



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

THIAGO TEIXEIRA COSTA

**PRODUÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO A PARTIR DAS
FOLHAS DE *Pereskia aculeata*, Miller.**

VITÓRIA – ES 2022

THIAGO TEIXEIRA COSTA

**PRODUÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO A PARTIR DAS
FOLHAS DE *Pereskia aculeata*, Miller.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Prof.^a. Dr. Hildegardo Seibert França

VITÓRIA - ES

2022

**PRODUÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO A PARTIR DAS
FOLHAS DE *Pereskia aculeata*, Miller.**

THIAGO TEIXEIRA COSTA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 03 de novembro de 2022.

Comissão Examinadora:

Dr. Hildegardo Seibert França- UFES
Orientador e Presidente da Comissão

Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci - UFES
Examinador Interno

Dr. Thiago de Melo Costa Pereira – UVV / IFES
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

À minha filha, **Isadora Bravo Miranda Costa**, pessoa a quem dedico a minha vida desde o dia 20 de outubro de 2014. Isadora é a força propulsora que me faz querer ser melhor não apenas profissionalmente, mas também como pessoa.

À minha parceira de vida, **Sabrina Bravo Pinheiro Miranda**, que me deu e continua a dar todo o apoio para meus estudos, meu trabalho, minha jornada como pai e minha evolução pessoal. Sabrina sempre esteve do meu lado em momentos difíceis e felizes. Foi quem me ajudou “olhar pra dentro” e perceber quais eram meus abismos e só assim conseguir superá-los. É com quem “olho pra fora”, planejo o futuro, sonho e caminho junto.

À minha mãe, **Mariângela Fernandes Teixeira**, ou somente “Piti”, a maior responsável por eu me tornar quem sou hoje.

Ao meu irmão, **Gabriel Teixeira Costa**, meu amigo, meu protetor, o melhor cirurgião dentista desse mundo. Temos muitas histórias juntos, mas com certeza a mais impactante foi Gabriel salvar minha vida quando ele tinha 9 anos e eu 7 anos de idade, num acidente com álcool e fogo. Até hoje, 34 anos depois, fico impressionado como aquela criança de 9 anos foi capaz de, sozinho, apagar o irmão em chamas.

A todos os professores, em especial aos do Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal da UFES, que durante esse ciclo, em plena pandemia de Covid-19 sempre fizeram o possível para que nós alunos continuássemos motivados.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo pela excelência pela promoção da universalização do ensino e por formar cidadãos pensantes.

Ao PPGBV pela oportunidade de me especializar na área; por me acolher e por me incentivar a melhorar.

À Capes, agência de fomento à pesquisa que subsidiou a bolsa de pesquisa e projeto de pesquisa.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo (IFES – Vila Velha) por abrir as portas e possibilitar o desenvolvimento da pesquisa.

À Universidade de Vila Velha (UVV) pela ajuda providencial em algumas análises.

Ao meu orientador, Dr. Hildegardo Seibert França, por me aceitar como aluno e por confiar em mim em todos os momentos.

Ao professor Dr. Thiago de Melo Costa Pereira por toda a ajuda e esclarecimentos.

Ao professor Dr. Stéfano Zorzal de Almeida por toda a ajuda com o programa o R stúdio.

À Thaynara Regina de Souza Costa, graduanda em química, amiga e parceira nos experimentos no IFES.

Ao Chicão, meu vizinho, que gentilmente cedeu as folhas de Ora pro nobis para este estudo.

Aos professores do PPGBV.

RESUMO

Pereskia aculeata Miller, é uma planta alimentícia não convencional (PANC) da família Cactaceae, originária do continente americano. Apesar do notório valor nutricional, esta espécie conhecida popularmente como Ora pro nobis, é pouco consumida como alimento. Este trabalho teve o objetivo de produzir um concentrado proteico, através de técnicas baratas e de fácil reprodução. Foi feita a comparação entre duas técnicas, a extração salina (ES) e a extração alcalina (EA). Nas ES foram utilizados dois sais (NaCl e Na₂CO₃) em diferentes concentrações (0,1M, 0,5M e 1M). A EA foi feita isoladamente e combinada com ultrassom (EA+Ultra). As proteínas dos precipitados foram quantificadas por Bradford e ficou estabelecido que os tratamentos mais eficientes foram a EA e EA+Ultra. Num segundo momento, foram comparadas a eficiência na extração das proteínas nos tratamentos EA e EA+Ultra em duas diluições (1:10 e 1:20 (p:v)). As reextrações dos resíduos dos tratamentos EA e EA+Ultra nas mesmas diluições também foram testadas. Foi feito também um produto proteico alternativo, o extrato aquoso liofilizado (EAL). Além disso, foi estabelecida a pureza dos produtos proteicos recuperados e a caracterização do peso molecular das proteínas em gel de poliacrilamida a 12%. Os resultados mostraram que o tratamento EA+Ultra 1:20 foi o melhor na extração das proteínas e na pureza do precipitado. Ficou evidente os efeitos positivo da maior diluição e da combinação do método EA com o ultrassom. Os resultados do gel de eletroforese mostraram duas bandas principais de 68 kDa e de 168 kDa, que podem estar relacionadas respectivamente à uma globulina (β -conglucininina 7S) e à anidrase carbônica, uma proteína relacionada à Rubisco que tem papel fundamental na fotossíntese. O experimento mostrou-se promissor para a produção de concentrado proteico com potencial para ser reproduzido industrialmente.

Palavras-chave: cacto folhoso • ora pro nobis • PANC • proteína • suplemento

ABSTRACT

Pereskia aculeata Miller, is an unconventional food plant (UFP) of the Cactaceae family, originally from the American continent. Despite the notorious nutritional value, this species popularly known as Ora pro nobis, is little consumed as food. This work had the objective of producing a protein concentrate, through cheap and easy-to-reproduce techniques. A comparison was made between two techniques, saline extraction (ES) and alkaline extraction (EA). In ES, two salts (NaCl and Na₂CO₃) were used in different concentrations (0.1M, 0.5M and 1M). EA was performed alone and combined with ultrasound (EA+Ultra). The proteins in the precipitates were quantified by Bradford and it was established that the most efficient treatments were EA and EA+Ultra. In a second moment, the efficiency in the extraction of the proteins in the treatments EA and EA+Ultra in two dilutions (1:10 and 1:20 (p:v)) were compared. Re-extractions of residues from EA and EA+Ultra treatments at the same dilutions were also tested. An alternative protein product, the lyophilized aqueous extract (EAL), was also made. In addition, the purity of the recovered protein products and the characterization of the molecular weight of the proteins in a 12% polyacrylamide gel were established. The results showed that the EA+Ultra 1:20 treatment was the best in protein extraction and precipitate purity. The positive effects of the higher dilution and the combination of the EA method with ultrasound were evident. The gel electrophoresis results showed two main bands of 68 kDa and 168 kDa, which may be related respectively to a globulin (β -conglycinin 7S) and carbonic anhydrase, a protein related to Rubisco that plays a fundamental role in photosynthesis. The experiment showed promise for the production of protein concentrate with the potential to be reproduced industrially.

Keywords: Antioxidant • leafy cactus • Ora pro nobis • UFP • supplement

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica de <i>Pereskia aculeata</i>	17
Figura 2: Estrutura química do corante Coomassie Brilliant Blue G-250.....	29
Figura 3: Reação de redução do reagente Folin-Ciocalteu.	30
Figura 4: Formação do complexo proteína-BCA, segundo Smith et al (1985).	31
Figura 5: Espécime utilizado nesse estudo. Foto: autor	47
Figura 6: Esquema das fases do experimento.	48
Figura 7: Quantidade de proteínas extraídas em cada tratamento.	56
Figura 8: Quantidade de proteínas extraídas por grama de pó de OPN.	57
Figura 9: Percentual de pureza dos precipitados em cada tratamento.	58
Figura 10: Perfil das proteínas em gel de eletroforese.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contribuição dos métodos na extração de proteínas.	25
Tabela 2: Métodos e tratamentos utilizados para comparação da extração por sais (ES), extração alcalina (EA) e extração alcalina combinada com ultrassom (EA+Ultra).	49
Tabela 3: Métodos e tratamentos utilizados para comparação entre das extrações alcalinas (EA), extrações alcalinas com ultrassom (EA+Ultra), as reextrações alcalinas (RA) e as reextrações alcalinas com ultrassom (RA+Ultra) em diferentes diluições, 1:10(p:v) e 1:20(p:v)..	50
Tabela 4: Soluções para a preparação do gel.....	53
Tabela 5: Extrações médias das proteínas com os seus respectivos tratamentos.	56
Tabela 6: Proteínas extraídas (g/g de pó de OPN), percentagem de proteínas extraídas do pó de OPN e pureza do precipitado de cada tratamento.....	57
Tabela 7: Peso molecular das proteínas marcadas no gel.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. OBJETIVO GERAL.....	15
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
4.1. <i>História e Distribuição Geográfica</i>	16
4.2. <i>Anatomia e Fisiologia</i>	17
4.3. <i>Filogenia</i>	19
4.4. <i>Usos e Aplicações</i>	20
4.5. <i>Proteínas</i>	21
4.6. <i>Métodos de extração de proteínas</i>	22
4.6.1. <i>Métodos mecânicos</i>	22
4.6.2. <i>Métodos não mecânicos</i>	24
4.7. <i>Métodos de isolamento de proteínas</i>	26
4.8. <i>Métodos de quantificação de proteínas</i>	26
4.8.1. <i>Métodos de Kjeldahl</i>	27
4.8.2. <i>Métodos de Bradford</i>	29
4.8.3. <i>Métodos de Lowry</i>	30
4.8.3. <i>Métodos de Smith ou BCA</i>	31
5. REFERÊNCIAS.....	32
CAPITULO 1 – PRODUÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO A PARTIR DAS FOLHAS DE <i>PERESKIA ACULEATA</i> MILL.	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
2.1. <i>Preparação do material vegetal</i>	47
2.2. <i>Extração de proteínas</i>	48
2.2.1. <i>Extração salina</i>	48
2.2.2. <i>Extração alcalina e extração alcalina combinada com ultrassom</i>	49
2.3. <i>Recuperação das proteínas extraídas</i>	50
2.4. <i>Extrato aquoso liofilizado</i>	51
2.5. <i>Quantificação das proteínas</i>	51
2.6. <i>Caracterização do peso molecular</i>	53
2.7. <i>Análise estatística</i>	55
3. RESULTADOS.....	56
3.1 <i>Comparação entre ES, EA e EA+Ultra</i>	56

3.2	<i>Efeito da diluição e da reextração.</i>	57
3.3	<i>. Extrato aquoso liofilizado</i>	58
3.4	<i>. Efeito dos tratamentos na pureza do precipitado</i>	58
3.5	<i>. Caracterização do peso molecular das proteínas</i>	59
4.	DISCUSSÃO	61
1.	CONCLUSÕES	65
2.	REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o país com maior diversidade vegetal do mundo. São reconhecidas neste território 50.091 espécies para a flora brasileira, sendo a grande maioria, um total de 35.626, pertencentes ao grupo das Angiospermas (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2022). No entanto, toda essa diversidade não reflete necessariamente os hábitos alimentares da população deste país. No Brasil, o consumo de vegetais privilegia produtos e cultivos exóticos (KINUPP e LORENZI, 2014). O consumo de plantas alimentícias não convencionais (PANC), como a Ora pro nobis (*Pereskia aculeata*, Miller), foco deste estudo, pode trazer inúmeras vantagens nutricionais, inclusive no que se refere às necessidades diárias de proteínas.

Ora pro nobis também conhecida como lobrobô, lobrobó, guaiapá, mori e carne de pobre é um cacto arbustivo e folhoso nativo do continente americano. É uma PANC e, como a própria definição do termo sugere, é negligenciada como alimento pela maioria da população brasileira, com exceção de algumas regiões de Minas Gerais, onde são cultivadas em quintais e hortas (KINUPP e LORENZI, 2014).

Incentivar o consumo de proteínas vegetais, principalmente àquelas provenientes das PANC, tem vantagens ambientais, sociais e econômicas. Em uma visão ambiental podemos destacar os impactos causados pela produção de proteína animal, onde a pecuária bovina é a maior causa de prejuízos ambientais da Floresta Amazônica, principalmente pela prática do desmatamento para implantação de pastagens (DARNET *et al*, 2021, PENDRIL *et al*, 2022). A necessidade de grandes áreas para produzir alimento para o desenvolvimento e engorda desses animais também é outro problema. Segundo a WWF Brasil (2020), 79% de toda a soja produzida no mundo tem essa finalidade. Estudo recém publicado indica que entre os anos de 2011 a 2015, o desmatamento total de florestas tropicais foi estimado entre 6,5 Mha a 9,5 Mha por ano, sendo a agropecuária responsável, direta ou indiretamente, por 90% a 99% do total desmatado (PENDRIL *et al*, 2022).

No âmbito social, o consumo de proteínas vegetais pode auxiliar na obtenção das necessidades diárias de proteínas pela população mais desfavorecida socialmente (ODHAV *et al*, 2007; ALMEIDA *et al*, 2014). Estima-se que 811 milhões de pessoas enfrentam a fome no mundo, sendo que em somente um ano de pandemia de Covid-19, período compreendido entre os anos de 2019 para 2020, houve um incremento de 118 milhões de pessoas nesta situação (FAO, IFAD,

UNICEF, WFP & WHO. 2021). Segundo a Rede Brasileira de Pesquisa em Soberania e Segurança Alimentar e Nutricional - REDE PENSSAN (2022), apenas 4 em cada 10 famílias tem acesso pleno à alimentação no Brasil. Apesar do número absoluto de pessoas com fome nos centros urbanos ser maior, 12% da população rural do Brasil convive com a fome, um percentual maior que o das cidades (REDE PENSSAN, 2021). Esses locais são justamente os mais viáveis para o cultivo das PANC, já que nessas áreas as residências normalmente possuem quintais.

Economicamente, as PANC podem incrementar a renda de agricultores familiares caso haja uma política de incentivo ao consumo desses vegetais. Por crescerem muitas vezes espontaneamente e por apresentarem grande rusticidade e pouca necessidade de tratamentos culturais (KINUPP e LORENZI, 2014), essas plantas não precisam de grandes investimentos para serem cultivadas. As propriedades nutricionais dessas plantas podem ser aproveitadas na indústria alimentícia de diversas formas e também tem grande potencial a ser explorado pela indústria farmacêutica (PORTO *et al*, 2022).

A grande concentração de proteínas em *Pereskia aculeata* a credenciam como de grande potencial para suprir as necessidades diárias de pessoas que deixam de consumir proteínas de origem animal, seja por impossibilidade financeira ou por outros motivos. Os níveis de aminoácidos essenciais presentes nas folhas de *P. aculeata*, são maiores que o mínimo recomendado pela FAO para suprir as necessidades humanas (TAKEITI *et al*, 2009). Segundo Barreira *et al* (2021), *Ora pro nobis* é “importante na contribuição nutricional e uma espécie alimentar fundamental para as estratégias de segurança alimentar e nutricional de grupos familiares cuja alimentação e hábitos estão diretamente relacionados ao consumo dessa espécie”. Além disso, ela ainda é descrita como uma planta com grandes concentrações de ferro, cálcio, cobre, potássio, manganês, selênio, fibras e vitamina A (BARREIRA *et al*, 2021). O interesse das indústrias pela *Ora pro nobis* vem aumentando expressivamente. No entanto, o isolamento e processamento desses compostos e posterior incorporação em alimentos, ainda carecem de pesquisas (PORTO *et al*, 2022).

Pereskia aculeata possui grande valor nutricional e a extração e isolamento dessas proteínas pode resultar em suplemento proteico com potencial para ser usado na alimentação. Diante disso, este estudo se propôs a produzir, a partir das folhas dessa espécie, um *pool* proteico utilizando métodos de extração e isolamento

de proteínas simples e baratos, para que o procedimento possa ser reproduzido industrialmente caso haja interesse do setor.

2. OBJETIVO GERAL

Produzir um concentrado proteico a partir das folhas de *Pereskia aculeata*.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extrair proteínas das folhas de *Pereskia aculeata*.

Avaliar a eficiência de diferentes métodos de extração de proteínas.

Quantificar as proteínas no concentrado proteico produzido.

Avaliar o perfil da massa molecular das proteínas do concentrado proteico por eletroforese.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. História e Distribuição Geográfica

Encontrar fontes e dados históricos confiáveis de plantas é um grande desafio, principalmente quando se trata de plantas que não tem significativa importância econômica, cultural ou gastronômica. Apesar de *P. aculeata* ser presente nos hábitos alimentares de algumas pessoas, principalmente em regiões de Minas Gerais, não são encontrados registros históricos fartos.

A planta foi descrita pelo botânico inglês de ascendência escocesa, Philip Miller (1691 – 1771), um dos mais destacados autores sobre horticultura do século XVIII e jardineiro-chefe do Chelsea Physic Garden entre 1721 e 1770. Miller possui inúmeras publicações e descreveu 1856 espécies durante sua vida (IPNI, 2022). Em relação ao gênero *Pereskia*, o nome foi dado pelo monge francês, missionário e botânico real do rei Luiz XIV, Charles Plumier (1646 – 1704), que homenageou o também botânico e astrônomo francês, Nicolas-Claude Fabre de Peiresk (1580 - 1637) (CORDEIRO, 2017). No entanto, por um erro de grafia, o gênero foi registrado como *Pereskia*, e não *Peireskia*.

Ora pro nobis, o nome popular da espécie mais conhecido no Brasil, é uma expressão do latim que significa “orai por nós”. Segundo o folclore popular, a expressão teria surgido ainda no Brasil colonial, na cidade de Sabará em Minas Gerais. Nessa época era comum utilizar a espécie como cerca viva e algumas igrejas adotavam essa prática. Pessoas escravizadas nesse período eram proibidos de entrar nas igrejas e, ao acompanharem a missa do lado de fora, comiam as folhas e frutos da planta. Conta-se que os padres não permitiam a prática, então, as pessoas aproveitavam a distração do sacerdote para consumir partes da planta ao mesmo tempo em que ele falava o termo em latim durante a pregação.

O consumo regular de Ora pro nobis é restrito a algumas regiões do Brasil. O estado de Minas Gerais é o maior consumidor e o hábito espalhou-se, de certa forma, para a região centro oeste. No nordeste brasileiro, Bahia e Ceará também registram locais onde existe o hábito de consumir essa hortaliça (CORADIN *et al*, 2018). Em geral as folhas são consumidas com carnes, adicionadas inteiras na preparação do prato. Na cidade de Sabará, em Minas Gerais, existe o Festival da Ora pro nobis que já está em sua 24ª edição. No evento a planta é apresentada em pratos típicos que tem a Ora pro nobis como ingrediente principal.

Pereskia aculeata tem sua distribuição nativa em partes do caribe e da América do Sul e, foi introduzida no Equador, alguns países da América Central e do Norte, países do Sul da África e do Sudeste Asiático (Figura 01).

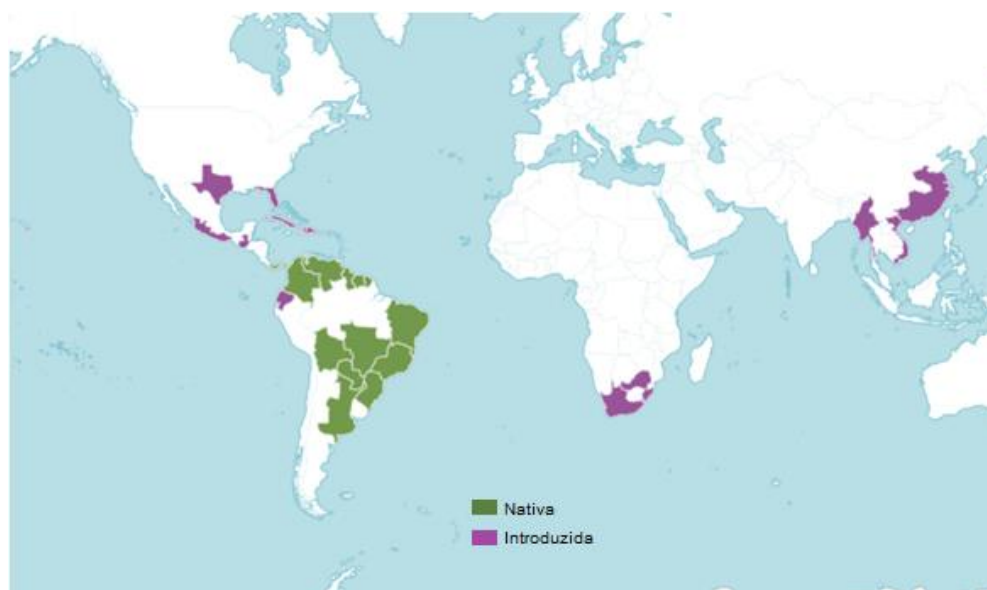


Figura 1: Distribuição geográfica de *Pereskia aculeata*. Fonte: Royal Botanic Gardens. Disponível em https://powo.science.kew.org/taxon/1374521?_gl=1*1cflsoa*_ga*MTA5NTA0NTk5LjE2NTkxMjcxNzI.*_ga_ZVV2HHW7P6*MTY1OTEyNzE5Ni4xLjAuMTY1OTEyNzE5Ni4w

4.2. Anatomia e Fisiologia

Pereskia aculeata (figura 02) é um cacto folhoso que tem forma de vida de liana ou trepadeira e habita substratos terrosos ou rochosos (ZAPPI & TAYLOR, 2022).

Nas aréolas surgem as folhas imediatamente acima dos acúleos, que tem pecíolos curtos, são verdes, concolores, formato elíptico ou lanceolado, planas, de base cuneada, carnosas, glabras e decíduas nos ramos maduros (CORDEIRO, 2017). A filotaxia é alterna e suas folhas medem cerca de 7 cm de comprimento por 3 cm de largura (SQUENA *et al*, 2012). O limbo em vista frontal apresenta células epidérmicas com paredes anticlinais poligonais.

Estômatos paracíticos estão presentes em ambas as faces. A cutícula é relativamente espessada e estriada e a epiderme é uniestratificada. O mesofilo dorsiventral tem quatro a oito camadas de parênquima paliçádico atípico, com células pouco diferenciadas do parênquima esponjoso que também é multisseriado. Idioblastos com drusas de oxalato de cálcio estão presentes no colênquima e grandes células com mucilagem estão dispersas no mesofilo. Na nervura central um feixe vascular colateral em formato de arco aberto está presente e é envolvido por uma bainha amilífera. Os elementos traqueais do xilema apresentam-se enfileirados, separados por células parenquimática, enquanto que

no floema os elementos crivados, acompanhados de células parenquimáticas formam cordões lado a lado. Junto ao xilema e ao floema, células com paredes espessas e não lignificadas estão presentes. No pecíolo, o feixe vascular colateral é fechado e envolto por células com parede espessada em diferentes estágios de lignificação. Numerosos idioblastos e células grandes com mucilagem estão presentes no parênquima fundamental do pecíolo (DUARTE & HAYASHY, 2005).

Acúleos pareados curvos surgem nas aréolas dos ramos jovens e são substituídos por espinhos quando maduros (CORDEIRO, 2017). O caule é lenhoso, bem desenvolvido, cilíndrico e desenvolvem-se numerosos ramos irregulares que podem atingir até dez metros de comprimento (SQUENA *et al*, 2012). O caule em transição para estrutura secundária, apresenta epiderme unisseriada coberto por espessa cutícula. Logo abaixo, há múltiplas camada de colênquima angular que revestem um córtex com células parenquimáticas impregnadas de amiloplastos e cloroplastos. Sobre ao floema, encontram-se calotas de fibras e fibras isoladas esparsadas. Idioblastos com cristais de oxalato de cálcio também estão presentes no floema. O xilema é totalmente lignificado com elementos traqueais dispondo-se isoladamente. A medula, formada por células parenquimáticas, está impregnadas de amiloplastos, idioblastos com cristais de oxalato de cálcio e grandes cavidades contendo mucilagem (DUARTE & HAYASHY, 2005).

As flores são efêmeras, muito odoríferas e atraem muitos insetos polinizadores. Tem inflorescências axilares ou terminais, muito alongadas, racemosas, tipo panícula, que podem ter até setenta flores de cor branca ou creme. As flores são pediceladas com pericarpelo areolado com muitas brácteas que se parecem com pequenas folhas. O perianto, de formato obovados a espatulado, possui muitos segmentos e tem bordas translúcidas com muitos estames de cor amarelo-alaranjado ou avermelhado, circundando o estigma branco e lobado (CORDEIRO, 2017). As flores são monóclinas, actinomorfas, unipistiladas e périginas com ovário pentacarpelar e unilocular que ocorre livre no hipanto (ROSA & SOUZA, 2003).

O fruto em desenvolvimento é constituído por hipanto, pericarpo e semente. O hipanto verde apresenta bractéolas também verdes e aréolas onde ocorrem acúleos e pelos. No fruto maduro, formado por hipanto, pericarpo e três sementes, o hipanto adquire coloração amarelo-alaranjado e pode perder completamente as bractéolas e os acúleos. O fruto maduro é carnoso, globoso ou obovóide, pomáceo do tipo cactídeo (ROSA & SOUZA, 2003).

Para estabelecer o metabolismo do ácido das crassuláceas em suculentas, observam-se dois critérios: abertura estomática noturna e flutuação da acidez total do tecido fotossintético com flutuações recíprocas no armazenamento de carboidratos (RAYDER & TING, 1981). *Pereskia aculeata* possui metabolismo do tipo C3 (NOBEL & HARTSOCK, 1986), porém, sob condições de estresse hídrico, observou-se flutuações nos níveis de ácidos orgânicos, na atividade da PEP carboxilase e da malato desidrogenase, com maior atividade no final do período de luz quando os ácidos orgânicos se encontravam em menor nível, o que é típico de plantas CAM. No entanto, não foi observada abertura de estômatos à noite e, conseqüentemente, nenhuma troca gasosa noturna. (RAYDER & TING, 1981). Estudos indicam que o gênero *Pereskia* possui metabolismo C3 com ciclagem CAM, que é uma variação da fotossíntese CAM onde as plantas abrem o estômato durante o dia e fecha-os à noite, mas usa a via CAM para reassimilar o dióxido de carbono resultante do processo respiratório (RAYDER & TING, 1981; MAUSETH, 1999; EDWARD & DONOGHUE, 2006).

4.3. Filogenia

O processo evolutivo que levou aos cactos atuais é um grande exemplo de estratégia adaptativa que permitiu esse grupo de plantas a sobreviver a longos períodos de seca extrema e possibilitou a colonização dos ambientes áridos e semiáridos de todo continente americano (EDWARD & DONOGHUE, 2006; AGOSTINE-COSTA, 2020).

O gênero *Pereskia* é considerado o grupo de plantas com maior número de características ancestrais da família das Cactaceae (MAUSETH, 1999) e, segundo Edwards & Donoghue (2006), esse grupo de organismos “consiste em 17 espécies de arbustos e árvores frondosas que há muito são consideradas a melhor representação viva do cacto ancestral”. Algumas evidências levaram à conclusão de que o gênero é realmente de cactos ancestrais, como o metabolismo que varia entre C3 e CAM (discutido acima), o fato de serem cactos com folhas, de alguns representantes do táxon apresentarem caules com estômatos (EDWARD & DONOGHUE, 2006) e a posição do ovário, que varia de superiores a inferiores, enquanto nos cactos mais recentes ele é semi-ífero ou ífero (EDWARD *et al*, 2005). O gênero é classificado como parafilético, pois os representantes do táxon possuem dois ancestrais distintos (EDWARD & DONOGHUE, 2006).

Pereskia aculeata é pertencente a ordem Caryophyllales que é um grande clado que compreende cerca de 1800 espécies distribuídas por todo o continente americano (GUERRERO *et al*, 2019; KOROTKOVA *et al*, 2021; ACHA & MAJURE, 2022). Essa planta é classificada cientificamente como sendo do reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Caryophyllales, família Cactaceae, gênero *Pereskia*, espécie *Pereskia aculeata*.

4.4. Usos e Aplicações

Ainda subutilizada diante da enorme possibilidade de usos e aplicações, Ora pro nobis, conhecida como a “rainha das PANC”, é famosa por seu elevado teor proteico e outras propriedades nutricionais. Inúmeros trabalhos já foram realizados confirmando a presença de ferro, enxofre, magnésio, manganês, zinco, vitamina A, cálcio, selênio, cromo, fósforo, potássio e proteínas na planta (BARREIRA *et al*, 2021), muitos desses nutrientes em quantidades adequadas para a nutrição. Outras tantas pesquisas já foram realizadas com sucesso na preparação de bolo (ROSA *et al*, 2020), iogurte funcional (SILVA, 2020), sorvetes (SANTOS *et al*, 2022), auxiliando na fabricação de queijo (SILVA *et al*, 2021) e muitos outros. No entanto suas potencialidades e usos vão muito além das proteínas e utilização como alimento.

Pinto *et al*, (2020) desenvolveram um creme anti-inflamatório fitoterápico com a fração hexânica das folhas *Pereskia aculeata* como princípio ativo. Esse creme também apresentou atividade em tratamento de psoríase. Já foram relatadas, em extrato das folhas da planta, atividades antimicrobianas (COLACITE *et al*, 2022), anti hemolítica (CRUZ *et al*, 2021) antinociceptiva (PINTO *et al*, 2015), cicatrizante e analgésica (PINTO *et al*, 2016).

A mucilagem da planta também já foi testada promissora para a fabricação de embalagens biodegradáveis (OLIVEIRA *et al*, 2019), o que pode contribuir para ajudar a reduzir a produção e descarte irresponsável de embalagens plásticas, um dos maiores problemas ambientais da atualidade. Ainda na área ambiental, a mucilagem já foi testada com sucesso na adesão de partículas, confirmando a capacidade coagulante e floculante no tratamento de água (LUCCA, 2017).

4.5. *Proteínas.*

As proteínas são compostos orgânicos complexos e estão presentes em todos os organismos. Formam-se por aminoácidos unidos entre si por ligações covalentes amida-substituídas denominadas ligações peptídicas (NELSON & COX, 2014). São essenciais em praticamente todas as funções fisiológicas das células, funcionando como catalizadores e transportadores nas reações químicas e na regeneração de tecidos. Participam do processo de divisão celular, crescimento e reprodução, etc. O processo de síntese de proteínas envolve a transcrição e a tradução. Um fragmento de DNA é transcrito em RNA mensageiro (mRNA) que se moverá do núcleo para o citoplasma onde será traduzido, ou seja, determinados aminoácidos se ligarão conforme especificado pela sequência de bases do mRNA (TAIZ & ZEIGER, 2009).

As proteínas organizam-se em até quatro estruturas para tornarem-se ativas: primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária é a sequência linear de aminoácidos ligados um de cada vez. Essa sequência determina a estrutura. Cada proteína tem uma sequência específica de aminoácidos. A interação dos aminoácidos da sequência de proteínas faz com que ela se dobre segundo um padrão conhecido como estrutura secundária. A rigidez das ligações peptídicas “permite” que as proteínas assumam duas formas: (i) a alfa hélice, que é mantida por ligações de hidrogênio entre o oxigênio de um aminoácido e o hidrogênio de um grupo amino situado quatro aminoácidos à frente, formando uma hélice e (ii) a folha beta, que é formada por cadeias polipeptídicas alinhadas em paralelo unidas por ligação de hidrogênio, resultando em uma forma em zigue-zague. (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2001).

A estrutura terciária é formada da interação dos radicais dos aminoácidos que incluem atrações, repulsões e, caso os radicais contenham enxofre, pontes dissulfeto. A quebra com sucessivos rearranjos das ligações que estabelecem a estrutura terciária das proteínas é conhecida como desnaturação proteica podendo comprometer sua atividade biológica. A desnaturação pode ser causada por alterações físicas ou químicas do meio (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2001).

Caso a proteína contenha mais de uma cadeia polipeptídica, seus arranjos no espaço são chamados de estrutura quaternária e essas ligações podem ser mantidas por ligações de hidrogênio, pontes dissulfeto, forças hidrofóbicas,

atrações entre cargas ou, mais frequentemente, pela combinação dessas interações (NELSON & COX, 2014).

As proteínas podem ser classificadas em dois grandes grupos: as proteínas fibrosas que tem cadeias polipeptídicas arranjadas em longos filamentos ou folhas, são insolúveis em água e tem função estrutural (suporte, forma e proteção) e, as proteínas globulares organizadas em cadeias dobradas de forma esférica ou globular, são solúveis e tem atividade biológica. As proteínas fibrosas tem normalmente uma única estrutura secundária e estrutura terciária limitada, enquanto as proteínas globulares são formadas por diversos tipos de estruturas secundárias (NELSON & COX, 2014), permitindo assim maior mobilidade da cadeia polipeptídica para se enrolar e assumir a forma globular.

Consumir quantidades adequadas de proteínas é importante pois os humanos são incapazes de sintetizar metade dos vinte aminoácidos proteicos, e esses aminoácidos essenciais devem estar presentes na dieta (NELSON & COX, 2014).

4.6. Métodos de extração de proteínas.

Uma biorrefinaria geralmente segue etapas de extração dos biorrecursos, através de um fracionamento dos processos, com o intuito de maximizar o número, a quantidade e a qualidade dos produtos extraídos (GORDALINA *et al*, 2021). A seleção do procedimento de extração depende da finalidade do produto resultante, dos recursos e da capacidade técnica disponível (POJIĆ, MISŃAN e TIWARI, 2018).

A extração de proteínas vegetais é um processo que depende da ruptura da parede e da membrana celular da planta. Existem vários métodos de extração de proteínas descritos na literatura que podem ser divididos entre métodos mecânicos e não mecânicos.

4.6.1. Métodos mecânicos.

Como o nome sugere, estes métodos consistem em causar danos mecânicos às células para acessar seu interior. Existem várias maneiras de atingir esse objetivo como por exemplo, 1) a ruptura celular por moinho de esferas, 2) por ultrassom, 3) por alta pressão, 4) por campo elétrico pulsado e 5) por micro-ondas.

Um moinho de esferas é um homogeneizador originalmente projetado para a redução de partículas de tinta ou laca (POSTMA *et al*, 2015). Na extração por moinho de esferas, pequenas esferas de aço, vidro ou cerâmica são adicionadas ao meio onde estão as células ou tecido vegetal e colocadas em agitadores que

podem ter formas e tamanhos variados. Múltiplos choques entre as esferas destroem as células na zona de compactação ou pela colisão direta esfera-célula. (GÜNERKEN *et al*, 2015).

A extração assistida por ultrassom é um método bastante utilizado para extração de proteínas vegetais por aumentar a biodisponibilidade desses compostos devido ao seu efeito degradativo, que é causado pela cavitação acústica. Esse processo acontece quando a pressão estática cai abaixo da pressão de vapor do líquido, ocorrendo a formação e crescimento de bolhas de vapor que, no subsequente pico de pressão colapsam violentamente levando à degradação das células (GORDALINA *et al*, 2021). Estima-se que esse processo cria microrregiões de condições extremas, com temperaturas que podem chegar a 5000 °C e pressão de 100 MPa (GÜNERKEN *et al*, 2015). Além disso, outras forças também estão por trás da ruptura celular na extração assistida por ultrassom. Ondas acústicas de alta frequência se propagam no meio provocando choque entre as células e o meio circundante, causando a ruptura das células. A fonte das ondas ultrassônicas também causa a termólise da água resultando em radicais livres altamente reativos que reagem com as células (GÜNERKEN *et al*, 2015).

Na homogeneização por alta pressão, o meio onde está o material vegetal é exposto a intensa pressão (de 50 MPa a 300 MPa) e é forçado a fluir através de um pequeno orifício onde encontra uma câmara de ruptura micrométrica. Neste local, a velocidade do fluido aumenta rapidamente e a pressão diminui para condições atmosféricas. O resultado é a ruptura física da parede celular e das membranas devido às forças de cisalhamento, alongamento, turbulência e cavitação causadas pelas tensões fluido-mecânicas criadas no processo (CARULLHO *et al*, 2018; VAILETH *et al*, 2021).

A extração por campo elétrico pulsado é uma técnica onde pulsos curtos de corrente elétrica de alta voltagem são emitidos para perfurar a membrana e a parede celular. A depender da intensidade, frequência e tempo de duração dos pulsos, ocorre a eletroporação das células (GORDALINA *et al*, 2021), permitindo assim o extravasamento dos compostos do interior. Apesar de ser mais comumente utilizada em microalgas, a técnica já foi testada para extração de proteínas em vegetais como gergelim e em folhas de Colza aumentando consideravelmente a quantidade de proteínas extraídas (POJIĆ, MISĀNA e TIWARI, 2018).

A extração assistida por micro-ondas é um processo que ocorre com maior eficiência a 2450 MHz para extrair proteínas por meio da transferência da energia das micro-ondas para uma solução (GÜNERKEN *et al*, 2015). No processo ocorrem vibrações das moléculas polares causando atrito inter e intramolecular, levando ao aquecimento das soluções e ao aumento da pressão do interior das células, promovendo seu rompimento (GORDALINA *et al*, 2021; VAILETH *et al*, 2021). A extração por micro-ondas é uma técnica relativamente nova e sua aplicação industrial ainda não foi estudada.

4.6.2. Métodos não mecânicos.

Apesar dos resultados positivos alcançados, os métodos mecânicos de extração de proteínas têm limitações, principalmente no que se refere ao consumo de energia (HUANG e KIM, 2013) e à solubilização das proteínas no meio. Esses métodos também são usados em combinação com outros métodos para melhorar a recuperação de proteínas (KUMAR *et al*, 2021). Dentre os métodos não mecânicos mais usados de extração de proteínas, podemos citar a extração por sais (*salting in / salting out*), extração alcalina, extração ácida e a extração enzimática. Estes métodos tem sido bastante utilizados em extrações aquosas devido à grande solubilidade que proporcionam e efeito benéfico na estabilidade das proteínas (QUIAOYUIN *et al*, 2017).

A extração por sais, ou *Salting in*, é uma técnica utilizada em baixas concentrações de íons (< 0,15M), onde as cargas provenientes da dissociação do sal no meio interagem com as proteínas, impedindo agregações com consequente aumento da solubilidade. Já o *Salting out* ocorre quando a concentração de íons de sais no meio é tão elevada que esses íons interagem mais com as moléculas de água do que com as moléculas de proteínas, promovendo agregações, com consequente precipitação das proteínas (JIANG *et al*, 2021).

A extração alcalina é sem dúvida o método mais utilizado para extrair proteínas de tecidos vegetais (BOYE, ZARE e PLETCH, 2010; QUIAOYUIN *et al*, 2017). Em pH alcalino ocorre a ionização dos aminoácidos ácidos e neutros aumentando assim a solubilidade das proteínas (KUMAR *et al*, 2021). A extração ácida tem o mesmo princípio de aumentar a solubilidade das proteínas por ionização dos aminoácidos, porém, como o ponto isoelétrico das proteínas vegetais é normalmente em pH ácido, a técnica não é tão eficiente quanto a extração alcalina.

Na extração enzimática, proteases e carboidrases são utilizadas para dissolver as paredes celulares polissacarídicas. Essas enzimas requerem pouco ou nenhum solvente químico e melhoram os rendimentos gerais na extração de proteínas (VIEIRA *et al*, 2008; BOZDEMIR *et al*, 2022). A tabela 1 traz algumas comparações entre as eficiências dos métodos mecânicos e não mecânicos citados.

Tabela 1: Contribuição dos métodos na extração de proteínas.

Método	Mecanismo	Material Biológico Teor proteico	Prot. Extraídas	Referência
Moinho de esferas	Ruptura da parede célula por esmagamento ou colisão.	<i>Clorella vulgaris</i> 48 a 58%	32 a 42%	POSTMA <i>et al</i> , 2015
Ultrassom	Cavitação acústica.	Farelo de mostarda 23,15%	44,87%	JAHAN <i>et al</i> , 2022
Homogeneização por alta pressão	Variação abrupta de pressão e choque mecânico.	Pasta de soja 5,2%	82%	PREECE <i>et al</i> , 2017
Campo elétrico pulsado	Perfuração da parede celular por pulsos elétricos.	<i>Haematococcus pluvialis</i> -	46%	GATEAU <i>et al</i> , 2021
Extração assistida por micro-ondas	Interação de moléculas polares e componentes de energia eletromagnética de alta frequência.	Farinha de amendoim 54,86%	55%	RIVAS <i>et al</i> , 2017
<i>Salting in</i>	Aumento da solubilidade devido à interação dos íons dos sais no meio com as proteínas.	<i>Cannabis sativa</i> 22,5 – 30%	Sem aumento significativo	POTIN <i>et al</i> , 2019
<i>Salting out</i>	Diminuição da solubilidade das proteínas devido à alta concentração de íons que interagem preferencialmente com as moléculas de água do meio.	<i>Cannabis sativa</i> 22,5 – 30%	Sem aumento significativo	POTIN <i>et al</i> , 2019
Extração alcalina	Aumento da solubilidade das proteínas devido à ionização dos aminoácidos ácidos e neutros.	<i>Cannabis sativa</i> 22,5 – 30%	67,1%	POTIN <i>et al</i> , 2019
Extração ácida	Aumento da solubilidade das proteínas devido à	<i>Cannabis sativa</i> 22,5 – 30%	<7%	POTIN <i>et al</i> , 2019

	ionização dos aminoácidos neutros e básicos.			
Extração enzimática	Extração por degradação da parede celular por proteases e glicosidases.	Arroz 6,61%	63,4%	VIEIRA <i>et al</i> , 2008

4.7. Métodos de isolamento de proteínas.

Os procedimentos mais utilizados para isolar proteínas em grandes quantidades são a precipitação isoelétrica e a micelização (HADNADEV *et al*, 2017).

A precipitação isoelétrica normalmente é uma técnica precedida de uma extração alcalina. Para se obter o precipitado, é necessário ajustar o pH da solução até o ponto isoelétrico das proteínas, onde ocorre a menor repulsão eletrostática e conseqüentemente menor solubilidade. A diferença no ponto isoelétrico das proteínas tem relação com aminoácidos que a compõem. Existem aminoácidos carregados negativamente, carregados positivamente e aminoácidos neutros, de modo que a combinação dos aminoácidos que formam uma proteína determina sua carga total. Em meios ácidos, os aminoácidos serão carregados positivamente, em meios básicos serão carregados negativamente e, em pH 4 a 5 os aminoácidos estarão em uma forma dipolar ou em estado de zwitter (KUSUMAH, ANDOYO e RIALITA, 2020), ou seja, sua carga total é zero. Após atingir o pH isoelétrico, a recuperação das proteínas é feita por centrifugação.

Micelas são moléculas orgânicas globulares formada por um agregado de moléculas anfipáticas, ou seja, que possui uma extremidade polar e outra apolar. A micelização de proteínas é um processo que ocorrem em meios salinos. Primeiro é feita uma centrifugação para a retirada de compostos insolúveis seguido da recuperação das proteínas em forma de micelas por ultrafiltração ou diluição em água fria seguida de centrifugação (HADNADEV *et al*, 2017). Como já mencionado, a precipitação das proteínas micelizadas acontece devido ao aumento da força iônica do meio.

4.8. Métodos de quantificação de proteínas.

O primeiro método de quantificação de proteínas foi o método de Dumas, de 1831, que caiu em desuso por ser muito complexo. Desde então, vários métodos para quantificação de proteínas totais têm sido empregados com boa eficiência.

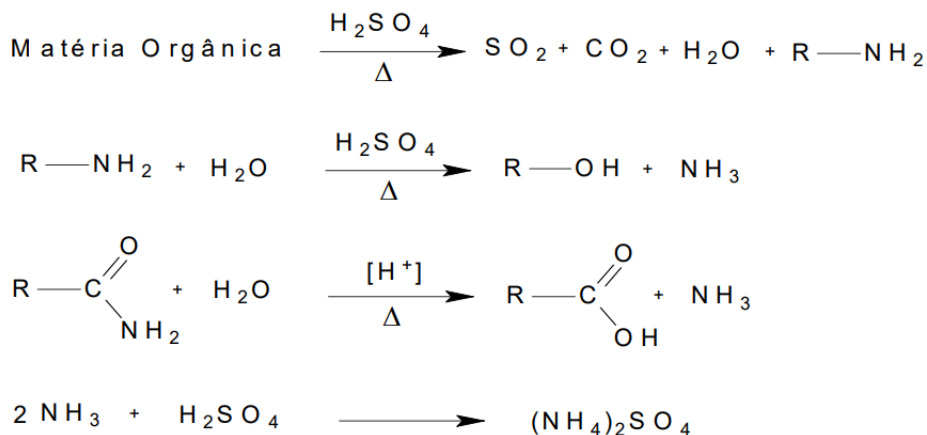
Os resultados das análises de proteínas podem ser influenciados pela composição das proteínas das amostras que incluem o teor de aminoácidos, a conformação das proteínas e ligações covalentes com qualquer composto, principalmente carboidratos (OKUTUCU *et al*, 2007). Dentre os 13 métodos de análises de proteínas pesquisados (Método de Dumas, Reagente de Nessler, Biureto, Método de Berthelot, Método de Kjeldahl, Método de Pesce e Strande (ou Ponceau–S/TCA) , *dye-binding*, Método de Lowry (ou *Folin-Ciocalteu*), Destilação Alcalina Direta, Refletância Próxima do Infravermelho (ou NIR), Método de Bradford, Método de Smith (ou BCA) e Absorção no Ultravioleta), vamos tratar aqui dos mais utilizados.

4.8.1. Métodos de Kjeldahl.

Divulgado em 1883, numa reunião da sociedade dinamarquesa de química, pelo químico dinamarquês Johan Gustav Christoffer Thorsager Kjeldahl (1849-1900), o método baseia-se na determinação do nitrogênio orgânico total de uma amostra biológica (SÁEZ-PLAZA *et al*, 2013) e é um dos mais utilizados até hoje.

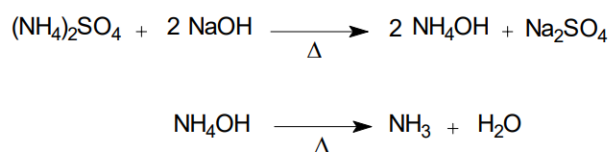
O método original foi criado para a indústria cervejeira com o intuito de acompanhar as mudanças no teor de proteínas em grãos durante a germinação e fermentação (SÁEZ-PLAZA *et al*, 2013). Nesses 139 anos de utilização, já aconteceram algumas modificações.

O método consiste em três passos: digestão da amostra, destilação e titulação. Na digestão com ácido sulfúrico, a amostra é aquecida até que o carbono e o hidrogênio sejam oxidados a CO_2 e H_2O . No processo, ocorre a conversão do nitrogênio da amostra em íons NH_4^+ que reage com o H_2SO_4 formando sulfato de amônio. A digestão precisa conter H_2SO_4 residual para reter o NH_3 como NH_4^+ (SÁEZ-PLAZA *et al*, 2013). Seguem as reações:



Fonte: (GALERIANE e COSMO, 2020)

Água e álcali (hidróxido de sódio) são adicionados até o limite de um terço do recipiente e, ocorre a transformação do íon NH_4^+ em NH_3 . A solução segue para destilação com o objetivo de se coletar o NH_3 . A destilação direta à vapor diminui drasticamente o tempo necessário para o processo (SÁEZ-PLAZA *et al*, 2013). Seguem as reações:



Fonte: (GALERIANE e COSMO, 2020)

No processo de titulação, ácido bórico é utilizado para reagir com a amônia. Posteriormente, uma solução padrão de HCl com título conhecido é adicionada ao meio até que a cor da solução mude de verde para violeta. Como um mol de NH_3 requer um mol de HCl, a quantidade de nitrogênio total da amostra pode ser calculada (SÁEZ-PLAZA *et al*, 2013). Seguem as reações:



Para se determinar a quantidade de proteína bruta na amostra, multiplica-se o nitrogênio total por um fator que converte o nitrogênio em proteína, que no caso de tecidos vegetais é de 6,25, considerando que a maioria das proteínas contém em sua estrutura 16% de nitrogênio.

O método de Kjeldahl tem as vantagens de ser simples, aplicável a todos os tipos de alimentos, baixo custo e boa precisão, porém, suas desvantagens são por conta da utilização de reagentes corrosivos, mede o nitrogênio total, não apenas o das proteínas e é demorado.

4.8.2. Métodos de Bradford.

O bioquímico norte americano Marion Mckinley Bradford (1946 - 2021) desenvolveu e patenteou um ensaio rápido de quantificação de proteínas que recebe seu nome. O artigo foi publicado em 1976 na revista *Analytical Biochemistry*.

O método baseia-se na afinidade do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* pelas proteínas. Quando o corante em sua forma vermelha se liga à proteína, ele rapidamente é convertido para a forma azul. O processo é rápido e o complexo corante-proteína permanece disperso em solução por um longo tempo. Após a ligação, a amostra é lida em espectrofotômetro a 595 nm (BRADFORD, 1976). A mudança na coloração se dá pelo deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica quando ocorre a ligação com a proteína (ZAIA, ZAIA e LICHTING, 1998).

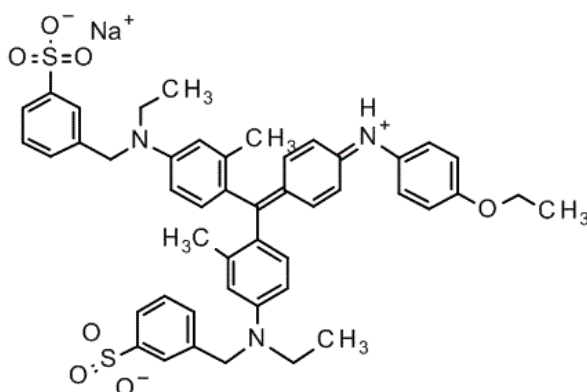


Figura 2: Estrutura química do corante Coomassie Brilliant Blue G-250. Disponível em: https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Coomassie-Brilliant-blue-G-250-C.I.-42655,MDA_CHEM-115444

O método de Bradford tem a vantagem de ser rápido, confiável e prático e é sujeito a menor número de interferentes (ZAIA, ZAIA e LICHTING, 1998). Suas desvantagens principais são a imprecisão em pH alcalino (BRADFORD, 1976) e as interferências causadas por detergentes (SDS, Tritom X-100, Tween 20), frequentemente usados para eletroforese ou para auxiliar na abertura da membrana celular (ZAIA, ZAIA e LICHTING, 1998).

4.8.3. Métodos de Lowry.

O bioquímico e geneticista chinês Hsien Wu (1893-1959), publicou seu ensaio de quantificação de proteínas no *Journal of Biological Chemistry* em 1922. No entanto, limitações da técnica levaram a muitas modificações até que a equipe do bioquímico norte americano, Oliver Howe Lowry (1910-1996), publicou no *Journal of Biological Chemistry*, em 1951, sua contribuição ao método por considerar “pouco favorável para fins bioquímicos gerais” (LOWRY *et al*, 1951). Assim, o método acabou recebendo seu nome em vez do nome do criador.

Pelo menos até o ano de 2014, quando a revista *Nature* fez em seu *website* o levantamento dos 100 melhores *papers*, o artigo de Lowry e colaboradores era o mais referenciado da história com 305.148 citações (NOORDEN, MAHEN e NUZZO, 2014).

O método, inicialmente proposto para a determinação de proteínas no plasma sanguíneo, é um ensaio espectrofotométrico simples que se baseia na redução do reagente *Folin-Ciocalteu* pela proteína (ou outro agente redutor) que se liga a ele. Uma mistura contendo ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) é reduzida quando reage com proteínas na presença do catalizador Cu^{2+} e produz um composto com absorção máxima em 750nm (ZAIA, ZAIA e LICHTING, 1998). O reagente antes da redução é amarelado e fica azulado quando reduzido.

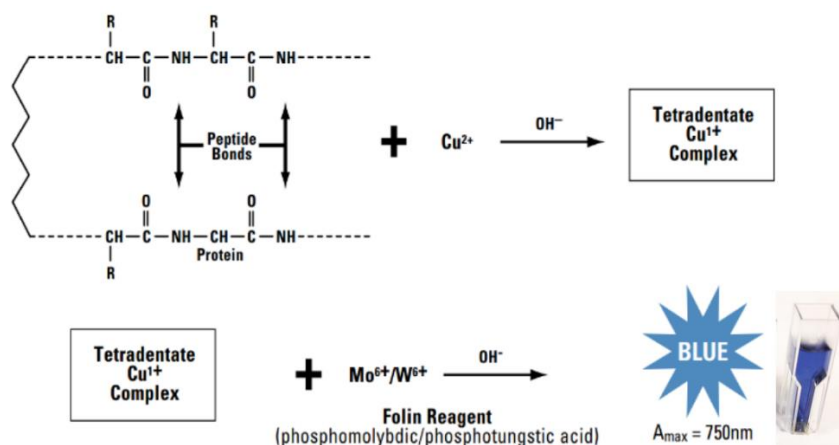


Figura 3: Reação de redução do reagente Folin-Ciocalteu. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5646436/mod_resource/content/1/Aula%203%20%20DosagemProteia%CC%81nas.pdf

A principal vantagem do método é sua alta sensibilidade, o que o torna bastante utilizado em vários meios para a determinação de proteínas totais. Em estudos comparativos, o método se mostrou mais sensível, com melhor exatidão e menor consumo de amostras. As desvantagens são o grande número de interferentes, ser demorado e possuir absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas (ZAIA, ZAIA e LICHTING, 1998).

4.8.3. Métodos de Smith ou BCA.

Em ensaio publicado na revista *Analytical Biochemistry*, em 1985, Paul K. Smith e colaboradores desenvolveram um método de quantificação de proteínas motivados pelas falhas do método de Lowry. Segundo o autor, o reagente de *Folin-Ciocalteu* é instável em meio alcalino, sofre interferência de detergentes e tampões frequentemente utilizados na solubilização de proteínas, a técnica é mecanicamente complicada, tediosa e de difícil automatização (SMITH *et al*, 1985).

O ensaio, que também é conhecido como método do ácido bicinconínico (BCA), é baseado na reação do Cu^{2+} com a proteína em meio alcalino, produzindo Cu^+ e formando um complexo com o BCA, que tem maior absorção na região dos 560 nm (SMITH *et al*, 1985).

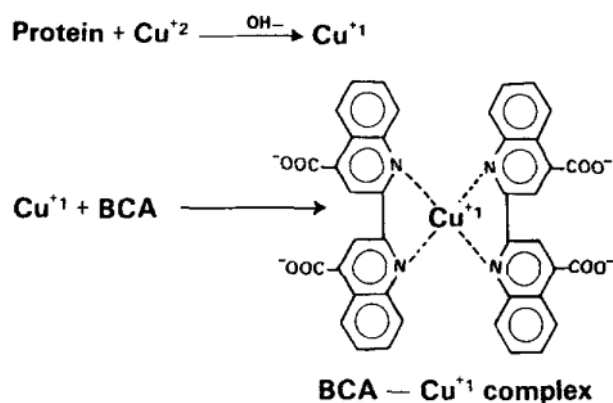


Figura 4: Formação do complexo proteína-BCA, segundo Smith et al (1985).

As vantagens do método são a simplicidade, a sensibilidade que é comparável ao método de Lowry e por ser relativamente rápido. Quanto às desvantagens, podemos citar a dependência da temperatura para incubação das amostras, a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas e a variação da absorbância com o tempo (ZAIA, ZAIA e LICHTING, 1998).

5. REFERÊNCIAS

ACHA, S.; MAJURE, L.C. A new approach using targeted sequence capture for phylogenomic studies across Cactaceae. **Genes**. v. 13, n.350, p.01-14, 2022.

AGOSTINI-COSTA, T.S.; Bioactive compounds and health benefits of Pereskioideae and Cactoideae: A review. **Food Chemistry**, v.327, p. 01-14, 2020.

ALMEIDA, M.E.F.; JUNQUEIRA, A.M.B.; SIMÃO, A.A.; CORRÊA, A.D. Caracterização química das hortaliças não convencionais conhecidas como Ora-pro-nobis. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.30, n.1, p. 431-439, 2014.

BARREIRA, T.F.; PAULA-FILHO, G.X.; PRIORE, S.E.; SANTOS, R.H.S.; PINHEIRO-SANT´ANA, H.M. Nutrient content in ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.): unconventional vegetable of the Brazilian Atlantic Forest. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 41, p. 47-51, 2021.

BOYE, J.; ZARE, F.; PLETCH, A. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. **Food Research International**, v.43, p. 414-431, 2010.

BOZDEMIR, A.; ŞENSU, E.; OKUDAN, E.Ş.; ÖZÇELİK, B.; YÜCETEPE, A. Ultrasond-assisted enzymatic extraction of protein from *Gracilaria dura*: investigation of antioxidant activity and techno-functional properties. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, p. 1-16, 2022.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARULLO, D.; ABERA, B.D.; CAZAZZA, A.A.; DONSI, F.; PEREGO, P.; FERRARI, G.; PATARO, G. Effects of pulse electricfields and high pressure homogenization on the aqueous extractionof intracellular compounds from the microalgae *Clorella vulgaris*. **Algal Research**, v.31, p. 60-69, 2018.

COLACITE, J.; BATISTA A.P.; REIS, S.L.M.; ASSUMPÇ~SO, J. Avaliação da atividade antimicrobiana de diferentes extratos de folhas de Ora-Pro-Nóbis. **Brasilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 33207-33216, 2022.

CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste**. Brasília: MMA, 2018.

CORDEIRO, S.Z., 2017. ***Pereskia aculeata*, Mill.** Disponível em: <<http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/pereskia-aculeata-mill>>. Acesso em 29 jul. 2022.

CRUZ, T.M.; SANTOS, J.S.; DO CARMO, M.A.V.; HELLSTROM, J.; PIHLAVA, J.M.; AZEVEDO, L.; GRANATI, D.; MARQUES, M.B. Extration optimization of bioactive compounds from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves and their in vitro antioxidante and antihelmolytic activities. **Food Chemistry**, v. 361, p. 1-12, 2021.

DARNET, L.A.F; POCCARD-CHAPUIS, R.J.M; CLAUDINO, L.S.D; CARVALHO, S.A. Aptidões biofísicas e intensificação agroecológica da pecuária leiteira em assentamentos da Amazônia brasileira. **Geografia Ensino & Pesquisa**, v. 25, n. 1, 2021.

DUARTE, M.R.; HAYASHY, S.S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata*, Mill. (Cactaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 2, p. 103-109, 2005.

EDWARD, E.J.; DONOGHUE, M.J.; *Pereskia* and the origem of the cactus life-form. **The American Naturalist**, v.167, n.06, p. 777-793, 2006.

EDWARD, E.J.; NYFFELER, R.; DONOGHUE, M.J. Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life-form. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 7, p. 177-1188, 2005.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP e WHO. The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all. Roma, FAO. 2021.

Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.ibri.gov.br/> >. Acesso em: 04 set. 2022.

GALERIANI, T.M.; COSMO, B.M.N. Método de determinação de extrato etéreo, proteína bruta e fibra em detergente neutro. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 4, p. 1-9, 2020.

GATEAU, H.; BLANCKAERT, V.; VEILD, B.; BURLET-SCHILTZ, O.; PICHEREAUX, C.; GARGAROS, A.; MARCHAND, J.; SCHOEFS, B. Application of pulsed electric fields for the biocompatible extraction of proteins from the microalga *Haematococcus pluvialis*. **Bioelectrochemistry**, v. 137, p. 1-19, 2021.

GORDALINA, M; PINHEIRO, H.M.; MATEUS, M.; DA FONSECA, M.M.R; CESÁRIO, M.T. Microalgae as protein sources – A review of protein bioactivity, extraction, purification and characterization. **Applied Sciences**, v. 11, n. 17, p. 1-22, 2021.

GUERRERO, P.C.; MAJURE, L.C.; CORNEJO-ROMERO, A., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, T.; Phylogenetic relationships and evolutionary trends in the cactus Family. **Journal of Heredity**, v. 110, n. 1, p. 04-21, 2019.

GÜNERKEN, E; D'HONDT, E; EPPINK, M.H.M.; GARCIA-GONZALES, L.; ELST, K.; WIJFFELS, R.H. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 243-260, 2015.

HADNAĐEV, M.S.; HADNAĐEV, T.R.D.; POJIC, M.M.; ŠARIĆ, B.M.; MIŠAN, Č.; JAVANOV, P.T.; SAKAČ, M.B. Progress in vegetable proteins isolation techniques: a review. *Food and Feed Research*, v. 44, n.1, p. 11-21, 2017.

HUANG, W.C.; KIM, J.D. Cationic surfactant-based method for simultaneous harvesting and cell disruption of a microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 579-581, 2013.

JAHAN, K; ASHFAQ, A; ISLAM, R.U.; YOUNIS, K.; YOUSUF, O. Optimization of ultrasound-assisted protein extraction from defatted mustard meal and determination of its physical, structural, and functional properties. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, p. 1-11, 2022.

JIANG, Y.; ZHU, Y.; ZHENG, Y.; LIU, Z.; ZHONG, Y.; DENG, Y.; ZHAO, Y. Effects of salting-in/out-assisted extractions on structural, physicochemical and functional properties of *Tenebrio molitor* larvae protein isolates. **Food Chemistry**, v. 338, p. 1-9, 2021.

KINUPP, V.F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) do Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014.

KOROTKOVA, N.; AQUINO, D.; ARIAS, S.; EGGLI, U.; FRANCK, A.; GÓMEZ-HINOSTROSA, C.; GUERRERO, P.C.; HERNÁNDEZ, H.M.; KOHLBECKER, A.; KÖHLER, M.; *et al.* Cactaceae at Caryophyllales.Org- A Dynamic Online Species-Level Taxonomic Backbone for the Family. **Willdenowia**, v. 51, p. 251–270, 2021.

KUMAR, M. *et al.* Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. **Food Hydrocolloids**, v.115, p. 1-17, 2021.

KUMAR, M. *et al.* Extraction of ultra-low gossypol protein from cottonseed: Characterization based on antioxidant activity, structural morphology and functional group analysis. **LWT – Food Science and Technology**, v. 140, p. 1-11, 2021.

KUSUMAH, S.H.; ANDOYO, R.; RIALITA, T. Protein isolation techniques of beans using different methods: a review. **International Conference on Food and Bio-Industry**, 2020, 8p.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUCCA, A. Extração, caracterização e aplicação do biopolímero da planta *Pereskia aculeata* Miller como auxiliar coagulante/floculante no processo de tratamento de água. **Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR**, 2017. 71p.

KUMAR, M. *et al.* Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. **Food Hydrocolloids**, v.115, p. 1-17, 2021.

MAUSETH, J.D.; Anatomical adaptations to xeric conditions in *Maihuenia* (Cactaceae), a relictual, leaf-bearing cactus. **Journal of Plant Research**, v.112, p. 307-315, 1999.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed/Panamericana, 2014.

NOBEL, P.S.; HARTSOCK, T.L. Leaf and stem CO₂ uptake in the three subfamilies of the Cactaceae. **Plant Physiology**, v. 80, n. 1, p. 913-917, 1986.

NOORDEN, R.V.; MAHEN, B.; NUZZO, R. The top 100 papers. **Nature**, 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/news/the-top-100-papers-1.16224>. Acessado em: 22 de setembro de 2022.

ODHAV, B.; BEEKRUM, S.; BAIJANATH, H.; Preliminary assessment of nutritional value of traditional leafy vegetables in KwaZulu-Natal, South Africa. **Journal of Food Composition and Analysis**, Africa do Sul, v.20, p. 430-435, 2007.

OKUTUCU, B.; DINÇER, A.; HABIB, O.; ZIHNIOGLU, F. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. **Journal of Biochemical and biophysical Methods**, v. 70, p. 709-711, 2007.

OLIVEIRA, N.L.; RODRIGUES, A.A.; NEVES, I.C.O.; LAGO, A.M.T.; BORGES, S.V.; RESENDE, J.V. Development and characterization of biodegradable films based on *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Industrial Crops & Products**, v. 130, p. 499-510, 2019.

PENDRIL, F. *et al.* Disentangling the numbers behind agriculture-driven tropical deforestation. **Science**, v. 377, n. 1168, p. 1-11, 2022.

PINTO, N.C.C.; CASSINI-VIEIRA, P.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; BARCELOS, L.S.; CASTAÑON, M.C.M.N.; SCIO, E. *Pereskia aculeata* Miller leaves accelerate excisional wound healing in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, n. 24, p. 131-136, 2016.

PINTO, N.C.C.; DUQUE, A.P.N.; PACHECO, N.R., MENDES, R.F.; MOTTA, E.V.S.; BELLOZI, P.M.Q.; RIBEIRO, A.; SALVADOR, M.J.; SCIO, E. *Pereskia aculeata*: a plant food with antinociceptive activity. **Pharmaceutical Biology**, v.52, p. 1780-1785, 2015.

PINTO, N.C.C.; MACIEL, M.S.F.; REZENDE, N.S.; DUQUE, A.P.N.; MENDES, R.F.; SILVA, J.B.; EVANGELISTA, M.R.; MONTEIRO, L.C.; SILVA, J.M.; COSTA, J.C.; SCIO, E. Preclinical studies indicate INFLAVIT, an herbal medicine cream containing *Pereskia aculeata*, presents potential to be marketed as a tropical anti-inflammatory and as adjuvante in psoriasis therapy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 12, p. 1933-1945, 2020.

POJIĆ, M.; MISĀNA.; TIWARI, B. Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. **Trends in Food Science and Technology**, v. 75, p. 93-104, 2018.

PORTO, F.G.S.; CAMPOS, A.D.; CARREÑO, N.L.V.; GARCIA, T.S. *Pereskia aculeata* leaves: properties and potentialities for the development of new products. **Natural Products Research**, v. 36, n. 18, p. 4827-4838, 2022.

POSTMA, P.R.; MIRON, T.L.; OLIVIER, G.; BARBOSA, M.J.; WIJIFFELS, R.H.; EPPINK, M.H.M. Mild desintegration of the green microalgae *Clorella Vulgaris* using bead milling. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 297-304, 2015.

POTIN, F.; LUBBERS, S.; HUSSON, F.; SAUREU, R. Hemp (*Canabis sativa*, L.) protein extraction conditions affect extraction yield and protein quality. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 12, p. 3682-3690, 2019.

PREECE, K.E.; HOOSHHYAR, N.; KRIJGSMAN, A.J.; FRYER, P.J.; ZUIDAM, N.J. Intensification of protein extraction from soybean processing materials using hydrodynamic cavitation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 41, p. 47-55, 2017.

QUIAOYUIN, C.; XINGHONG, N.; LIANG, Z.; ZHENG, T.; JIN, L.; KANG, S.; XUAN, C.; XINGHUI, L. Optimization of protein extraction and decoloration conditions for tea residues. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 4, p. 172-176, 2017.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RAYDER, L.; TING, I.P. Carbon metabolism in two species of *Pereskia* (Cactaceae). **Plant Physiology**, v. 68, n 1, p. 139-142, 1981.

REDE BRASILEIRA DE PESQUISA EM SOBERANIA E SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL (**Rede PENSSAN**) Insegurança alimentar e covid-19 no Brasil. **Relatório** 2021, Brasília, 2021.

REDE BRASILEIRA DE PESQUISA EM SOBERANIA E SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL (**Rede PENSSAN**) Insegurança alimentar e covid-19 no Brasil. **Relatório** 2022, Brasília, 2022.

RIVAS, A.O.; VALDEZ, Y.N.; SALDÍVAR, S.O.S; HERNÁNDEZ, C.C. Microwave and ultrasound to enhance protein extraction from peanut flour under alkaline conditions: effects in yield and functional properties of protein isolates. **Food Bioprocess Technology**, v. 10, p. 543-555, 2017.

ROSA, L.; QUEIROZ, C.R.A.A.; MELO, C.M.T. Fresh leaves of Ora-pro-nóbis in cakes prepared from commercial pre-mixture. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 2, p. 376-382, 2020.

ROSA, S.M.; SOUZA, L.A. Morfo-anatomia do fruto (hipanto, pericarpo e semente) em desenvolvimento de *Pereskia aculeata*, Miller (Cactaceae). **Acta Scientiarum Biological Science**. v. 25, n. 2, p. 415-428, 2003.

SÁEZ-PLAZA, P.; MICHALOWSKI, T.; NAVAS, M.J.; ASUERO, A.G.; WIBRANIEC, S. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and tritrimetric finish. **Critical Review in Analytical Chemistry**, v.43, p.178-223, 2013.

SANTOS, P.P.A.; FERRARI, G.S.; ROSA, M.S.; ALMEIDA, K.; ARAÚJO, L.A.; PEREIRA, M.H.C.; WANDERLEY, M.E.F.; MORATO, P.N. Desenvolvimento e caracterização de sorvete funcional de alto teor proteico com Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) e inulina. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 25, p.1-13, 2022.

SILVA, H.S.; NEVES, I.C.O.; MEIRA, A.C.F.O.; ALEXANDRE, A.C.S.; OLIVEIRA N.L.; RESENDE, J.V. Freeze-dried petit suisse cheese produced with ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*, Miller) biopolymer and carrageenan mix. **LWT – Food Science and Technology**, v. 149, p. 1-9, 2021.

SILVA, V.S. Desenvolvimento e caracterização de iogurtes probióticos, tradicionais e delactosados, adicionados de ora-pro-nóbis e abacaxi. **Dissertação de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - IF Sudeste MG, 2020. 71p.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSOM, G.T.; MALLIA, K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 75-85, 1985.

SQUENA, A.P.; DOS SANTOS, V.L.P.; FRANCO, C.R.C.; BUDEL, J.M. Análise morfoanatômica de partes vegetativas aéreas de *Pereskia aculeata*, Mill., Cactaceae. **Cadernos da Escola de Saúde**. v. 2, n. 8, p. 189–207, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TAKEITI, C.Y.; ANTONIO, G.C.; MOTTA, E.M.P.; COLLARES-QUEIROZ, F.P.; PARK, K.J. Nutritive evaluation of a non-conventional leaf vegetable (*Pereskia aculeata*, Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n.1, p. 148-160, 2009.

VAILETH, T.; KUDAKWASHE, M.; ZHENXING, L.; HONG, L.; MENGYAO, X.; SIDDANAKOPPALU, N.P. A comprehensive review on the application of novel disruption techniques for protein release from microalgae. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 62, p. 4309-4325., 2021.

VIEIRA, C.R.; LOPES Jr, C.O.; RAMOS, C.S.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M.P.C. Extração enzimática das proteínas de farinha de arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 599-606, 2008.

WWF Brasil. **Soja**. Disponível em: https://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/reducao_de_impactos2/agricultura/agr_soja/. Acesso em: 4 jul. 2020.

ZAIA, D.A.M; ZAIA, C.T.B.V; LICHTING, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. Química Nova, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZAPPI, D.; TAYLOR, N.P. *Cactaceae in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB1633>>. Acesso em: 03 ago. 2022.

**CAPITULO 1 – Produção de Concentrado Proteico a Partir das Folhas de
Pereskia aculeata Mill.**

Autor: Thiago Teixeira Costa¹

⁽¹⁾ Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

*Autor para correspondência: ttcosta81@gmail.com

Periódico a ser submetido: Brazilian Journal of Food Technology, novembro de 2022

RESUMO

Pereskia aculeata Miller, é uma planta alimentícia não convencional (PANC) da família Cactaceae, originária do continente americano. Apesar do notório valor nutricional, esta espécie conhecida popularmente como Ora pro nobis, é pouco consumida como alimento. Este trabalho teve o objetivo de produzir um concentrado proteico, através de técnicas baratas e de fácil reprodução. Foi feita a comparação entre duas técnicas, a extração salina (ES) e a extração alcalina (EA). Nas ES foram utilizados dois sais (NaCl e Na₂CO₃) em diferentes concentrações (0,1M, 0,5M e 1M). A EA foi feita isoladamente e combinada com ultrassom (EA+Ultra). As proteínas dos precipitados foram quantificadas por Bradford e ficou estabelecido que os tratamentos mais eficientes foram a EA e EA+Ultra. Num segundo momento, foram comparadas a eficiência na extração das proteínas nos tratamentos EA e EA+Ultra em duas diluições (1:10 e 1:20 (p:v)). As reextrações dos resíduos dos tratamentos EA e EA+Ultra nas mesmas diluições também foram testadas. Foi feito também um produto proteico alternativo, o extrato aquoso liofilizado (EAL). Além disso, foi estabelecida a pureza dos produtos proteicos recuperados e a caracterização do peso molecular das proteínas em gel de poliacrilamida a 12%. Os resultados mostraram que o tratamento EA+Ultra 1:20 foi o melhor na extração das proteínas e na pureza do precipitado. Ficou evidente os efeitos positivo da maior diluição e da combinação do método EA com o ultrassom. Os resultados do gel de eletroforese mostraram duas bandas principais de 68 kDa e de 168 kDa, que podem estar relacionadas respectivamente à uma globulina (β -conglucininina 7S) e à anidrase carbônica, uma proteína relacionada à Rubisco que tem papel fundamental na fotossíntese. O experimento mostrou-se promissor para a produção de concentrado proteico com potencial para ser reproduzido industrialmente.

Palavras-chave: cacto folhoso • ora pro nobis • PANC • proteína • suplemento

ABSTRACT

Pereskia aculeata Miller, is an unconventional food plant (UFP) of the Cactaceae family, originally from the American continent. Despite the notorious nutritional value, this species popularly known as Ora pro nobis, is little consumed as food. This work had the objective of producing a protein concentrate, through cheap and easy-to-reproduce techniques. A comparison was made between two techniques, saline extraction (ES) and alkaline extraction (EA). In ES, two salts (NaCl and Na₂CO₃) were used in different concentrations (0.1M, 0.5M and 1M). EA was performed alone and combined with ultrasound (EA+Ultra). The proteins in the precipitates were quantified by Bradford and it was established that the most efficient treatments were EA and EA+Ultra. In a second moment, the efficiency in the extraction of the proteins in the treatments EA and EA+Ultra in two dilutions (1:10 and 1:20 (p:v)) were compared. Re-extractions of residues from EA and EA+Ultra treatments at the same dilutions were also tested. An alternative protein product, the lyophilized aqueous extract (EAL), was also made. In addition, the purity of the recovered protein products and the characterization of the molecular weight of the proteins in a 12% polyacrylamide gel were established. The results showed that the EA+Ultra 1:20 treatment was the best in protein extraction and precipitate purity. The positive effects of the higher dilution and the combination of the EA method with ultrasound were evident. The gel electrophoresis results showed two main bands of 68 kDa and 168 kDa, which may be related respectively to a globulin (β -conglycinin 7S) and carbonic anhydrase, a protein related to Rubisco that plays a fundamental role in photosynthesis. The experiment showed promise for the production of protein concentrate with the potential to be reproduced industrially.

Keywords: Antioxidant • leafy cactus • Ora pro nobis • UFP • supplement

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com maior diversidade vegetal do mundo. São reconhecidas neste território 50.091 espécies para a flora brasileira, sendo a grande maioria, um total de 35.626, pertencentes ao grupo das Angiospermas (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2022). No entanto, toda essa diversidade não reflete necessariamente os hábitos alimentares da população deste país. No Brasil, o consumo de vegetais privilegia produtos e cultivos exóticos (KINUPP e LORENZI, 2014). O consumo de plantas alimentícias não convencionais (PANC), como a Ora pro nobis (*Pereskia aculeata*, Miller), foco deste estudo, pode trazer inúmeras vantagens nutricionais, inclusive no que se refere às necessidades diárias de proteínas.

Pereskia aculeata, também conhecida como lobrobô, lobrobó, guaiapá, mori e carne de pobre é um cacto arbustivo e folhoso nativo do continente americano. É uma PANC e, como a própria definição do termo sugere, é negligenciada como alimento pela maioria da população brasileira, com exceção de algumas regiões de Minas Gerais, onde são cultivadas em quintais e hortas (KINUPP e LORENZI, 2014).

Incentivar o consumo de proteínas vegetais, principalmente àquelas provenientes das PANC, tem vantagens ambientais, sociais e econômicas. Em uma visão ambiental podemos destacar os impactos causados pela produção de proteína animal, onde a pecuária bovina é a maior causa de prejuízos ambientais da Floresta Amazônica, principalmente pela prática do desmatamento para implantação de pastagens (DARNET *et al*, 2021, PENDRIL *et al*, 2022). A necessidade de grandes áreas para produzir alimento para o desenvolvimento e engorda desses animais também é outro problema. Segundo a WWF Brasil (2020), 79% de toda a soja produzida no mundo tem essa finalidade. Estudo recém publicado indica que entre os anos de 2011 a 2015, o desmatamento total de florestas tropicais foi estimado entre 6,5 Mha a 9,5 Mha por ano, sendo a agropecuária responsável, direta ou indiretamente, por 90% a 99% do total desmatado (PENDRIL *et al*, 2022).

No âmbito social, o consumo de proteínas vegetais pode auxiliar na obtenção das necessidades diárias de proteínas pela população mais desfavorecida socialmente (ODHAV *et al*, 2007; ALMEIDA *et al*, 2014).

Economicamente, as PANC podem incrementar a renda de agricultores familiares caso haja uma política de incentivo ao consumo desses vegetais. As propriedades nutricionais dessas plantas podem ser aproveitadas na indústria

alimentícia de diversas formas e também tem grande potencial a ser explorado pela indústria farmacêutica (PORTO *et al*, 2022).

Os níveis de aminoácidos essenciais presentes nas folhas de *P. aculeata*, são maiores que o mínimo recomendado pela FAO para suprir as necessidades humanas (TAKEITI *et al*, 2009). Segundo Barreira *et al* (2021), *Ora pro nobis* (OPN) é “importante na contribuição nutricional e uma espécie alimentar fundamental para as estratégias de segurança alimentar e nutricional de grupos familiares cuja alimentação e hábitos estão diretamente relacionados ao consumo dessa espécie”. Além disso, ela é descrita como uma planta com grandes concentrações de ferro, cálcio, cobre, potássio, manganês, selênio, fibras e vitamina A (BARREIRA *et al*, 2021). O interesse das indústrias pela OPN vem aumentando expressivamente, no entanto, o isolamento e processamento desses compostos e posterior incorporação em alimentos, ainda carecem de pesquisas (PORTO *et al*, 2021).

Pereskia aculeata possui grande valor nutricional e a extração e isolamento dessas proteínas pode resultar em suplemento proteico com potencial para ser usado na alimentação. Diante disso, este estudo se propôs a produzir, a partir das folhas dessa espécie um *pool* proteico utilizando métodos de extração e isolamento de proteínas simples e baratos, para que o procedimento possa ser reproduzido industrialmente caso haja interesse do setor.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação do material vegetal.

Folhas de *Pereskia aculeata* (figura 02) foram retiradas no dia 09 de novembro de 2020 do espécime localizado na cidade de Guarapari, estado do Espírito Santo – Brasil (20° 62' 65" S 40° 44' 52" O). Assim que a planta floresceu, foi coletado um ramo que foi identificado e registrado no herbário da UFES campus Goiabeiras, com o seguinte número de tomo: VIES 53710.



Figura 5: Espécime utilizado nesse estudo. Foto: autor

A primeira parte do processo foi a produção de um pó de folhas de OPN. Para isso as folhas foram desidratadas em estufa ventilada a 45° C durante 72 horas (ALMEIDA *et al*, 2014; TORRES *et al*, 2022). Com as folhas completamente secas, foi utilizado um liquidificador industrial para transformá-las num pó fino, chamado aqui de pó de OPN. Após essa etapa, 10 gramas do pó de OPN foi pesada e reidratada com água destilada até atingir o volume de 100 ml (solução 1:10 (p:v)).

O passo a passo do experimento seguiu o esquema da figura 06.

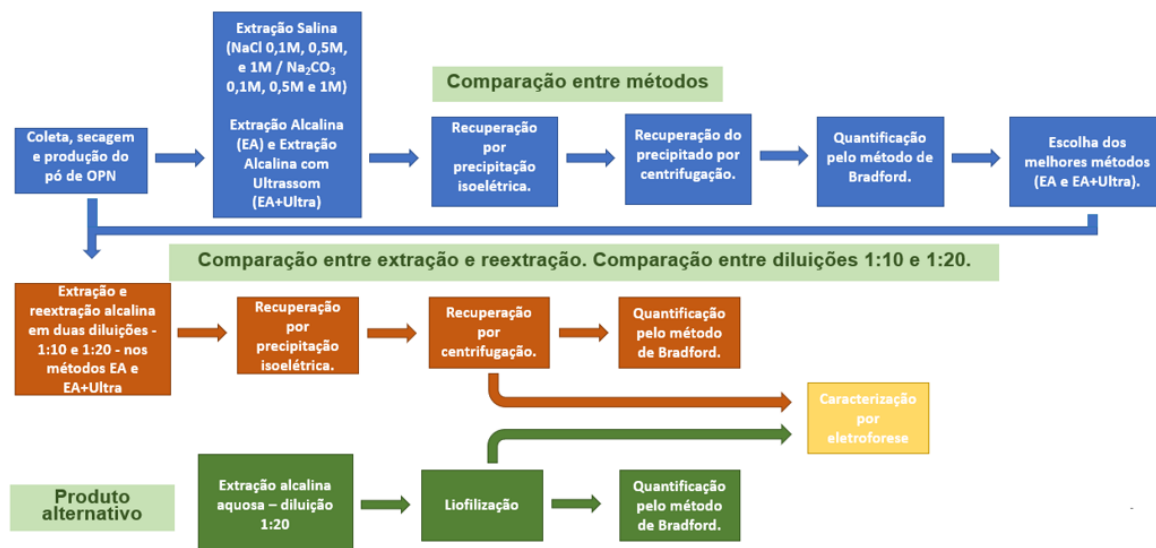


Figura 6: Esquema das fases do experimento.

2.2. Extração de proteínas.

Como o objetivo desse estudo foi produzir um isolado proteico que pode ser utilizado industrialmente, a escolha do método necessariamente precisou levar em conta a reprodutibilidade em larga escala e o baixo custo. Duas metodologias amplamente utilizadas na literatura que atendem essas premissas foram escolhidas: extração aquosa salina e extração aquosa alcalina. A extração aquosa alcalina foi testada isoladamente e combinada com a extração assistida por ultrassom.

Em um primeiro momento foi comparada a extração salina (ES), a extração alcalina (EA) e a extração alcalina combinada com ultrassom (EA+Ultra). Num segundo momento, a EA e a EA+Ultra foram testadas em diferentes diluições (1:10 e 1:20(p/v)) assim como as reextrações dos seus respectivos resíduos.

2.2.1. Extração salina.

A extração salina é um método onde o substrato é diluído em solução salina na força iônica desejada. Foram feitos o *salting in* (solução com concentração de sais menor que 0,15M) e o *salting out* (solução com concentração de sais maior que 0,15M) (BOYE, ZARE e PLETCH, 2010). Foram utilizados dois sais (NaCl e Na₂CO₃) em três diferentes concentrações (0,1M, 0,5M e 1M), que resultaram em seis tratamentos, como mostrado na tabela 2. As soluções ficaram em agitação constante por 30 minutos à temperatura de 45° C e posteriormente foram filtradas com funil e algodão. Uma bomba de vácuo foi usada para acelerar

o processo. Logo após, foi feita a centrifugação a 3400 rpm por 2 minutos para retirar resíduos que eventualmente passaram pelo processo de filtração.

2.2.2. Extração alcalina e extração alcalina combinada com ultrassom.

A EA e a EA+Ultra foram preparadas adicionando-se hidróxido de sódio (NaOH 0,25M) à solução 1:10 (descrita acima) até atingir pH 10. Essas soluções ficaram em agitação constante por 30 minutos a 45° C, sendo que a solução EA+Ultra foi mantida nessa condição em um bécker dentro do sonicador ultrassônico de 40 khz. Logo após foram filtradas com funil e algodão (BOYE, ZARE e PLETCH, 2010). Uma bomba de vácuo foi usada para acelerar o processo. Esses dois métodos foram comparados com a extração por sais. A tabela 2 fornece melhor visualização dos tratamentos.

Tabela 2: Métodos e tratamentos utilizados para comparação da extração por sais (ES), extração alcalina (EA) e extração alcalina combinada com ultrassom (EA+Ultra). Todos os tratamentos foram feitos em triplicata.

Método	Tratamento
ES	NaCl 0,1M
	NaCl 0,5M
	NaCl 1M
	Na ₂ CO ₃ 0,1M
	Na ₂ CO ₃ 0,5M
	Na ₂ CO ₃ 1M
EA	EA
EA+Ultra	EA+Ultra

Após a comparação e definição dos dois melhores métodos (que foram EA e EA+Ultra), novas extrações foram feitas com o objetivo de mensurar o efeito da diluição e da reextração.

Para isso, extrações na concentração 1:10(p:v) e na concentração 1:20(p:v) foram realizadas, usando a mesma metodologia descrita acima, com a diferença que na diluição 1:20 (p:v) 10 gramas do pó de OPN foram pesadas e o volume foi completado com água destilada, até atingir 200 ml de solução. Isso gerou mais quatro tratamentos: extração alcalina na concentração 1:10 (EA 1:10), extração alcalina na concentração 1:20 (EA 1:20), extração alcalina com ultrassom na concentração 1:10 (EA+Ultra 1:10) e extração alcalina com

ultrassom na concentração 1:20 (EA+Ultra 1:20), como mostrado na tabela 3. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata.

Após a filtração da EA e da EA+Ultra, os resíduos do pó de OPN, que seriam descartados, foram reidratados usando a mesma metodologia descrita acima. Dessa forma, mais quatro tratamentos foram obtidos: reextração alcalina na concentração 1:10 (RA 1:10), reextração alcalina na concentração 1:20 (RA 1:20), reextração alcalina com ultrassom na concentração 1:10 (RA+Ultra 1:10) e reextração alcalina com ultrassom na concentração 1:20 (RA+Ultra 1:20) (tabela 03). Todos os tratamentos foram feitos em triplicata.

Tabela 3: Métodos e tratamentos utilizados para comparação entre das extrações alcalinas (EA), extrações alcalinas com ultrassom (EA+Ultra), as reextrações alcalinas (RA) e as reextrações alcalinas com ultrassom (RA+Ultra) em diferentes diluições, 1:10(p:v) e 1:20(p:v). Todos os tratamentos foram feitos em triplicata.

Método	Diluição	Tratamento
EA	1:10	EA 1:10
	1:20	EA 1:20
EA+Ultra	1:10	EA+Ultra 1:10
	1:20	EA+Ultra 1:20
RA	1:10	RA 1:10
	1:20	RA 1:20
RA+Ultra	1:10	RA+Ultra 1:10
	1:20	RA+Ultra 1:20

2.3. Recuperação das proteínas extraídas.

Para a recuperação das proteínas foi feita a precipitação isoelétrica, ou seja, a redução gradativa de pH seguida de centrifugação a 3400 rpm por 25 minutos. Com solução de ácido clorídrico a 1M, o pH da solução foi ajustado para 6 e então foi feita a primeira centrifugação, em tubos Falcon de 50 ml. Os precipitados foram colocados com seus respectivos tubos Falcon, previamente pesados e identificados, na desidratadora e o sobrenadante teve pH ajustado para 5, seguido de nova centrifugação. O processo seguiu assim até obter-se o precipitado desidratado do pH 2. A recuperação das proteínas foi feita dessa forma em todos os tratamentos, o que gerou cinco amostras em cada tratamento.

O peso dos precipitados foi obtido pela diferença do peso do tubo Falcon com o precipitado desidratado e o peso do tubo Falcon vazio.

2.4. Extrato aquoso liofilizado.

Por fim, foi pesado 50 gramas de farinha de OPN que foi reidratada até atingir o volume de 1000 ml, ou seja, uma extração aquosa alcalina 1:20 (p:v), como já descrita acima. O objetivo foi testar um produto alternativo, o extrato aquoso liofilizado (EAL). Esse extrato foi filtrado e centrifugado por 2 minutos a 3400 rpm para a retirada dos resíduos que eventualmente passaram pela filtração. No entanto, esse extrato não passou pela precipitação isoelétrica e, em vez disso, foi liofilizado.

Os volumes efetivamente recuperados dos extratos foram medidos tanto após a filtração das EA quanto das RA e do EAL. A porcentagem do volume recuperado foi calculada através de regra de três simples, pela equação 01:

$$\% Vol. Rec. = \frac{Vol. Rec. * 100\%}{Volume Total do Extrato}$$

Onde o volume total do extrato para os tratamentos com diluição 1:10 (p:v) foi de 100 ml, nos tratamentos com diluição 1:20(p:v) foi de 200 ml e no EAL foi de 1000 ml.

2.5. Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford. (BRADFORD, 1976).

Amostras dos precipitados nos diferentes tratamentos e amostras do EAL foram reidratadas e solubilizadas com o auxílio de um sonificador ultrassônico nas diluições 5% e 10%. A curva de calibração foi feita com albumina humana a 10%, 20%, 40% e 80%.

Em microplacas de 96 poços foram pipetadas 5 µl das soluções (branco, albumina e amostras) em triplicata, com o auxílio de um pipetador multicanal.

Ao encerrar a pipetagem, as microplacas foram colocadas em agitador de microplacas por 30 segundos e, logo após, foram deixadas para reagir por 10 minutos. O procedimento foi realizado no escuro, pois o reagente de Bradford é fotossensível. As leituras foram realizadas no ELISA da Universidade de Vila Velha (UVV) à 595 nm. Todas as leituras foram feitas em triplicata.

A leitura da albumina humana em concentrações conhecidas possibilitou calcular o coeficiente de correlação Pearson, correlacionando as absorbâncias

médias às concentrações. O coeficiente angular da reta foi calculado através das diferenças dos valores de Y de um ponto “b” e de um ponto “a” no gráfico, dividido pelas diferenças dos valores de X dos mesmos pontos. A interceptação da reta no eixo X foi calculada quando o valor de Y na equação da reta foi igual a zero.

Com essas informações foi possível calcular a concentração das proteínas das amostras através dos valores das absorbâncias lidos no ELISA. A concentração das proteínas nas amostras é dada pela diferença da absorbância média de cada amostra pela interceptação da reta no eixo X dividido pela inclinação da reta, como mostrado na equação 02:

$$\text{Conc. Proteínas} = \frac{\text{Abs. média} - \text{interceptação}}{\text{inclinação}}$$

A concentração total das proteínas em cada amostra é dada pela concentração de proteínas (equação 02) multiplicado pelo valor da diluição da amostra que foi lida. Equação 03:

$$\text{Conc. Total Proteínas} = \text{Conc. Proteínas} * \text{diluição}$$

Todas essas análises foram feitas automaticamente no Microsoft Excel® onde também foram construídos os gráficos das curvas de calibração.

O método de Bradford mede a concentração de proteínas em mg/mL em cada amostra. Logo, para se chegar ao valor do total de proteínas extraídas em cada tratamento, basta multiplicar o volume total do extrato pela somatória das proteínas extraídas em cada amostra de cada tratamento, como proposto na equação 04:

$$\text{Total Prot. Ex.} = \sum(\text{Prot. Ex. nos pH 2, 3, 4, 5 e 6}) * \text{Volume Total do Extrato}$$

A porcentagem de proteínas extraídas foi calculada por regra de três simples, relacionando o peso do pó de OPN que foi utilizada em cada tratamento com o total de proteínas extraídas, como mostrado na equação 05:

$$\% \text{ Prot. Extraída} = \frac{\text{Total Prot. Ext.} * 100\%}{\text{Peso do pó de OPN}}$$

Como descrito anteriormente, os pesos dos precipitados foram registrados assim como os volumes de extrato recuperados, permitindo assim o cálculo da porcentagem de pureza dos precipitados que foram feitos através da equação 06:

$$\% \text{ Pureza do Precipitado} = \frac{\text{Total Prot. Rec.} * \% \text{ Vol. Rec.} * 100\%}{\text{Peso do Precipitado}}$$

2.6. Caracterização do peso molecular

O peso molecular das proteínas foi caracterizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida (*SDS-Page*) a 12%, utilizando o método descrito por Laemmli (1970). À exceção da Tetramethylethylenediamina (TEMED) que é da marca Sigma®, as soluções descritas na tabela 02 foram preparadas e o gel foi feito seguindo a ordem da tabela.

Tabela 4: Soluções para a preparação do gel.

Gel de corrida	
Solução	Volume Pipetado (µl)
Tampão Tris 0,773 M pH 8,9	6180
Água Destilada	2480
Solução Acrilamida / Bis acrilamida (29:1)	3900
SDS 10%	127
TEMED	8,4
APS 10%	317
Gel de entrada	
Solução	Volume Pipetado (µl)
Tampão Tris 0,5 M pH 6,9	2580
Água Destilada	6668
Solução Acrilamida / Bis acrilamida (29:1)	1052
SDS 10%	104
TEMED	10,4
APS 10%	104

Como a ordem da tabela sugere, primeiro foi preparado o gel de corrida e, 8 ml da solução foi pipetada entre as placas de 1,5 mm. Quando esse gel terminou a polimerização foi feito o gel de entrada a 4%, e o volume da placa foi completado

com essa solução. Em seguida o pente foi inserido entre as placas até que o gel polimerizar por completo.

O tampão de corrida foi preparado com 3g de Tris e 14,4g de glicina. Água destilada foi adicionada até completar o volume de 990 ml e o pH foi ajustado para 8,3 com ácido clorídrico 1M. Logo após, 10 ml de SDS 10% foi adicionado à solução.

A solução mãe do tampão de amostra foi preparado com 4 ml de água destilada, 1,25 ml de tampão Tris 0,5M (pH 6,8), 2,5 ml de glicerol, 2 ml de SDS 10% e 0,2 ml de azul de bromofenol 0,1% e 0,05 ml de β -mercaptoetanol. O β -mercaptoetanol foi adicionado somente na hora em que as amostras foram processadas.

Os precipitados das amostras foram reidratados e solubilizados em soluções de 10 mg/ml com o auxílio do sonicador ultrassônico. 20 μ l de cada uma das amostras foram transferidas para eppendorfs previamente identificados e mais 20 μ l do tampão de amostra foi adicionado. Os eppendorfs com as amostras, devidamente fechados, ficaram em água a 95°C por 5 minutos para a desnaturação completa das proteínas. A amostra do marcador *GE Healthcare LMW SDS* passou pelo mesmo tratamento.

Com o gel completamente polimerizado, a cuba eletroforética foi montada e o tampão de corrida adicionado. 30 μ L de cada amostra foi pipetada em poços distintos obedecendo a seguinte ordem da esquerda para a direita: marcador (M), poço vazio, precipitado em pH 2 (pH 2), precipitado em pH 3 (pH 3), precipitado em pH4 (pH 4), precipitado em pH 5 (pH5), precipitado em pH 6 (pH 6), extrato aquoso liofilizado (EAL) e extrato bruto (EB). O equipamento foi programado para fazer a corrida em 130 volts por 3 horas. As amostras utilizadas para a corrida foram provenientes do tratamento EA+Ultra 1:20, com exceção da amostra do EAL.

Ao final da corrida, o gel ficou em solução de coloração por 30 minutos, preparada com 0,062 g de *Coomassie blue R-250*, 25 ml de metanol, 17,5 ml de ácido acético e água destilada até atingir 250 ml. Por fim o gel foi descolorido em solução de ácido acético a 7% por 48 horas.

Para encontrar a massa das proteínas no gel de eletroforese, foi necessário primeiro medir o comprimento da corrida até a formação de cada banda e calcular o coeficiente de mobilidade relativa, pela equação 07:

$$\text{Coef. Mob. Relativa} = \frac{\text{comprimento da corrida até banda}}{\text{comprimento total da corrida}}$$

As massas conhecidas das bandas do marcador foram logaritimizadas na base 10, chegando ao valor da massa relativa de cada banda das amostras, pela equação 08:

$$\text{Log (massa da banda)} = \text{massa relativa da banda}$$

os resultados foram relacionados com os respectivos coeficientes de mobilidade relativa. Dessa forma foi possível construir o gráfico da curva padrão e chegar à equação da reta.

A substituição do valor de X pelo coeficiente de mobilidade relativa de cada banda das amostras forneceram os valores dos logaritmos das massas das respectivas bandas. Para chegar às massas reais das bandas foi feita a função inversa à função logarítmica, ou seja, a função exponencial. A equação 9 foi usada para esse fim:

$$\text{Massa da banda} = 10^{(\text{massa relativa da banda})}$$

Os cálculos e o gráfico foram feitos no Microsoft Excel e o gel foi analisado com auxílio do programa ImageJ.

2.7. Análise estatística

Para verificar se houveram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos foram feitas análises de variância (ANOVA) com nível de significância $p = 0,05$. Os valores de p menores ou iguais a 0,05 leva à rejeição da hipótese nula, de que todos os tratamentos são estatisticamente iguais e, assumindo a hipótese alternativa como verdadeira, de que há diferenças significativas entre os tratamentos. A anova, no entanto só nos fornece a informação quanto a semelhança ou diferença dos tratamentos. Para saber quais tratamentos foram estatisticamente diferentes uns dos outros e quais foram os mais eficientes, foi necessário aplicar testes de Tukey. Essas análises foram feitas utilizando o programa Rstudio.

3. RESULTADOS

3.1 Comparação entre ES, EA e EA+Ultra

Os métodos de extração foram comparados quanto à eficiência na extração de proteínas, relacionando os tratamentos em triplicata com a concentração de proteínas em mg/ml e, a anova retornou valor de $p = 6,02 \cdot 10^{-16}$, assumindo a hipótese alternativa de que há diferença nos tratamentos.

Tabela 5: Extrações médias das proteínas com os seus respectivos tratamentos. Letras iguais significam que os tratamentos são estatisticamente iguais.

Tratamento	Média (mg/ml)
EA+Ultra	20.8 ± 0.511^a
EA	14.2 ± 0.228^b
NaCl 1M	8.62 ± 1.03^c
NaCl 0,5M	7.83 ± 0.181^{cd}
Na ₂ CO ₃ 1M	7.49 ± 0.592^{cd}
Na ₂ CO ₃ 0,5M	6.40 ± 0.357^{de}
Na ₂ CO ₃ 0,1M	5.34 ± 0.592^{ef}
NaCl 0,1M	4.04 ± 0.266^f

De acordo com o teste de Tukey, o tratamento mais eficiente na extração de proteínas foi EA+Ultra, seguido por EA (tabela 06, figura 7). As extrações com sais tiveram desempenho muito inferior aos tratamentos com soluções alcalinizadas. Para dar continuidade a esse estudo, foram escolhidos os dois melhores tratamentos.

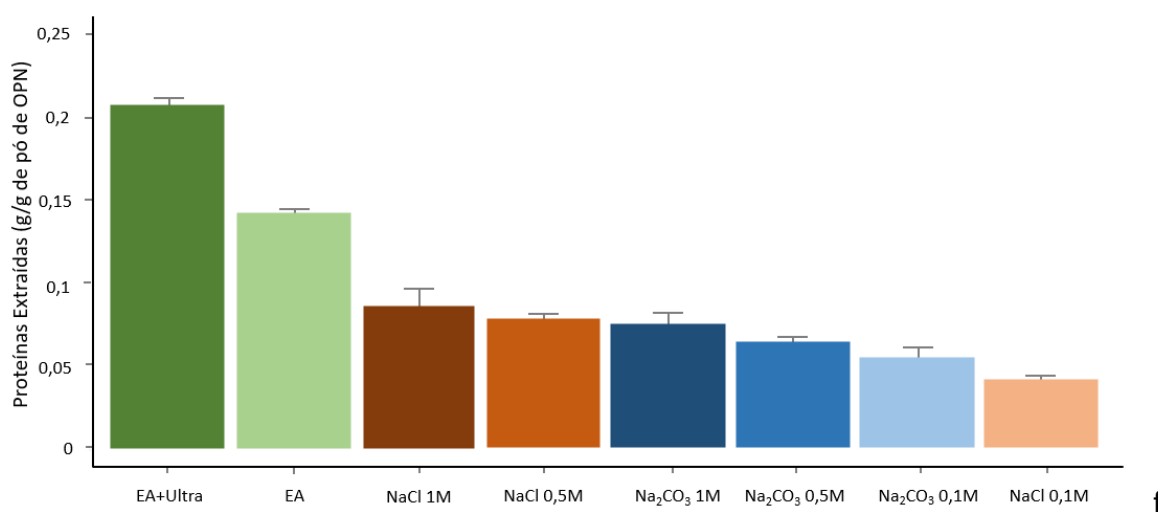


Figura 7: Quantidade de proteínas extraídas em cada tratamento.

3.2 Efeito da diluição e da reextração.

Para fazer a análise de variância (anova) dos tratamentos nas diluições 1:10 e 1:20 foi relacionado a quantidade de proteínas extraídas com seus devidos tratamentos e a anova retornou o valor de $p < 2^{-16}$, rejeitando a hipótese nula e indicando que existe diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 6: Proteínas extraídas (g/g de pó de OPN), porcentagem de proteínas extraídas do pó de OPN e pureza do precipitado de cada tratamento. Letras iguais significam que os tratamentos são estatisticamente iguais.

Tratamento	Media do total de proteínas extraídas (g/g de pó de OPN)	Porcentagem média de proteína extraída	Porcentagem média da pureza do precipitado
EA+Ultra 1:20	0,2742 ±35.9 ^a	27,42%	72.1% ± 0.785 ^b
EA 1:20	0,2166 ±136 ^b	21,66%	60.8% ± 5.87 ^c
EAL	0,2099 ±79,3 ^b	20,99%	24.6% ± 0.894 ^e
EA+Ultra 1:10	0,2054 ±73.5 ^b	20,54%	60.8% ± 2.98 ^c
EA 1:10	0,1502 ±73.2 ^c	15,02%	53.9% ± 1.26 ^d
RA 1:10	0,0584 ±16.3 ^d	5,84%	82.8% ± 0.123 ^a
RA+Ultra 1:10	0,0579 ±41.2 ^d	5,79%	83.6% ± 0.747 ^a
RA 1:20	0,0461 ±23.3 ^d	4,61%	86.4% ± 1.42 ^a
RA+Ultra 1:20	0,0130 ±19.1 ^e	1,3%	84.5% ± 1.31 ^a

O teste de Tukey mostrou que tratamento mais eficaz foi EA+Ultra 1:20 seguido da EA 1:20 que se mostrou estatisticamente igual ao tratamento EA+Ultra 1:10. As reextrações, como era esperado, foram os tratamentos que extraíram a menor quantidade de proteínas, sendo que a RA+Ultra 1:20 foi o tratamento que menos extraiu proteínas.

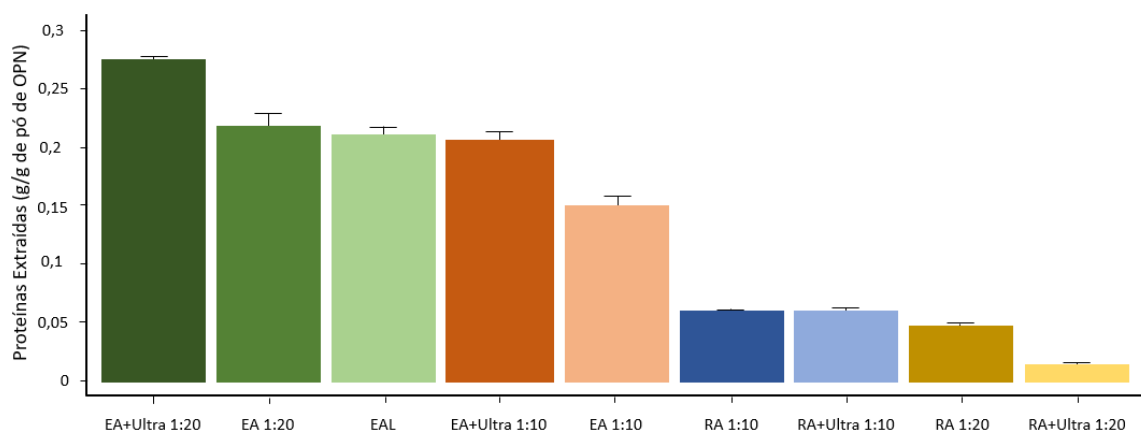


Figura 8: Quantidade de proteínas extraídas por grama de pó de OPN.

3.3. Extrato aquoso liofilizado

O EAL foi testado como um produto alternativo aos outros tratamentos, portanto, esse tratamento foi comparado àqueles quanto à eficiência na extração de proteínas.

O valor de $p = 1,52^{-7}$ dessa análise de variância também rejeita a hipótese nula de que todos os tratamentos são estatisticamente iguais.

O teste de Tukey mostrou semelhança entre o EAL, EA 1:20 e EA+Ultra 1:10. EAL mostrou-se menos eficiente na extração de proteínas apenas quando comparado a EA+Ultra na diluição 1:20 (tabela 7, figura 8).

3.4. Efeito dos tratamentos na pureza do precipitado

A anova das médias de pureza dos precipitados de cada tratamento retornou valor de $p < 2^{-16}$, mostrando diferenças significativas nos tratamentos.

O teste de Tukey revelou que os tratamentos em que os precipitados tiveram maior percentual de proteínas foram as reextrações, que foram estatisticamente iguais em todos os tratamentos. Com relação às extrações, o método EA+Ultra 1:20 foi o melhor seguido do EA 1:20 e Ea+Ultra 1:10 que se mostraram estatisticamente iguais (tabela 7, figura 9).

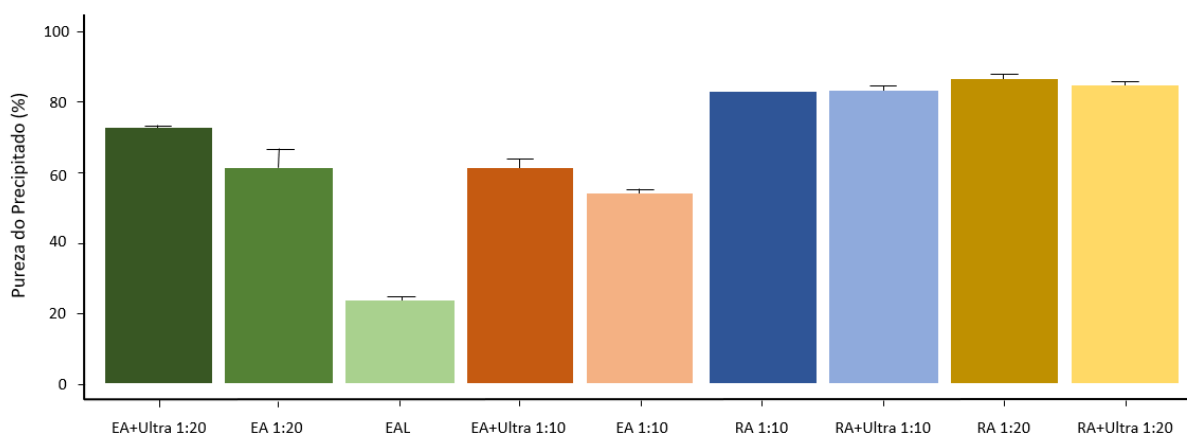


Figura 9: Percentual de pureza dos precipitados em cada tratamento.

3.5. Caracterização do peso molecular das proteínas

A análise do gel revelou duas bandas principais (figura 10), uma proteína de 168 kDa foi revelada em todos os tratamentos e outra proteína de 68 kDa foi verificada nos precipitados em pH 2, pH3, pH 4, pH 5 e no extrato bruto (EB). O extrato aquoso liofilizado (EAL) foi o tratamento que mais revelou bandas. O comprimento total da corrida foi de 9284 mm. As massas das bandas encontradas foram plotadas na tabela 8.

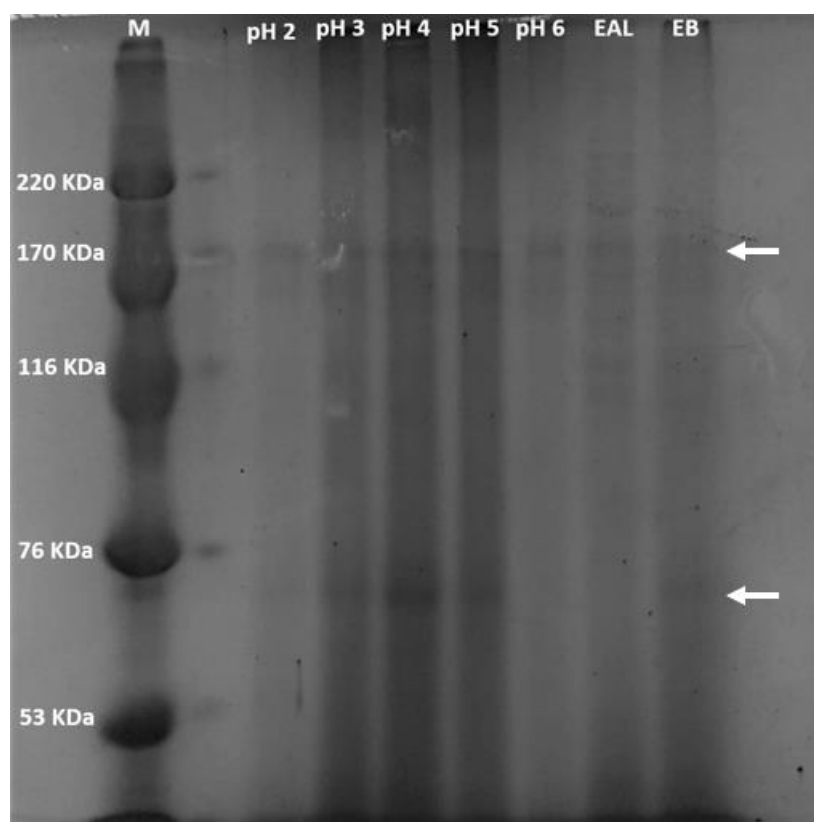


Figura 10: Perfil das proteínas em gel de eletroforese.

Tabela 7: Peso molecular das proteínas marcadas no gel. M = marcador; EAL = extrato aquoso liofilizado; EB = extrato bruto; pH2 = precipitado em pH2; pH3 = precipitado em pH3; pH 4 = precipitado em pH 4; pH 5 = precipitado em pH 5 e pH 6 = precipitado em pH 6.

Tratamento	Comp. Corrida (mm)	Massa da Proteína (kDa)
M	7920	53
M	6050	76
M	3916	116
M	2552	170
M	1628	220
EAL	1452	217
EAL e EB	2112	187
pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, EAL e EB	2592	168
EAL	2772	162
EAL	2992	154
EAL	3322	143
EAL	3998	124
EAL e EB	4268	116
EAL e EB	4554	108
pH 2, pH 3, pH 4, pH 5 e EB	6611	68

4. DISCUSSÃO

A comparação preliminar dos métodos de extração mostrou diferenças na extração de proteínas das folhas de *Pereskia aculeata* (figura 07) e evidenciou a importância do método no sucesso do procedimento. As maiores quantidades de proteínas extraídas foram em meios mais alcalinos e estão de acordo com os estudos de Potin *et al* (2019). Em estudo com semente de amaranto, Reis e Netto (2006) concluíram que valores mais elevados de pH na etapa de extração resultam no aumento da porcentagem final de proteína no concentrado proteico. Os melhores resultados em meios alcalinos são obtidos pois as proteínas são melhores solubilizadas quando o pH é mais elevado. Em pH mais alcalino as proteínas ficam mais carregadas, produzindo repulsão entre as moléculas e, conseqüentemente, aumentando a solubilidade (POLEGRINE e GAPARETTO, 2003). Os resultados mostraram que o aumento da força iônica do meio, na extração pelos sais NaCl e Na₂CO₃, apresentaram menor recuperação das proteínas quando comparado ao aumento do pH. Contudo, Reis e Netto (2006) combinaram os dois métodos e observaram melhor rendimento quando a extração alcalina é combinada com a extração por sais, procedimento que não foi testado neste estudo. Já Potin *et al* (2019) não relataram efeitos sinérgicos na extração das proteínas de *Cannabis sativa* usando os dois tratamentos simultaneamente. Provavelmente a convergência de métodos potencializa a extração e, entre as possíveis variáveis a serem combinadas, podemos destacar o tempo de extração, pH, temperatura, ultrassom, diluição, tratamento enzimático e vários outros (KUMAR *et al*, 2021). Diante disso, o aumento de proteínas solubilizadas combinado com ultrassom (EAPI+Ultra) também encontra respaldo na literatura (YU *et al*, 2016; VERNÈS *et al*, 2019, RAHMAM e LAMSAL, 2021), provavelmente devido aos efeitos mecânicos do ultrassom, como a liberação de compostos pela quebra da parede celular e pela agitação da solução que permite maior interação entre o solvente e as proteínas (GORDALINA 2021).

A proporção de solvente que melhor extraiu as proteínas das folhas de *Pereskia aculeata* foi a 1:20 (p:v). Esse fato pode ter relação com a solução 1:10 estar próxima ao ponto de saturação do meio. A influência da proporção de solvente ficou evidenciada por dois fatores: (i) os tratamentos que mais extraíram proteínas foram as extrações na proporção de solvente 1:20 e (ii) as análises estatísticas indicaram diferenças entre os tratamentos EA 1:20 e EA 1:10 e também entre os tratamentos EA+Ultra 1:20 e EA+Ultra 1:10 (tabela 07). A igualdade estatística

entre os tratamentos EA 1:20 e EA+Ultra 1:10 indica que a maior diluição do meio favoreceu na extração de proteínas tanto quanto a combinação do método com o ultrassom na menor diluição, ou seja, a diluição e o ultrassom potencializaram a extração de proteínas na mesma medida. Em estudos de extração de proteínas de semente de algodão, Kumar *et al*, (2021) também observaram melhores resultados em amostras mais diluídas, que chegou ao máximo em concentração 1:33 (p:v), quando os autores recuperaram 93,6% das proteínas das sementes. Quiaoyuin *et al* (2017) também recuperaram mais proteínas em amostras de chá mais diluídas.

Além disso, a influência da combinação do método com o ultrassom também ficou clara nessas análises estatísticas, pois o tratamento EA+Ultra 1:20 foi o que melhor extraiu proteínas e o tratamento EA+Ultra 1:10 foi significativamente mais eficiente que a extração no tratamento EA 1:10 (figura 08). A combinação da melhor diluição com a extração alcalina mais ultrassom (tratamento EA+Ultra 1:20) retornou média de 27,42% de proteínas extraídas das folhas de *Ora pro nobis* (tabela 7), resultados semelhantes ao encontrado por Takeiti *et al* (2009).

Quanto às reextrações, o pior desempenho do tratamento RA+Ultra 1:20 (figura 08), sugere que as proteínas solúveis do pó de OPN podem ter sido praticamente exauridas, já que o tratamento foi significativamente diferente das outras reextrações. Além disso, sua respectiva extração (tratamento EA+Ultra 1:20) foi o mais eficiente, podendo ter extraído quase a totalidade das proteínas solúveis do pó de OPN. Não foram encontrados estudos de reextração de proteínas vegetais na literatura para comparação com os resultados alcançados neste trabalho. No entanto, Reis e Netto (2006) avaliaram a eficiência da extração de proteínas através do percentual de proteínas no resíduo, no soro e na água de ressuspensão. Em seu estudo, as autoras encontraram 51,4% de proteínas ainda presentes no resíduo da farinha de sementes de amaranto que passaram pelo processo de extração alcalina em pH 9. As diferenças entre as metodologias utilizadas no presente trabalho e no de Reis e Netto (2006), além da diferença do material vegetal usado como matéria prima, impedem uma comparação direta, porém aponta para a necessidade de uma melhor investigação quanto ao percentual de proteínas que ainda tenha ficado no resíduo do pó de OPN neste estudo. Contudo, a hipótese de que as proteínas podem ter exaurido da farinha de OPN, é fundamentada em trabalhos que obtiveram os maiores percentuais de proteínas das folhas de *Pereskia aculeata* encontrados na literatura (TAKEITI *et al*, 2009). No referido

estudo, os percentuais de proteínas ficaram muito próximo ao extraído no tratamento EA+Ultra 1:20 deste trabalho.

O ponto em que maior quantidade de proteínas foram recuperadas foi o pH 4, o que está de acordo com a maioria dos estudos na literatura (MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996; GLÓRIA e REGITANO-d'ARCE, 2000; LAWAL, 2004; REIS e NETTO, 2006), indicando ser este o ponto isoelétrico das proteínas das folhas de *Pereskia aculeata*. A recuperação das proteínas pelo método de precipitação isoelétrica, na maioria dos casos resulta em um produto escurecido devido à precipitação de moléculas de clorofila e polifenóis que foram co-extraídos junto com a proteína. Nesse caso, é comum apresentarem um sabor amargo desagradável, o que é indesejável (HADNADEV *et al*, 2017).

Ao analisar a eficiência da extração de proteínas dos tratamentos que passaram pela precipitação isoelétrica e compará-los com o produto alternativo, o extrato aquoso liofilizado (EAL), ficou evidente que em relação à concentração de proteínas, o EAL obteve um excelente rendimento, pois trata-se de uma extração alcalina na diluição 1:20, que em vez de passar pela precipitação isoelétrica, foi liofilizada. Esse tratamento foi estatisticamente semelhante aos tratamentos EA 1:20 e EA+Ultra 1:10 (figura 08).

No entanto o cenário muda quando comparamos a pureza do isolado proteico (figura 9). Nesta situação, como era esperado, o tratamento EAL foi o que obteve a pior pureza, com 24,6% em média. Esse número é devido a todo o extrato ter passado pelo processo de liofilização, sem o isolamento prévio das proteínas. Por outro lado, esse teste evidenciou a eficiência da precipitação isoelétrica como um método de isolamento de proteínas.

As reextrações foram os tratamentos que obtiveram as maiores purezas, variando em torno de 85%, porém, como o rendimento desses isolados foi muito baixo, esses tratamentos não são industrialmente viáveis. Todas as reextrações foram estatisticamente iguais quanto à pureza dos precipitados (tabela 7).

Entre todas às extrações, o EA+Ultra 1:20 mais uma vez foi o melhor tratamento com percentual de pureza de 72,1%, significativamente diferente das outras extrações. Este tratamento pode ser caracterizado como um concentrado proteico, por ter atingido tal concentração de proteínas e por ser um produto resultante da insolubilização das proteínas por precipitação isoelétrica (GRANDE e CREN, 2016). O tratamento EA 1:20 e EA+Ultra 1:10 são estatisticamente

semelhantes e ambos são diferentes do tratamento EA 1:10 (tabela 7). Essas análises também indicam o efeito positivo da diluição e da combinação da extração alcalina com ultrassom na pureza do precipitado. De acordo com os resultados, e considerando a diluição e o ultrassom, pode-se dizer que cada um deles contribuiu para a pureza do precipitado na mesma proporção pois, assim como ocorreu com o efeito da diluição e do ultrassom na extração de proteínas (discutido acima), os tratamentos EA 1:20 e EA+Ultra 1:10 foram estatisticamente iguais. Em relação aos tratamentos EA 1:10, EA 1:20 e EA+Ultra 1:10, o percentual de proteínas do produto o definiria como farinha proteica (GRANDE e CREN, 2016). Apesar de nenhum dos tratamentos ter atingido mais que 90% de proteínas e, portanto, não serem caracterizados como isolados proteicos, seria possível aumentar a proporção de proteínas no produto caso mais tratamentos fossem feitos com o precipitado, como por exemplo a diálise.

O perfil eletroforético das proteínas (figura 10) mostra a presença de duas principais bandas, uma de 68 kDa e outra de 168 kDa, além de outras bandas mais fracas que variaram entre 108 kDa e 217 kDa (tabela 8).

Lazova e Stemler (2008) encontraram em seus estudos uma proteína de 160 kDa com atividade de anidrase carbônica associada à rubisco em sementes de ervilha, o que pode corresponder à proteína de 168 kDa encontrada neste estudo. A rubisco é a enzima mais abundante nos vegetais, correspondendo a até 40% do peso total das proteínas solúveis presentes na maioria das folhas (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2001). Portanto, o fato da banda de 168 kDa ser a mais bem marcada do gel pode fazer sentido quanto à associação dessa banda com uma enzima relacionada ao processo da fotossíntese.

Takeiti *et al*, 2009 encontrou uma banda bem evidente de 61 kDa em folhas de *Pereskia aculeata*, que pode ser comparada a banda de 68 kDa no presente trabalho. Naquela ocasião, os autores associaram a proteína em questão à subunidade β da β -conglucina 7S de soja, uma globulina. Tal proteína, que também ficou bem marcada no gel neste trabalho, é reportada na literatura por seus efeitos benéficos no metabolismo de colesterol, das lipoproteínas plasmáticas e da glicose (FERREIRA, 2008).

1. CONCLUSÕES

As folhas de *Pereskia aculeata* apresentaram potencial para a produção de um produto proteico. Os resultados obtidos mostraram grande concentração de proteínas e a possibilidade de extraí-las utilizando métodos fáceis e baratos que podem ser reproduzidos industrialmente. O método que melhor atendeu as expectativas foi o EAPI+Ultra 1:20, que obteve bom rendimento e elevado percentual de pureza do precipitado. O estudo mostrou o efeito positivo da diluição e do ultrassom na extração de proteínas das folhas de *Pereskia aculeata* que pode inclusive ser uma alternativa para ajustar o processo em busca de melhores custos-benefícios para a indústria. Em regiões com grande disponibilidade de água e energia cara, pode-se aumentar a diluição e dispensar o ultrassom e ainda assim ter bons rendimentos como o encontrado no tratamento EA 1:20. Em regiões com pouca disponibilidade de água e oferta abundante de energia solar, pode-se diminuir a diluição até certo ponto e utilizar o ultrassom como auxiliar no processo de extração e, ainda assim ter um bom rendimento na extração, como no tratamento EA+Ultra 1:10. Apesar dos resultados satisfatórios, o uso do concentrado proteico obtido neste estudo, ainda precisa de maiores estudos para serem utilizados na alimentação.

2. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.E.F.; JUNQUEIRA, A.M.B.; SIMÃO, A.A.; CORRÊA, A.D. Caracterização química das hortaliças não convencionais conhecidas como Ora-pro-nobis. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.30, n.1, p. 431-439, 2014.

BARREIRA, T.F.; PAULA-FILHO, G.X.; PRIORE, S.E.; SANTOS, R.H.S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Nutrient content in ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.): unconventional vegetable of the Brazilian Atlantic Forest. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 41, p. 47-51, 2021.

BOYE, J.; ZARE, F.; PLETCH, A. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. **Food Research International**, v.43, p. 414-431, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

DARNET, L.A.F; POCCARD-CHAPUIS, R.J.M; CLAUDINO, L.S.D; CARVALHO, S.A. Aptidões biofísicas e intensificação agroecológica da pecuária leiteira em assentamentos da Amazônia brasileira. **Geografia Ensino & Pesquisa**, v. 25, n. 1, 2021.

FERREIRA, E.S. Efeito da proteína β -conglícinina da soja no metabolismo lipídico de animais submetidos à dieta hipercolesterolêmica. **Dissertação de Mestrado em Ciências Nutricionais**, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2008. 102p.

Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 04 set. 2022.

GLÓRIA, M.M.; REGITANO-d'ARCE, M.A.B. Concentrado e isolado proteico de torta de castanha do pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Food Science and Technology**, v. 20, n. 2, 2000.

GORDALINA, M; PINHEIRO, H.M.; MATEUS, M.; DA FONSECA, M.M.R; CESÁRIO, M.T. Microalgae as protein sources – A review of protein bioactivity, extraction, purification and characterization. **Applied Sciences**, v. 11, n. 17, p. 1-22, 2021.

GRANDE, S.C.; CREN, E.C. Demanda de proteínas vegetais: potencialidades e o diferencial dos farelos de macaúba (revisão). **Revista de Engenharia química e Química**, v. 2, n. 3, p. 190-214, 2016.

HADNADEV, M.S.; HADNADEV, T.R.D.; POJÍC, M.M.; ŠARIĆ, B.M.; MIŠAN, Č.; JAVANOV, P.T.; SAKAČ, M.B. Progress in vegetable proteins isolation techniques: a review. **Food and Feed Research**, v. 44, n.1, p. 11-21, 2017.

KINUPP, V.F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) do Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014.

KUMAR, M. *et al.* Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. **Food Hydrocolloids**, v.115, p. 1-17, 2021.

KUMAR, M. *et al.* Extraction of ultra-low gossypol protein from cottonseed: Characterization based on antioxidant activity, structural morphology and functional group analysis. **LWT – Food Science and Tchnology**, v. 140, p. 1-11, 2021.

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685. 1970.

LAWAL, O.S. Functionality of African locust bean (*Parkia biglobossa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. **Food Chemistry**, v. 86, p. 345-355, 2004.

LAZOVA, G.N.; STEMLER, A.J. A 160 kDa protein with carbonic anhydrase activity is complexed with rubisco on the outer surface of thylakoids. **Cell Biology International**, v. 32, p. 646-653, 2008.

MARTÍNEZ, E.N.; AÑÓN, M.C. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n. 9, p. 2523-2530, 1996.

ODHAV, B.; BEEKRUM, S.; BAIJANATH, H.; Preliminary assessment of nutritional value of traditional leafy vegetables in KwaZulu-Natal, South Africa. **Journal of Food Composition and Analysis**, Africa do Sul, v.20, p. 430-435, 2007.

PENDRIL, F. *et al.* Disentangling the numbers behind agriculture-driven tropical deforestation. **Science**, v. 377, n. 1168, p. 1-11, 2022.

POLEGRINE, D.H.G.; GASPARETTO, C.A. Estudo da solubilidade de proteínas da clara de ovo em função da temperatura e do pH. **Revista de Ciências Exatas e Naturais**, v. 5, n.2, p. 169-178, 2003.

PORTO, F.G.S.; CAMPOS, A.D.; CARREÑO, N.L.V.; GARCIA, T.S. *Pereskia aculeata* leaves: properties and potentialities for the development of new products. **Natural Products Research**, v. 36, n. 18, p. 4827-4838, 2022.

POTIN, F.; LUBBERS, S.; HUSSON, F.; SAUREU, R. Hemp (*Canabis sativa*, L.) protein extraction conditions affect extraction yield and protein quality. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 12, p. 3682-3690, 2019.

QUIAOYUIN, C.; XINGHONG, N.; LIANG, Z.; ZHENG, T.; JIN, L.; KANG, S.; XUAN, C.; XINGHUI, L. Optimization of protein extraction and decoloration conditions for tea residues. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 4, p. 172-176, 2017.

RAHMAN, M.; LAMSAL, B.P. Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional

properties. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v.20, p. 1457-1480, 2021.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REIS, C.; NETTO, F.M. Influencia do método de extração no rendimento, perfil proteico e solubilidade de concentrados proteicos de amaranto. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n.2, p. 289-302, 2006.

TAKEITI, C.Y.; ANTONIO, G.C.; MOTTA, E.M.P.; COLLARES-QUEIROZ, F.P.; PARK, K.J. Nutritive evaluation of a non-conventional leaf vegetable (*Pereskia aculeata*, Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n.1, p. 148-160, 2009.

TORRES, T.M.S.; ÁLVARES-RIVERA, G.; MAZZUTTI, S.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J.D.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E.; FERREIRA, S.R.S. Neuroprotective potential of extracts from leaves of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*) recovered by clean compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 179, p. 01-08, 2022.

VERNÈS, L; ALBERT-VIAN, M.; EL MAËTAOUI, M.; TAO, Y.; BORNARD, I.; CHEMAT, F. Application of ultrasound for green extraction of proteins from spirulina. Mechanism, optimization, modeling, and industrial prospects. **Ultrasonic – Sonochemistry**, v. 54, p. 48-60, 2019.

WWF Brasil. **Soja**. Disponível em: https://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/reducao_de_impactos2/agricultura/agr_soja/. Acesso em: 4 jul. 2020.

YU, X.; GOUYO, T.; GRIMI, N.; BALS, O.; VOROBIEV, E. Ultrasound enhanced aqueous extraction from rapeseed green biomass for polyphenol and protein valorization. **Compters Rendus Chimie**, v. 19, p. 766-777, 2016.