Disponível em: <<https://www.abimapi.com.br/noticias-detalle.php?i=NDE4MA==>>.

ALMEIDA FILHO, J.; CAMBRAIA, J. Estudo do valor nutritivo do “ora-pro-nóbis” (*Pereskia aculeata* Mill.). **Rev Ceres**, Viçosa, v. 21, n. 114, p. 105-11, 1974.

AMARAL, T. N. Blends of *Pereskia aculeata* Miller mucilage, guar gum, and gum Arabic added to fermented milk beverages. **Food Hydrocolloids**, 2018.

ARAÚJO, J.M.A. Química de Alimentos – Teoria e Prática. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 2004.

AVELINO, S. Recuperação de proteínas por precipitação e flotação: polieletrólitos e éteres de celulose como precipitantes. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, 1997.

BOTREL, N. et al. Ora-pro-nóbis. Hortaliças Tradicionais. Plantas para o Futuro, **EMBRAPA**, 2018.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de hortaliças não convencionais. Belo Horizonte, 2010. 94 p.

BUSTAMANTE, C. E. V.; TRENTINI, M. M. S.; VALDUGA, E.; DI LUCCIO, M. Purificação De Pectinametilsterase (Pme) Por Precipitação Com Álcool Isopropílico. , p. 1203–1208, 2015.

CALDERÓN-CHIU, C. et al. Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) leaf as a new source to obtain protein hydrolysates: Physicochemical characterization, techno-functional properties and antioxidant capacity. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 112, 2021.

CAVALCANTI, A. D. D.; SANTANA, M. H. A. Structural and surface properties control the recovery and purity of bio- hyaluronic acid upon precipitation with isopropyl alcohol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **Elsevier**. v. 573, p. 112–118, 2019.

CAREY, F. A. Química Orgânica. 7 ed. São Paulo: **Bookman**, 2011.

CAS, I.; CAS, I.; GOMES, G. C. C. **Isopropanol**. , v. 8, n. 6, 2016.

CHANG, C.; STONE, A. K.; GREEN, R.; NICKERSON, M. T. Reduction of off-flavours and the impact on the functionalities of lentil protein isolate by acetone, ethanol, and isopropanol treatments. **Food Chemistry**, v. 277, n. October 2018, p. 84–95, 2019.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: Concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615–8627, 2012.

CONCEIÇÃO, M. C.; JUNQUEIRA, L. A.; GUEDES SILVA, K. C.; PRADO, M. E. T.; RESENDE, J. V. Thermal and microstructural stability of a powdered gum derived from *Pereskia aculeata* Miller leaves. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 104–114, 2014.

CORTEZ, E. V.; A. PESSOA JR. Xylanase and b-xylosidase separation by fractional precipitation. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 277–283, 1999.

DAMODARAN, S.; PAKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de alimentos de Fennema. 4. ed. Porto Alegre: **Editora Artmed**, 2010.

DERENZO, S.; ALDEIA, W. Estudo das condições operacionais da etapa de extração de proteína do capim elefante (*pennisetum purpureum schum*), utilizado como fonte energética. São Paulo: **Enc. Energ. Meio Rural**, 2003.

FAO. O Estado da segurança alimentar e nutricional do Brasil: Um retrato multidimensional. Brasília: **Fiat panis**, 2014. 90 p.

FASUYI, A. O.; ALETOR, V. A. Varietal composition and functional properties of cassava (*manihot esculenta, cranzt*) leaf meal and leaf protein concentrates. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 4 n. 1 p. 43-49, 2005.

FUHR, R. Levantamento de plantas alimentícias não convencionais (PANC) no município de Pato Branco - PR. Monografia (Graduação em Agronomia). Pato Branco. Universidade Federal do Paraná, 2016.

FONSECA, E. P. Métodos de extração de proteínas em leguminosas. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos) Patos de Minas. Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

GARCIA, J. A. A. et al. Phytochemical profile and biological activities of “Ora-pro-nobis” leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, v. 294, n. April, p. 302–308, 2019

GEA - GROUP AKTIENGESELLSCHAFT (Org.). O desafio da proteína. 2018. Disponível em: <<https://www.gea.com/pt/technology-talks/protein-challenge.jsp>>. Acesso em: 01 fev. 2020.

GRANDE, S. C. Estudo Da Extração Das Proteínas Dos Farelos De Oleaginosas Através De Métodos Químico E Enzimático. , 2016.

GUERROUÉ, J. et al. As proteínas de folhas de mandioca: aspectos fisiológicos, nutricionais e importância tecnológica. Curitiba: **B. Ceppa**, 1996.

HARDY, R. W.; BARROWS, F. T. Diet formulation and manufacture. Fish nutrition. 3 ed. San Diego: **Elsevier Science**, 824p. 2002.

JIAN, H. L. et al. Characterization of fractional precipitation behavior of galactomannan gums with ethanol and isopropanol. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 115–121, 2014.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. Riqueza de Plantas Alimentícias Não-Convencionais na Região Metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 63–65, 2007.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 846–857, 2008.

KOSHCHUH, W. et al. Production of leaf protein concentrate from ryegrass (*Lolium perenne* x *multiflorum*) and alfalfa (*Medicago sativa* subsp. *sativa*). Comparison between heat coagulation/centrifugation and ultrafiltration. *Desalination*, [s. l.], v. 163, n. 1–3, p. 253–259, 2004.

LIMA JUNIOR, F. A. et al. Response surface methodology for optimization of the mucilage extraction process from *Pereskia aculeata* Miller. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 38–47, 2013.

MAIA, L. S.; LIMA R. B.; SOBRAL, L. G. Avaliação da influência de solventes orgânicos no metabolismo de micro-organismos utilizados na oxidação de sulfetos minerais de cobre. XVII Jornada de Iniciação Científica – **CETEM**, p. 48–54, 2009.

MARTIN, A. A.; DE FREITAS, R. A.; SASSAKI, G. L.; EVANGELISTA, P. H. L.; SIERAKOWSKI, M. R. Chemical structure and physical-chemical properties of mucilage

from the leaves of *Pereskia aculeata*. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 20–28, 2017.

MELLINGER S. C. et al. Extração de Proteínas do Fruto e da Folha do Morangueiro e Preparo da Amostra para Aplicação em Eletroforese SDS-PAGE. [s. l.], p. 2–5, 2012.

MENEZES, E.G.T. Obtenção de óleos de sementes de frutos do cerrado utilizando diferentes processos de extração. Tese (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, 2016.

MCMURRY, J. Química Orgânica - Volume 1: Tradução da 9ª edição norte-americana. **Cengage Learning Brasil**, 2016.

MODESTI, C. D. F.; CORRÊA, A. D.; DE OLIVEIRA, E. D.; DE ABREU, C. M. P.; DOS SANTOS, C. D. Caracterização de concentrado protéico de folhas de mandioca obtido por precipitação com calor e ácido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 464–469, 2007.

MORAIS, L. C.; NEVES, I. C. O.; BATISTA, G. A.; et al. Protein recovery from Barbados gooseberry (*pereskia aculeata miller*) leaves by salting out and isoelectric precipitation. **Revista Mexicana de Ingeniera Química**, v. 18, n. 2, p. 419–430, 2019.

NACZK, M. ; PEGG, R. B.; AMAROWICZ, Ryszard. Protein-precipitating capacity of bearberry-leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) polyphenolics. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 124, n. 4, p. 1507–1513, 2011.

OLIVEIRA, N. L. et al. Development and characterization of biodegradable films based on *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 130, p. 499-510, 2019.

PALMA, M. M.; TURA, T. Estudo e avaliação do uso de diferentes solventes no processo de precipitação durante a purificação de DNA plasmidial. Monografia (Graduação em Engenharia Química) Universidade de São Paulo, p. 1–42, 2014.

PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHIMIDELL, W. Biotecnologia industrial. São Paulo: **Blucher**, 2001. Cap. 21. p. 493-523.

POIROT, R.; PRAT, L.; GOURDON, C.; DIARD, C.; AUTRET, J. M. Optimization of batch to continuous transposition: solid-liquid extraction from plant in an industrial contactor. **Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6)** Copenhagen, 16-20, 2007.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, J. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). **Food Chemistry**, v.85, p.267-273, 2004.

PINHEIRO, M. J. Estudos de equilíbrio de fases de enzimas em soluções aquosas de solventes orgânicos. , p. 87, 2016.

RIBEIRO, E. P., SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. São Paulo: **Edgard Blucher**, Instituto Mauá de Tecnologia, 2007. 184 p.

ROCHA, D. R. DA C. et al. Macarrão Adicionado De Ora-Pro-Nóbis. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 459–465, 2008.

RODRIGUES, C.E.C. Utilização de um solvente biorenovável nos processos de extração e desacidificação de óleos vegetais. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2011.

RODRIGUES, C. E. DA C.; OLIVEIRA, R. Response surface methodology applied to the analysis of rice bran oil extraction process with ethanol. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 4, p. 813– 820, 2010.

RODRIGUES, I. V.; COELHO J. F. J.; CARVALHO, M. G. V. S. Isolation and valorization of vegetable proteins from oilseed plants: methods, limitations and potential. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.109, p.337-346, 2012.

SANTAMARÍA-FERNÁNDEZ, M.; LÜBECK, M.. Production of leaf protein concentrates in green biorefineries as alternative feed for monogastric animals. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], v. 268, n. April, p. 114605, 2020.

SANTANA, C. S. et al. Desenvolvimento de Suplemento Alimentar Utilizando Ora-pro-nóbis. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 2, p. 1–10, 2018.

SAWADA, M. M., et al. Análise da viabilidade da utilização de etanol como solvente no processo de extração de óleo de soja. In XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas - SP, 2012. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, 2012.

SILVA, K. C. G.; AMARAL, T. N.; JUNQUEIRA, L. A.; DE OLIVEIRA LEITE, N.; DE RESENDE, J. V. Adsorption of protein on activated carbon used in the filtration of mucilage derived from *Pereskia aculeata* Miller. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 42–49, 2017.

SILVA, B. L.; AZEVEDO, C. C.; AZEVEDO, F. L. A. Propriedades funcionais das proteínas de amêndoas da munguba (*Pachira aquatica* Aubl.). Jaboticabal: **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2015.

SILVA L., J. A.; GONÇALVES, M. P. Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. *Topics in Catalysis*, v. 4, n. 4, p. 277–287, 1990.

SOUZA, M. R. DE M.; CORREA, E. J. A.; GUIMARÃES, G.; GOMES, P. R. O Potencial do Ora-pro-nobis na Diversificação da Produção Agrícola Familiar. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 3550–3554, 2009.

TAKEITI, C.Y. et al. Nutritive evaluation of non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.60, n.1, p.148-160, 2009.

TENORIO T., Angelica et al. Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilisation. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 203, p. 402–408, 2016.

TEO, C. P. A. et al. Obtenção e caracterização físico-química de concentrado proteico de folhas de mandioca. Campina Grande: **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 2010.

TOFANELLI, M. B. D.; RESENDE, S. G. Sistemas de condução na produção de folhas de ora-pro-nóbis. Mineiros: **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, 2011.

VEGGI, P. C. Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, p. 165, 2009.

WATANABE, E.O.; Equilíbrio de fases na precipitação de lisozima e albumina de soro bovino com o uso de sais. Tese de doutorado (de Engenharia Química da UNICAMP) 215ff, Campinas-SP, 2007.

WANG, Ning et al. Evaluation of three protein-extraction methods for proteome analysis of maize leaf midrib, a compound tissue rich in sclerenchyma cells. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 7, n. JUNE2016, p. 1–12, 2016.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. São Paulo: **Química Nova**, 1998.

ZUÑIGA, A. D. G. et al. Revisão: técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. Curitiba: B. **Ceppa**, 2003.

APÊNDICE A – Curva padrão de albumina do soro bovino (BSA).

Concentração BSA (mg/mL)	Absorbância
1	0,663
0,9	0,619
0,8	0,516
0,7	0,463
0,6	0,461
0,5	0,375
0,4	0,343
0,3	0,236
0,2	0,161
0,1	0,071
0	0

