UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

ELZA SALES QUEIROZ

Desenvolvimento e caracterização de suplemento alimentar proteico a partir de *Pereskia aculeata* Miller

JUIZ DE FORA
2024

ELZA SALES QUEIROZ

Desenvolvimento e caracterização de suplemento alimentar proteico a partir de *Pereskia aculeata* Miller

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Juliana de Carvalho da Costa

Coorientadora: Profa. Dra. Elita Scio Fontes

JUIZ DE FORA

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração
automática da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Queiroz, Elza.
Desenvolvimento e caracterização de suplemento alimentar proteico a partir de Pereskia aculeata Miller : Desenvolvimento e caracterização de suplemento alimentar proteico a partir de Pereskia aculeata Miller / Elza Queiroz. -- 2024.
77 p.

Orientadora: Juliana de Carvalho da Costa
Coorientador: Elita Scio Fontes
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Pereskia aculeata. 2. Proteína. 3. Extração. 4. Suplemento alimentar. I. de Carvalho da Costa , Juliana , orient. II. Scio Fontes, Elita, coorient. III. Título.

Elza Sales Queiroz

Desenvolvimento e caracterização de suplemento alimentar proteico a partir de *Pereskia aculeata* Miller

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 24 de julho de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Juliana de Carvalho da Costa – Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Elita Scio Fontes– Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Priscila de Faria Pinto
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Mariluz Latorre Moratalla
Universidade de Barcelona

Dra. Renata de Freitas Mendes
NAtiva

Juiz de Fora, 01/07/2024.

Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Carvalho da Costa**, **Professor(a)**, em 24/07/2024, às 23:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Marialuz Latorre Moratalla**, **Usuário Externo**, em 25/07/2024, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Renata de Freitas Mendes**, **Usuário Externo**, em 25/07/2024, às 12:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Elita Scio Fontes**, **Professor(a)**, em 25/07/2024, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Priscila de Faria Pinto**, **Professor(a)**, em 26/07/2024, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1844473** e o código CRC **6DF4A902**.

Dedico este trabalho a minha família com todo o meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, orientação e proteção em todos os momentos dessa jornada.

À minha família, que sempre me apoiou e incentivou. À minha mãe, Magda, por seu amor incondicional e por ser minha inspiração. Ao meu pai, Isaias, por seu exemplo de perseverança. Ao meu irmão, Lucas, pela amizade e apoio inestimáveis.

Ao meu namorado, Lucas, pelo amor, paciência e encorajamento em cada etapa desse caminho.

À minha orientadora, Profª. Dra. Juliana, pela orientação e conhecimento compartilhado ao longo deste trabalho. À minha coorientadora, Profª. Dra. Elita, pelas valiosas contribuições.

À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), por proporcionar um ambiente de crescimento e aprendizado. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste estudo.

Aos grupos QUIMTEC e LAAA pela parceria e amizade que foram fundamentais para a realização desta pesquisa.

À banca examinadora, Dra. Priscila, Dra. Mariluz e Dra. Renata, pelas valiosas contribuições e pela presença que enriqueceram este trabalho.

À minha cachorrinha fofinha, por todo o carinho e amor durante a escrita desta tese, proporcionando momentos de alegria.

A todos, meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

De acordo com o *The Good Food Institute Brasil* (GFI), o mercado de alimentos à base de plantas está aumentando mais de 7% anualmente. Neste cenário destaca-se a *Pereskia aculeata* Miller (PAM), que possui elevado teor proteico em suas folhas, sendo considerada uma excelente alternativa ao consumo de proteína animal. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar um suplemento alimentar proteico a partir de suas folhas. Para isso, avaliou-se sua composição centesimal, realizou-se técnicas extrativas a fim de promover o aumento do percentual proteico e posteriormente foi feita a caracterização das folhas de PAM *in natura*, submetidas a remoção de mucilagem e extraídas pelo método ácido-base, a fim de verificar alteração do ponto isoelétrico, morfologia, elementos químicos e nos pesos das moléculas após realização das técnicas extrativas aplicadas. Além disso, foi desenvolvido um suplemento alimentar proteico em gel e, em seguida, realizado o teste de estabilidade acelerada do tempo 0 a 90 dias. A partir dos resultados obtidos, infere-se que a PAM é rica em proteínas (17,62%), tendo sido constatado que o desengorduramento não se mostrou efetivo para o aumento do percentual proteico da amostra. Entretanto a remoção da mucilagem de PAM seguido da extração ácido-base, influenciou positivamente no aumento do percentual proteico, principalmente para EXP RM 40 ºC, que apresentou 56,53% de teor de proteína. Em relação a caracterização das amostras, o ponto isoelétrico se manteve em 1,7 após a remoção de mucilagem. Entretanto, houve alteração morfológica e elementar após o processo extrativo ácido-base. Os pesos moleculares encontrados para as amostras foram característicos da enzima rubisco. Diante do aumento de 220,83% no teor proteico de PAM, desenvolveu-se um suplemento alimentício proteico em gel, na qual a condição de geladeira apresentou-se um resultado satisfatório em relação às características organolépticas, cor e pH durante todo o estudo de estabilidade. Conclui-se que a partir da remoção de mucilagem das folhas de PAM permitiu-se desenvolver um produto alimentício nutricionalmente rico em proteína e estável ao longo dos 90 dias de estudo, impactando positivamente sua aceitação pelo consumidor e em sua viabilidade comercial.

Palavras-Chave: *Pereskia aculeata*. Proteína. Extração. Suplemento alimentar

ABSTRACT

According to *The Good Food Institute Brazil* (GFI), the plant-based food market is growing by more than 7% annually. In this scenario, *Pereskia aculeata* Miller (PAM) stands out for its high protein content in its leaves, making it an excellent alternative to animal protein consumption. Thus, this study aimed to develop and characterize a protein food supplement from PAM leaves. The proximate composition was evaluated, extractive techniques were performed to increase the protein content, and the characterization of fresh PAM leaves was conducted after mucilage removal and acid-base extraction to assess changes in isoelectric point, morphology, chemical elements, and molecular weights following the applied extractive techniques. Additionally, a protein food supplement in gel form was developed and subjected to accelerated stability testing from day 0 to 90. From the results obtained, it is inferred that PAM is rich in protein (17.62%), and it was found that defatting was not effective in increasing the protein content of the sample. However, mucilage removal from PAM followed by acid-base extraction positively influenced the increase in protein content, especially for EXP RM 40 ºC, which showed a protein content of 56.53%. Regarding sample characterization, the isoelectric point remained at 1.7 after mucilage removal. However, there were morphological and elemental changes after the acid-base extractive process. The molecular weights found for the samples were characteristic of the enzyme rubisco. With a 220,83% increase in protein content for PAM, a protein food supplement in gel form was developed, with refrigeration conditions showing satisfactory results in terms of organoleptic characteristics, color, and pH throughout the stability study. It is concluded that removing mucilage from PAM leaves allowed for the development of a nutritionally rich protein food product that remained stable over the 90-day study period, positively impacting its consumer acceptance and commercial viability.

Keywords: *Pereskia aculeata*. Protein. Extraction. Food supplement

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas da *Pereskia aculeata* Miller.....14
Figura 2 - Processo de extração para proteínas de material vegetal 18
Figura 3 - Etapas da técnica de Kjeldahl 21
Figura 4 - Ilustração de uma partícula carregada na interface sólido-líquido e os potenciais relacionados à dupla camada elétrica 22
Figura 5 - Curva do potencial zeta versus o pH.....23
Figura 6 - Microscópio eletrônico de varredura acoplado a espectroscopia de energia dispersiva de raios X 24
Figura 7 - Perfil SDS-PAGE de proteínas de *Pereskia aculeata* Miller. 26
Figura 8 - Fluxograma dos processos e análises realizadas 41
Figura 9 - Potencial zeta médio em função do pH do extrato bruto de *Pereskia aculeata* Miller e da amostra com remoção da mucilagem 40 °C 49
Figura 10 - Eletroforese em gel SDS-Poliacrilamida de diferentes extratos proteicos de *Pereskia aculeata* Miller 50
Figura 11 - Caracterização morfológica (MEV) das amostras de PAM, RM 25 ºC, EXP RM 25 ºC, RM 40ºC e EXP RM 40 ºC.....53
Figura 12- Resultados de colorimetria do estudo estabilidade acelerada. 58
Figura 13 - Amostras do gel alimentício nos tempos 0 e 90 dias mantidas em condições de armazenamento diferentes.....60
Figura 14 - Valores dos pHs obtidos durante o estudo de estabilidade acelerada para o suplemento proteico em gel 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de remoção da mucilagem de *Pereskia aculeta* Miller 34
Tabela 2 - Condições de extração ácido-base da proteína nas folhas de *Pereskia aculeata* Miller em pó 36
Tabela 3 - Composição das formulações (F) testadas de gel e suas funções, valores dados em %. 39
Tabela 4 - Análise composicional das folhas da *Pereskia aculeata* Miller (n = 3).....43
Tabela 5 - Rendimento e teor de proteína presente na *Pereskia aculeta* Miller após a remoção da mucilagem em diferentes condições de pH e temperatura.....46
Tabela 6 - Condições de extração, rendimentos e teores de proteínas das folhas de *Pereskia aculeata* Miller desengordurada em pó 47
Tabela 7 - Rendimento proteico e teor de proteína após a extração ácido-base da *Pereskia aculeata* Miller com remoção de mucilagem. 48
Tabela 8 - Porcentagem dos minerais presentes nas amostras em pó de *Pereskia aculeata* Miller 55
Tabela 9 - Avaliação das características organolépticas e pH do gel 57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
2 REFERENCIAL TEÓRICO 13
2.3 PROTEÍNAS VEGETAIS 13
2.4 *PERESKIA ACULEATA* MILLER 14
2.5 MÉTODOS EXTRATIVOS 16
2.5.1Extração ácido-base de proteínas 18
2.6 TÉCNICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS 19
2.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS EM ALIMENTOS 21
2.7.1 Potencial zeta 21
2.7.2 Microscópio eletrônico de varredura e espectroscopia de energia dispersiva 23
2.7.3 Eletroforese em gel 26
2.8 PRODUTOS ALIMENTÍCIOS CONTENDO PAM 28
3 OBJETIVOS 30
3.1 OBJETIVO GERAL 30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 30
4 MATERIAL E MÉTODOS 31
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO 31
4.2 SECAGEM E MOAGEM DO MATERIAL 31
4.3 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL 31
4.3.1 Umidade por termogravimetria 31
4.3.2 Cinzas 32
4.3.3 Lipídeos pelo método de Goldfish 32
4.3.4 Determinação de proteína pelo método de Kjeldahl 33
4.4 TÉCNICAS EXTRATIVAS PARA AUMENTO DO TEOR DE PROTEÍNAS NAS FOLHAS DE *PERESKIA ACULEATA* MILLER (PAM) 34
4.4.1 Desengorduramento 34
4.4.2 Remoção da mucilagem 34
4.4.3 Extração ácido-base 35
4.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DAS FOLHAS DE *PERESKIA ACULEATA* MILLER (PAM) E DO EXTRATO PROTEICO 37
4.5.1 Determinação do Potencial Zeta para PAM e RM 40 ºC 37

4.5.2 Eletroforese em gel 37
4.5.3 Microscópio eletrônico de varredura e espectroscopia de energia dispersa de raios-x 38
4.6 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO 38
4.6.1 Estudo de estabilidade acelerada 40
4.7 FLUXOGRAMA 41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 42
5.1 RENDIMENTO DA COLETA 42
5.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS FOLHAS *PERESKIA ACULEATA* MILLER 42
5.3 TÉCNICAS EXTRATIVAS PARA AUMENTO DO TEOR DE PROTEÍNAS NAS FOLHAS DE *PERESKIA ACULEATA* MILLER (PAM) 44
5.3.1 Desengorduramento 44
5.3.2 Remoção de mucilagem 45
5.3.3 Extração ácido-base e análise de proteínas das extrações 46
5.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DAS FOLHAS DE *PERESKIA ACULEATA* MILLER (PAM) E DO EXTRATO PROTEICO 48
5.4.1 Determinação do Potencial Zeta para PAM e RM 40 °C 48
5.4.2 Eletroforese em gel 49
5.4.3 Análise de MEV e EDS nas amostras de *Pereskia aculeata* Miller 52
5.5 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO 56
5.5.1 Estudo de estabilidade acelerada 57
6 CONCLUSÃO 64
REFERÊNCIAS 65

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que apresenta a maior biodiversidade do mundo, com cerca de 20% de flora, favorecendo o desenvolvimento de pesquisas utilizando produtos naturais (DA ROCHA *et al.*, 2021). Nos últimos anos, o mercado de alimentos à base de plantas tem mostrado um crescimento significativo. Segundo o *The Good Food Institute* Brasil (GFI), o setor vem aumentando em mais de 7% anualmente, com projeções indicando uma expansão média anual de aproximadamente 12% até 2027, de acordo com estimativas da *Meticulous Market Research* (FOOD CONNECTION, 2023).

Desta forma, há uma crescente demanda por proteínas de origem vegetal e a tendência é que esse número cresça a cada ano para atender não apenas aos consumidores vegetarianos ou veganos, mas também aos que desejam complementar a dieta com proteínas, reduzindo o consumo de carne (MACIEL NETO *et al.*, 2020). Assim, fórmulas à base de plantas vêm ganhando cada vez mais espaço na alimentação dos consumidores, especialmente para os que as consideram nutritivas e mais naturais (PICCINI *et al.*, 2021).

Dentre as plantas medicinais do Brasil, *Pereskia aculeata* Miller (PAM), da família Cactaceae, é amplamente distribuída na Mata Atlântica e tem sido estudada pelo seu alto valor nutricional. É popularmente conhecida como ora-pro-nobis e é consumida em diversas regiões do Brasil, fazendo parte do grupo de plantas alimentícias não convencionais (PANC) (DE FREITAS *et al.* 2021).

O Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição incluiu a PAM entre os ingredientes das misturas de macronutrientes comumente consumidas e distribuídas pela agência do Ministério da Saúde para ajudar a combater a fome entre os países mais pobres (FARFAN, 1998). O valor nutricional de PAM está relacionado, principalmente, ao seu elevado teor de proteína nas folhas. Em regiões mais carentes, é considerada a principal fonte de proteína, sendo chamada de “carne de pobre” (PEREIRA *et al.*, 2007).

Vários estudos confirmam o alto teor de proteína nas folhas, sendo lisina e triptofano os aminoácidos mais abundantes. Pesquisas científicas mostram também níveis significativos de fibra alimentar e minerais, como ferro, manganês, magnésio, cálcio e zinco; vitaminas A, C e B9 e baixos níveis de gordura e calorias (GIRÃO *et*

al., 2003; ROCHA *et al*., 2009; TAKEITI *et al*., 2009). A PAM também é fonte de carotenoides, especialmente luteína, com concentrações mais altas do que em outros vegetais comumente consumidos, sendo a luteína descrita na literatura como capaz de prevenir doenças oculares e degeneração macular relacionada à idade (CARVALHO, 2023).

A literatura científica descreve muito bem as características e propriedades bioativas (ex: antioxidante e anti-inflamatório) e nutricionais (ex: fonte de proteínas e aminoácidos) de PAM (GARCIA *et al*., 2019; NOGUEIRA SILVA *et al*., 2023; TORRES *et al*., 2022). Também cabe ressaltar que a suplementação alimentar está sendo muito utilizada pela população mundial, seja pela busca de uma alimentação mais saudável e/ou pela necessidade de um produto prático e acessível (PICCINI *et al*., 2021).

Assim, o presente estudo teve como objetivo a caracterização das propriedades físico-químicas das folhas de PAM e PAM desengordurada (PAMD), bem como a determinação do teor de proteínas por meio de métodos extrativos. Além disso, a partir do concentrado proteico de PAM, foi desenvolvido um suplemento alimentar proteico acessível e com alto valor nutricional.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.3 PROTEÍNAS VEGETAIS

Alimentos de origem animal são boas fontes de proteínas. Entretanto, o consumo dessas proteínas animais impacta significativamente o meio ambiente, estando diretamente associado às mudanças climáticas, ao aumento das emissões de gases de efeito estufa e ao esgotamento de recursos naturais (LAMSAL *et al*., 2019).

Com a previsão de que a população mundial chegue a 10 bilhões até 2050 e o consumo de laticínios e carne aumente em 58% e 73%, respectivamente, torna-se essencial considerar a produção e o consumo sustentáveis de proteínas (FASOLIN *et al*., 2019). Além disso, o consumo prolongado de carne vermelha pode aumentar o risco de doenças crônicas (AHNEN; JONNALAGADDA; SLAVIN, 2019; HERTZLER *et al*., 2020).

Desta forma, a crescente preocupação com o meio ambiente e as mais recentes discussões sobre o impacto de uma dieta nutritiva, tornaram o uso de proteínas derivadas de plantas, como ervilha, soja, milho e outros vegetais, uma alternativa que vem sendo muito aplicada pela indústria de alimentos (HERREMAN *et al.*, 2020).

Para que as proteínas vegetais substituam eficientemente as de origem animal, essas devem dispor de aminoácidos essenciais (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) em quantidade suficiente para suprir às necessidades diárias, visto que não são sintetizados pelo organismo (HERREMAN *et al.*, 2020). Assim como os aminoácidos essenciais, os aminoácidos não essenciais (arginina, alanina, cisteína, glutamina, tirosina, entre outros) funcionam como substratos para síntese de proteínas, fundamentais para formação estrutural e funcional, tornando-os primordiais ao ser humano para uma dieta completa (HOU; YIN; WU, 2015).

Os vegetais são constituídos por proteínas globulares, como albuminas, globulinas, prolaminas e gluteínas. A presença dessas substâncias varia de acordo com o vegetal, estando presentes em maior ou menor quantidade dependendo da hortaliça, cereal, leguminosa, entre outros. O tipo de proteína presente confere

solubilidade e funcionalidades diferentes, como as albuminas que têm capacidade de agir como emulsificante (SIM *et al.*, 2021).

2.4 *PERESKIA ACULEATA* MILLER

O aumento populacional ao longo dos anos, aliado ao interesse do consumo de produtos com maior valor nutricional, tornou alimentos ricos em proteínas cada vez mais procurados pelos consumidores (JIN; OHANENYE; UDENIGWE, 2022). Todavia, os alimentos proteicos obtidos de animais têm sido relacionados ao seu alto impacto ambiental, devido ao significativo gasto de água e emissão de gases. Dessa forma, a obtenção de proteínas a partir de plantas se tornou uma alternativa de demanda global, principalmente em países subdesenvolvidos na qual a desnutrição ainda é um problema latente (ASCHEMANN-WITZEL *et al.*, 2021).

É nesse cenário que a PAM, ganha ênfase (Figura 1). A planta é uma angiosperma cujo formato é de arbusto, a qual é encontrada no Brasil nas regiões do nordeste, centro-oeste, sudeste e sul (SOUZA *et al*., 2016). Desta forma, além de ser utilizada na alimentação humana, as folhas de PAM são empregadas na medicina popular como emolientes sendo utilizada em lesões de pele e na cicatrização de feridas em processos inflamatórios, pois tem funções antifúngicas e antibacterianas (CARVALHO *et al.*, 2014).

Figura 1 - Folhas da *Pereskia aculeata* Miller

Fonte: Autor (2024).

A presença de substâncias bioativas como β-carotenoides e flavonoides nos frutos e em outras partes da planta já foram avaliadas quanto às suas propriedades antioxidantes, associadas à redução de doenças crônico-degenerativas (Ex: câncer e doenças cardiovasculares), além de serem anti-inflamatórias (SILVA *et al.*, 2018).

Com relação aos aminoácidos essenciais presentes na PAM, estudos indicam que em 100 g de folhas, o triptofano foi o aminoácido mais encontrado, com 5,52 g (20,46%), seguido de leucina com 2 g (7,40%) e lisina 1,43 g (5,29%). Dentre os aminoácidos não essenciais, foi possível identificar majoritariamente o ácido glutâmico com 2,67 g (9,90%) e ácido aspártico 1,71 g (6,32%) (GIRÃO *et al*., 2003).

Dentre os macronutrientes presentes nas folhas de PAM cerca de 25% são de proteínas, bem maior do que a comumente encontrada nos alimentos, como couve (1,6% m/m), alface (1,3% m/m), milho (7,6-10% m/m) e feijão (18-20% m/m) (MILIÃO *et al.*, 2022). Além do conteúdo proteico, em 100 g de planta foram encontrados 3,5 g de cálcio, 1,9 g de magnésio, 1,63 g de potássio, 156 mg de fósforo, 14,2 mg de ferro e 26,2 mg de zinco (TAKEITI *et al.*, 2009).

A proteína predominante na PAM é a rubisco, que é considerada a mais abundante da biosfera e a principal enzima do processo de fotossíntese. Ela participa da etapa inicial do ciclo de Calvin promovendo a ligação do CO_2 à ribulose bifosfato, produzindo dois compostos, cada um com 3 moléculas de carbono (ácido fosfoglicérico). O conjunto de reações posteriores reduzem o CO_2 e reciclam a molécula aceptora. Na execução deste ciclo são utilizadas 6 moléculas de CO_2 para produção de uma molécula de frutose-6-fosfato (ALMEITA *et al*, 2022; LIU *et al*, 2021).

Além disso, a rubisco apresenta aminoácidos essenciais, sendo a lisina o majoritário que desempenha um papel fundamental na estabilização da sua estrutura tridimensional e na interação com os substratos durante a catálise da reação de fixação do carbono (O'LEARY *et al.*, 2020). Outros aminoácidos essenciais presentes na composição da rubisco são metionina, treonina, isoleucina, valina, fenilalanina e a leucina. Sendo estes indispensáveis para o funcionamento da enzima, garantindo sua eficiência na conversão do dióxido de carbono em compostos orgânicos durante a fotossíntese, e destacando assim sua importância tanto para as plantas quanto para os organismos que delas dependem para nutrição e sustento (Mackinder *et al.*, 2016).

Também em relação às proteínas, outro fator a ser observado quando se trata da sua capacidade nutritiva é a sua digestibilidade. A baixa digestão proteica gera uma baixa absorção dessas substâncias, fazendo com que o aspecto nutritivo do

alimento seja perdido (POMPEU *et al.*, 2014). Sendo assim, diversos estudos apontam valores de até 85% de digestão das proteínas presentes na PAM, apresentando uma boa digestibilidade (SARTOR & MAZIA, 2012; ROCHA *et al*., 2009; ZEM *et al.*, 2017). Isso indica que grande parte das proteínas ingeridas dessa planta sofrem hidrólise por enzimas no organismo e são, consequentemente, absorvidas em forma de aminoácidos. Portanto, pequena parte do conteúdo ingerido é excretado, obtendo-se o maior proveito possível do alimento (MENDES *et al*., 2007).

A presença de substâncias como ferro, cálcio, ácido ascórbico, ácido fólico, vitaminas A e C na PAM aumentam ainda mais sua capacidade nutritiva. O alto teor proteico e a riqueza em minerais e fibras fazem com que essa planta seja considerada um importante PANC, sendo utilizada para suprir a deficiência de diversas substâncias na dieta. A existência de minerais como ferro torna *a* PAM uma possível alternativa dietética para o tratamento de anemia ferropriva (GARCIA *et al.*, 2019).

De acordo com Egea e Pierce (2021), as folhas de PAM apresentam em cada 100 g em base seca, 43,7 g de carboidratos, 23,8 g de proteína, 4 g de lipídeo, 30 g de fibra dietética total, que são fatores que influenciam diretamente no valor nutricional da planta.

Dado o alto teor de mucilagem não tóxica, também é possível citar a espécie como uma alternativa para obtenção de hidrocoloides com diferentes funções. Esses polímeros complexos de carboidrato possuem alta capacidade de absorção de água, sendo utilizados como emulsificantes e estabilizantes na indústria de alimentos (SILVA *et al.*, 2019).

Características como a facilidade de plantio e cultivo, aliados à possibilidade de incorporação dessa planta em diferentes receitas, fazem com que a PAM seja uma alternativa na dieta de populações mais carentes. Dessa forma, a extração de proteína presente nas folhas permite alcançar um alto potencial alimentício, bem como uma diversidade de aplicações junto às indústrias de medicamentos e alimentos (LATORRACA *et al.*, 2021).

2.5 MÉTODOS EXTRATIVOS

A extração de compostos naturais é de suma importância na obtenção de insumos que englobam diferentes necessidades, seja na área de alimentos, medicamentos ou cosméticos. Esse processo é realizado a partir de diferentes

métodos, os quais são utilizados de acordo com o tipo do produto natural utilizado, substância de interesse e aplicação, além das particularidades que envolvam a matéria prima utilizada (SWAMI, 2008).

Dentre os métodos extrativos convencionais podem ser citados: extrações sólido-líquido, como a percolação, em que o solvente (líquido) passa pelo material vegetal (sólido) continuamente, até o seu esgotamento, extraindo os compostos de interesse. Há também a extração líquido-líquido, em que ocorre a separação de uma mistura em dois líquidos imiscíveis, adquirindo-se duas fases e permitindo a separação de substâncias. A infusão, muito empregada no preparo de chás, que consiste na imersão do material vegetal em água quente, além da maceração, baseada no contato entre o líquido extrator e a matéria (ABDELMOHSEN; SAYED; ELMAIDOMY, 2022).

Outro processo frequentemente utilizado para a PAM é a extração de mucilagem, um biopolímero com ampla aplicabilidade industrial, capaz de desempenhar funções como modificação de textura, espessamento, formação de gel e estabilização (CONCEIÇÃO, 2013). Diversos métodos são descritos na literatura para a remoção da mucilagem de material vegetal, incluindo técnicas que empregam água e solventes, temperatura, além de processos mecânicos e enzimáticos (LIMA JUNIOR *et al.*, 2013; LIRA, *et al*., 2023; SANTOS, 2023).

Entretanto, técnicas mais avançadas têm sido empregadas, como a extração por fluido supercrítico, que consiste na manutenção da temperatura e pressão de um gás para que ele se encontre no seu estado supercrítico, agindo como um bom solvente extrator (MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996). A extração assistida por ultrassom, na qual se utiliza ondas ultrassônicas em determinadas frequências (20-1000 kHz) permitindo o processo de cavitação, que facilita a penetração do solvente na matéria (PANDA; MANICKAM, 2019). Ambos apresentam resultados muito satisfatórios representando maior eficiência e rapidez. Todavia, possuem um custo elevado, dificultando sua utilização em larga escala (BUCAR; WUBE; SCHMID, 2013; MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996).

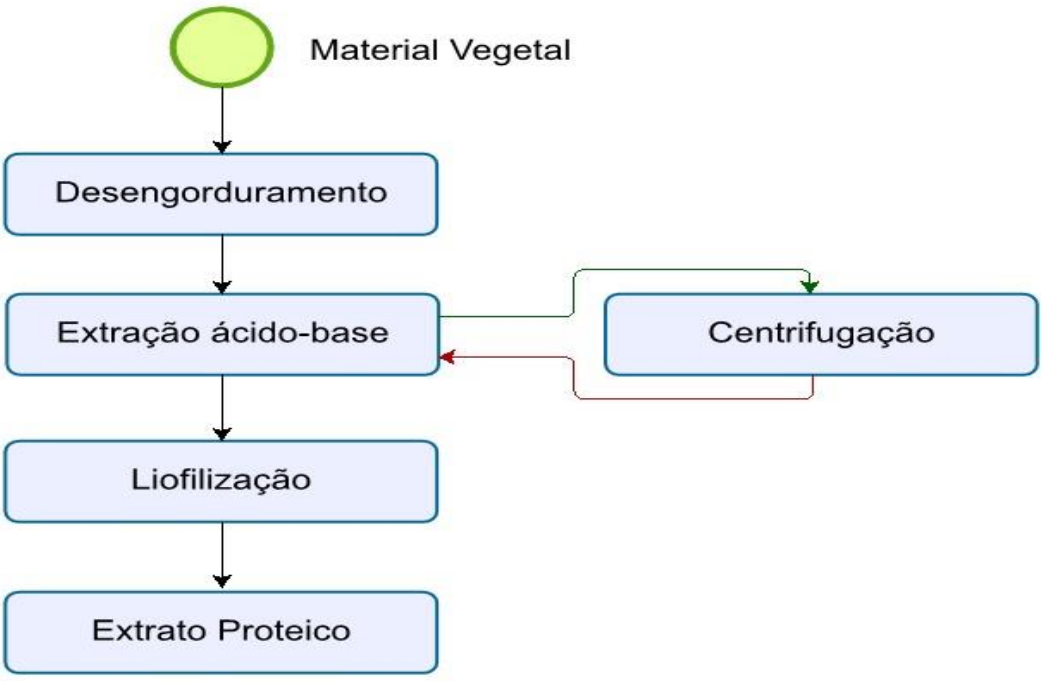
Também é amplamente descrito a extração ácido-base por ser simples e eficiente, sendo utilizada em fontes naturais para obtenção de proteínas (QUEIROZ *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*,2022).

2.5.1 Extração ácido-base de proteínas

O método consiste na alcalinização do meio no qual o material vegetal está presente, utilizando uma base forte como o hidróxido de sódio para que as proteínas se solubilizem. Após solubilização, a solução é levada para centrífuga para que os compostos precipitados (não solúveis) sejam depositados, obtendo-se então o sobrenadante na qual as proteínas solúveis estarão presentes. Posteriormente, o sobrenadante sofre o processo de acidificação até o pH referente ao ponto isoelétrico da proteína de interesse (na qual o potencial Zeta será nulo), levando a diminuição das forças de repulsão e a agregação de partículas fazendo com que a solubilidade dessas proteínas diminua e se precipitem. A solução acidificada é novamente centrifugada, de modo que as proteínas de interesse, agora precipitadas, possam ser extraídas (Figura 2) (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010).

É importante ressaltar que o ponto isoelétrico varia de proteína para proteína, sendo fundamental a definição desse para as proteínas que se pretendam extrair, permitindo melhor precipitação, promovendo a maior eficiência possível na extração (NOVÁK; HAVLÍČEK, 2016).

Figura 2 - Processo de extração para proteínas de material vegetal



Fonte: Autor (2024).

Para a obtenção de extratos proteicos é necessário considerar os diferentes comportamentos das proteínas frente às mudanças de pH. Independente de se apresentar como um método relativamente simples, a revisão e adequação dos processos desde a moagem são de extrema importância, pois afetam diretamente no rendimento final (FONSECA, 2019).

Estudos indicam que fatores como a concentração alcalina e temperatura também afetam o rendimento de proteínas obtidas. Extrações realizadas em altas temperaturas podem levar a desnaturação de proteínas e, consequentemente, diminuir a efetividade e qualidade do processo. Altas concentrações alcalinas também podem influenciar no rendimento, reduzindo a recuperação na subsequente fase em que se leva o extrato ao ponto isoelétrico (ZHANG; SANDERS; BRUINS, 2014).

Dessa forma, a extração por alcalinização seguida de precipitação isoelétrica apresenta vantagens como um processo de fácil execução e baixo custo, sendo que a busca pelo melhor rendimento faz com que a otimização de etapas seja de extrema relevância. Após a extração, é de suma importância quantificar as proteínas presentes na amostra para avaliar a eficiência do processo extrativo empregado (CRUZ-SOLIS *et al.*, 2023).

2.6 TÉCNICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Na indústria alimentícia, a quantificação de proteínas assume um papel importantíssimo na qualidade e valor nutricional que um produto pode oferecer, já que essas substâncias apresentam funções abundantes no organismo, desde a formação de diversas estruturas, até o controle da atividade de numerosas enzimas existentes (HAYES, 2020). Além disso, é um meio essencial para processos posteriores como de rotulagem e identificação do produto, tendo influência na garantia de qualidade e segurança do alimento (SÁEZ-PLAZA et al., 2013).

Diversos métodos foram desenvolvidos para que essa quantificação possa ser realizada de forma confiável e padronizada, como aqueles que se baseiam nas quantificações de nitrogênio, como Kjeldahl e Dumas (ZAGURI *et al.*, 2021).

O método de Kjeldahl pode ser citado como um dos principais, sendo utilizado em larga escala na indústria. Essa técnica, desenvolvida pelo dinamarquês Johan Kjeldahl, utiliza a determinação de nitrogênio presente na amostra analisada por meio da conversão do nitrogênio em amônia para posterior quantificação proteica. Para ser

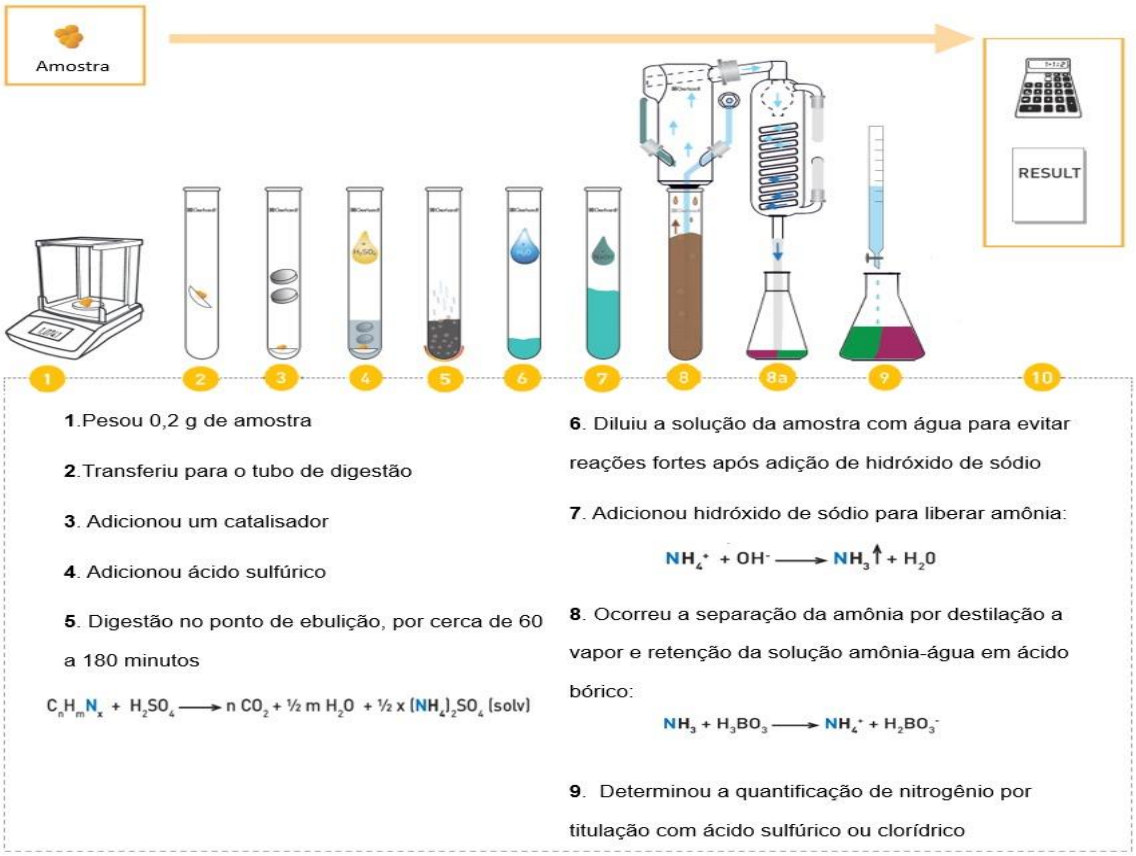
realizado, a amostra é submetida a etapas como digestão, destilação e posterior quantificação por titulação (MUÑOZ-HUERTA *et al*., 2013).

O primeiro passo para realização do teste é o processo de digestão, que consiste na retenção do nitrogênio em forma de sulfato de amônio através da reação da amostra utilizando uma mistura de ácido sulfúrico e um catalisador. Nesse processo, o aumento da temperatura é imprescindível para que a matéria orgânica possa ser devidamente eliminada, permitindo que a substância alvo, o nitrogênio, fique retido. Todavia, para isso possa acontecer, torna-se necessário o emprego de substâncias como sulfato de sódio, que aumentam o ponto de ebulição do ácido sulfúrico, permitindo que o sistema alcance temperaturas mais altas (SILVA *et al*., 2016).

Após a digestão, o sulfato de amônio presente, resultante da conversão do nitrogênio na amostra é então levado ao pH alcalino, usando uma base como hidróxido de sódio para liberação da amônia, passando pelo processo de destilação. Assim, a amônia é separada na destilação a vapor e entra em contato com ácido bórico em excesso. A solução é então titulada com ácido clorídrico e utilizando o fator de conversão para proteínas, faz-se a quantificação de proteína bruta (SAHA; SONON; KISSEL, 2012). Em sua maioria, o fator de conversão empregado é de 6,25, variando conforme a amostra utilizada, considerando que todo nitrogênio presente na amostra se apresenta ligado a proteína (MÆHRE *et al*., 2018). Na Figura 3, é possível observar as etapas que envolvem a técnica de Kjeldahl de forma mais detalhada.

Deste modo, a técnica de Kjeldahl apresenta até hoje ampla utilização ao redor do mundo, sendo usada dessa forma como padrão para quantificação de proteínas. Apesar de novos métodos desenvolvidos, o baixo custo aliado à alta reprodutibilidade e precisão, fazem com que essa técnica siga sendo uma escolha prioritária na análise (SÁEZ-PLAZA et al., 2013).

Figura 3 - Etapas da técnica de Kjeldahl



Fonte: Adaptado de *Gerhardt Analytical Methods* ([s.d.]).

2.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS EM ALIMENTOS

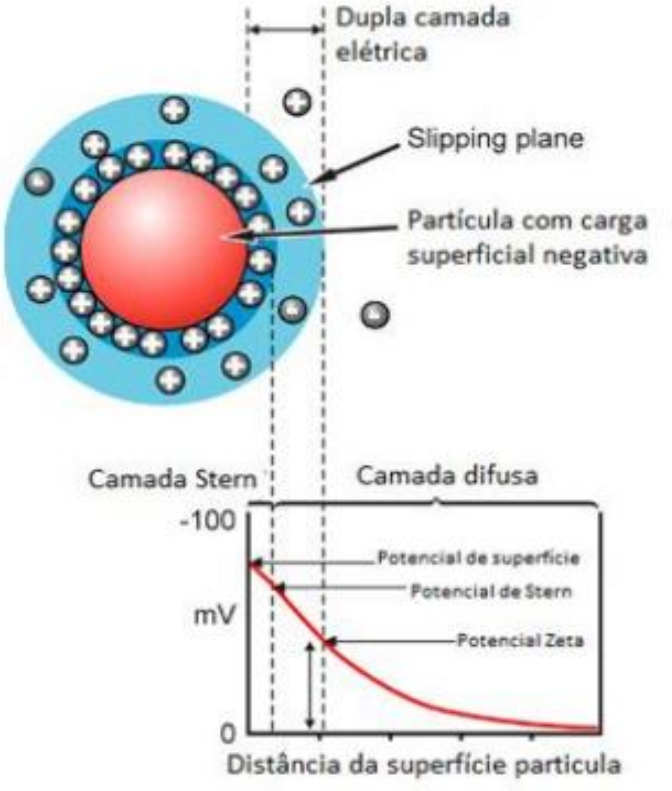
2.7.1 Potencial zeta

O potencial zeta (PZ) é utilizado para definir as interações presentes nas partículas do sistema, influenciando diretamente nos processos de floculação ou não floculação de uma suspensão (LUXBACHER, 2014).

Em uma suspensão, a presença de cargas nas partículas suspensas acarreta a atração de cargas opostas para a superfície. A Figura 4 ilustra uma partícula com carga negativa atrai cátions presentes na solução. As cargas positivas do líquido que se encontram próximas da superfície da partícula ligam-se fortemente, e essa região é denominada de camada *Stern*. Porém, as cargas que se encontram mais distantes possuem interações mais brandas com a superfície, resultando na camada difusa (SILVA, 2015).

No interior da camada difusa existe um limite teórico na qual as partículas e os íons formam um sistema estável. Quando uma partícula se desloca (proveniente da gravidade), os íons presentes no interior da camada se movem, entretanto qualquer íon que se encontra além da camada difusa, não irá se movimentar com a partícula. Essa fronteira é denominada de *slipping plane* ou superfície de cisalhamento hidrodinâmico, o potencial encontrado é definido como PZ (MALVERN, 2012).

Figura 4 - Ilustração de uma partícula carregada na interface sólido-líquido e os potenciais relacionados à dupla camada elétrica



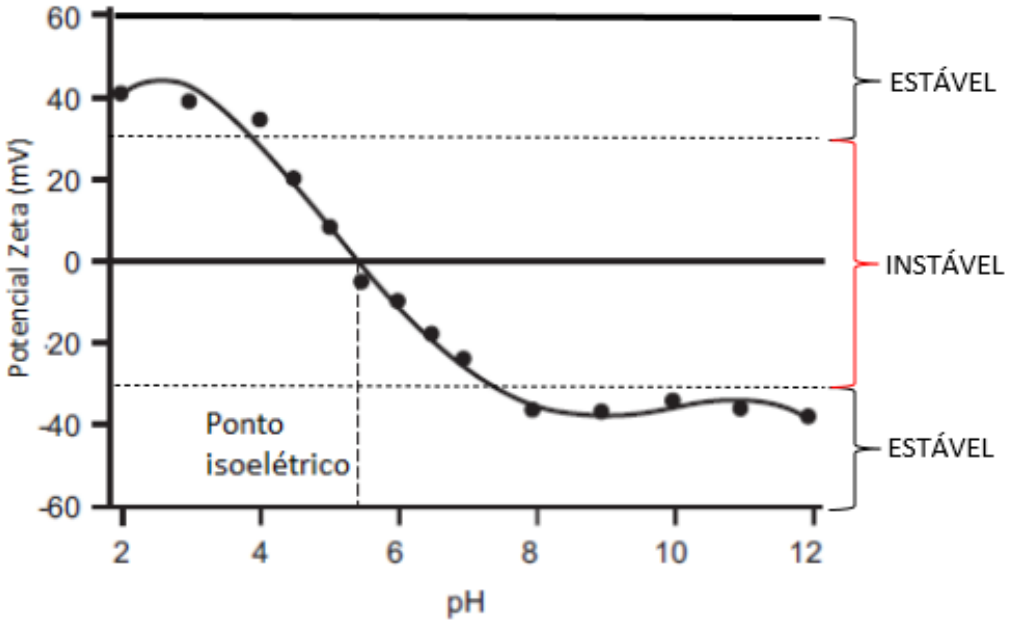
Fonte: Zetasizer Nano User Manual (2013).

Em um sistema coloidal, as partículas podem se unir culminando em agregados que poderão sedimentar devido a gravidade. Este fenômeno denomina-se floculação e pode ser irreversível ou reversível. Quando os agregados são maiores, o processo é denominado de coagulação e é irreversível. Se as partículas em suspensão possuem um elevado valor de PZ, seja ele negativo ou positivo, elas tenderão a se repelir, ou seja, não tenderão a flocular. Porém, se apresentarem valores baixos de PZ, não possuirá força que evite a agregação das partículas e, desta

forma, elas tendem a flocular. Partículas cujo PZ é superior a +30 mV ou inferior a -30 mV, são classificados como estáveis (LUXBACHER, 2014).

O pH é um dos principais fatores que influenciam o PZ. A partículas que se encontram em suspensão e apresentam um PZ negativo, se for adicionada mais base nessa suspensão, elas tenderão a adquirir mais cargas negativas. Entretanto, se for adicionado ácido a esse meio, as partículas poderão adquirir cargas positivas até a neutralização. Desta forma, a curva de pH versus PZ será negativa para valores de pH elevados e positivo para valores de pH mais baixos, como ilustrado na Figura 5 (DELAVI, 2011).

Figura 5 - Curva do potencial zeta versus o pH



Fonte: Adaptado de Malvern (2012).

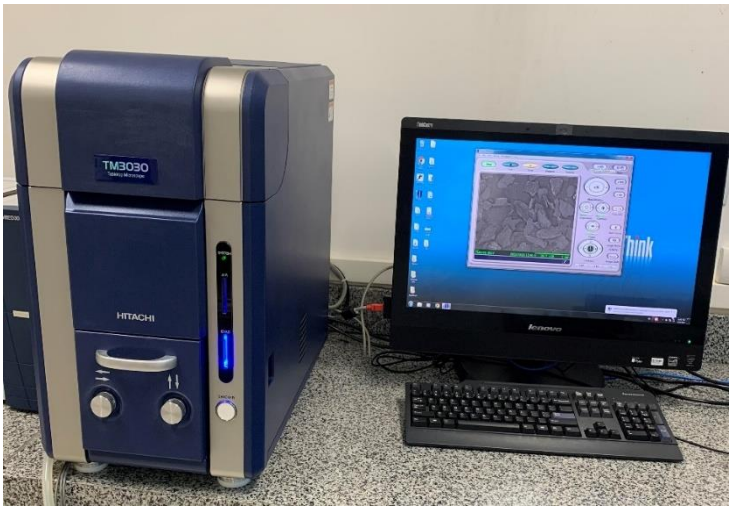
2.7.2 Microscópio eletrônico de varredura e espectroscopia de energia dispersiva

O estudo da microestrutura em alimentos de origem animal e vegetal pode contribuir para o entendimento tanto das propriedades nutricionais do produto quando os efeitos de processos industriais (XIAO; GAO, 2012).

É nesse contexto que o uso do microscópio eletrônico de varredura (MEV) passou a ser amplamente utilizado no campo da tecnologia de alimentos para estudar os efeitos pré e pós-tratamentos tecnológicos, como redução de tamanho, secagem (secagem com ar quente, secagem por pulverização, micro-ondas, secagem osmótica, liofilização), congelamento, alta pressão hidrostática, campos elétricos pulsados e ultrassom, na microestrutura e na morfologia tridimensional da superfície de uma variedade de alimentos. A análise estrutural dos alimentos inclui seu valor nutricional e reologia, bem como atributos de textura. Além disso, seu uso conciliado à espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) permite analisar os elementos que o compõem e identificar impurezas presentes na amostra (SHARMA; BHARDWAJ, 2019).

O EDS também é uma técnica de microanálise, quando acoplada ao MEV possibilita uma ampla análise da amostra (Figura 6). Isso porque enquanto o MEV proporciona a obtenção de imagens tridimensionais de alta resolução acerca da morfologia, o EDS obtém dados qualitativos e semiquantitativos sobre a estimativa dos elementos químicos presentes na amostra (FERRER-ERES *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2021).

Figura 6 - Microscópio eletrônico de varredura acoplado a espectroscopia de energia dispersiva de raios X



Fonte: Autor (2024).

O MEV é um equipamento versátil e de ampla utilização podendo ser utilizado para análises de tecidos animais e vegetais, bem como de matérias inorgânicas. Essa

técnica é capaz de reproduzir com grande exatidão a morfologia de um material sólido baseando na interação dos elétrons com a amostra (COSTA, 2016; MONTEIRO, 2017).

O equipamento se destaca devido a sua alta resolução, sendo capaz de atingir medidas de partículas de até 1 nm. Todavia, alguns critérios influenciam na resolução da imagem do MEV, como a tensão de aceleração dos elétrons e o aumento da corrente de onda, pois resultam em um menor comprimento de onda e maior diâmetro do feixe. A distância de trabalho, sendo o percurso entre a amostra e a lente objetiva também influencia na resolução, visto que com a sua aproximação, mais eficiente a resolução da imagem (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; TELES; ANDREANI; VALADARES, 2017).

Com o intuito de alcançar ótimas imagens e, consequentemente, bons resultados, é fundamental que o material que se deseja analisar seja preparado adequadamente e com qualidade. Assim, ele deve estar completamente seco e ser condutor de eletricidade. Normalmente, o porta-amostra (*stub*) é metálico (condução de corrente) e apresenta um formato compatível com o MEV. Desta forma, para anexar o material sobre o *stub* é utilizado um material condutor, por exemplo, uma fita de carbono (TELES; ANDREANI; VALADARES, 2017).

O EDS é uma técnica que utiliza a geração de raios X para obter informações elementares da amostra. Isso ocorre através de um feixe de elétron, que ao incidir sob a amostra, ioniza os átomos presentes. Com o retorno aos seus estados fundamentais, há liberação de energia, consequentemente emitindo raios X característicos de cada átomo. Através de um detector sensível a fótons, é possível então medir os diferentes comprimentos de onda desses raios, possibilitando assim, identificar os elementos (SCIMECA *et al*., 2018).

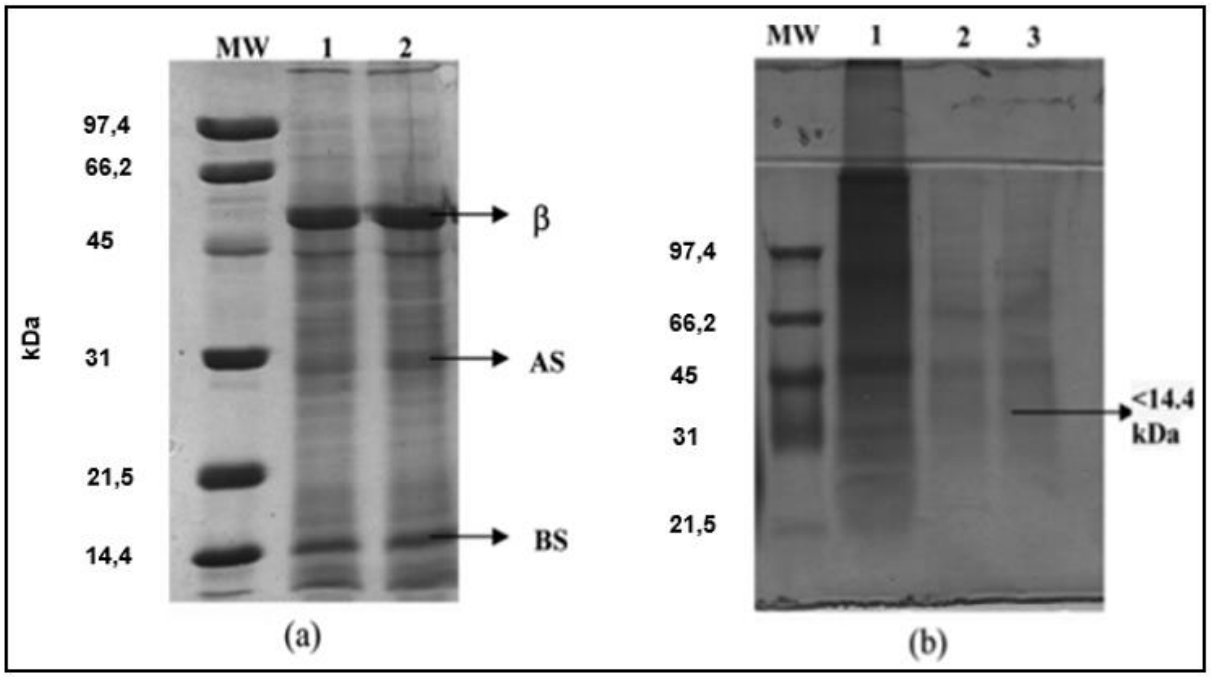
Um exemplo de aplicabilidade do MEV acoplado ao EDS pode ser observado no estudo de Lise-Marques *et al.* (2020), sobre a substituição de gordura na mortadela pela mucilagem da PAM. O uso desse equipamento foi essencial para análise da substância química e morfológica tanto da mortadela comum como das que possuíam PAM em sua fórmula, definindo as melhores concentrações de mucilagem da planta que apresentavam os resultados mais satisfatórios (LISE *et al.*, 2021).

2.7.3 Eletroforese em gel

Desde sua primeira aplicação em 1981, a eletroforese em gel tem ganhado cada vez mais espaço, sendo usada na indústria farmacêutica na análise de medicamentos e na aplicação clínica, visando a análise de proteínas. O método também passou a ser amplamente utilizado na indústria alimentícia, possibilitando a caracterização do conteúdo proteico de alimentos (RAMOS-PAYÁN *et al.*, 2018).

A eletroforese é um método analítico que consiste na separação de moléculas ou partículas baseadas no seu tamanho e carga, em um campo magnético. A aplicação de uma carga negativa no meio faz com que partículas mais negativamente carregadas se movam em direção a carga mais positiva, ocorrendo então a separação desejada. Após essa etapa, o resultado é observado por meio de uma imagem, permitindo a visualização em bandas, como observado na análise das folhas de PAM na Figura 7 (SYAIFUDIN, 2021).

Figura 7 - Perfil SDS-PAGE de proteínas de *Pereskia aculeata* Miller.



Legenda: Proteínas de *Pereskia aculeata* Miller em *in natura* (a) e após digestibilidade proteica *in vitro* (b).

Fonte: (TAKEITI *et al*., 2009).

Para que esse processo ocorra, é necessário haver um meio como um sistema coloidal, no qual o material para análise é disperso. Com esse objetivo, o uso da agarose, um polissacarídeo, e o gel de poliacrilamida foi desenvolvido ao longo do tempo (KALININA; PIKALOVA, 2019).

A eletroforese em gel de dodecil-sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-Page) é uma técnica de eletroforese vastamente empregada, por apresentar alta resolução na análise de complexos de proteínas. Primeiramente, um detergente aniônico (SDS) é adicionado às proteínas, fazendo com que todas adquiram carga negativa proporcional ao seu peso molecular, medidos em kilodaltons (kDa). Após esse procedimento, essas proteínas são submetidas a eletroforese em um gel de poliacrilamida, sob constante tensão (100 V a 200 V) na qual ocorrerá a observação da corrida (NOWAKOWSKI; WOBIG; PETERING, 2014).

Se por um lado adição do SDS forma complexos com as proteínas ocasionando a proporcionalidade entre massa/carga, a adição do grupo tiol, usualmente 2-mercaptoetanol, funciona como agente redutor, quebrando as pontes dissulfeto e permitindo a completa dissociação e desnaturação das proteínas. Dessa forma, a mobilidade na eletroforese se dará apenas pelo peso molecular. O Mini-PROTEAN® TGX™, da marca Bio-Rad, é um exemplo de gel de poliacrilamida utilizado para eletroforese SDS, baseado no sistema de Laemmli. A porcentagem de gel utilizada influencia diretamente na mobilidade mencionada. Altas concentrações de gel são mais efetivos em separações de moléculas com baixo peso molecular, enquanto concentrações baixas de gel separam melhor moléculas de alto peso (BERKELMAN *et al.*, 2010).

Nesse processo também é importante citar a função dos géis de resolução e de empilhamento. O primeiro é o gel na qual ocorrerá a corrida e consequente separação das proteínas. Entretanto, para que possa ocorrer uma melhor separação e definição das bandas, o gel de empilhamento gera a agregação das proteínas antes da corrida, formando uma fina camada. Isso evita a dispersão da amostra e melhora a visualização da corrida no gel de resolução (ACHILLI; CIANA; MINETTI, 2018).

Entre as vantagens dessa técnica, podemos destacar a alta resolução e boa aplicação em experimentos que não necessitam que as proteínas mantenham suas funções. Porém, o método também apresenta algumas limitações, como a desnaturação de proteínas, que impede a identificação de atividades enzimáticas e a

interações de ligações entre as moléculas, dificultado a análise de certos comportamentos (NOWAKOWSKI; WOBIG; PETERING, 2014).

2.8 PRODUTOS ALIMENTÍCIOS CONTENDO PAM

Na busca por uma vida saudável, preocupação com o ambiente e a necessidade de suprir a crescente demanda alimentar, o uso de proteínas a base de plantas vem sendo uma alternativa de significativa importância. Isso porque as proteínas vegetais têm sido notadas como boas substitutas da dieta animal, conseguindo suprir as necessidades do organismo, tornando-se objeto de estudo cada vez mais frequente (LANGYAN *et al*., 2022).

Nesse contexto, as PANC se apresentam como uma opção muito viável, principalmente pela sua facilidade de cultivo e características nutricionais. A PAM faz parte desse grupo, tendo ganhado maior atenção recentemente pelo seu alto teor proteico, variedade de vitaminas e minerais, além da sua atividade antioxidante relatada. Dessa forma, essa planta tem sido utilizada para o desenvolvimento de diversos produtos alimentares, como farinhas e sorvetes (DA SILVA, M. A.; DAMIANI, A. P., 2022).

Uma das inovações na indústria alimentícia é a incorporação da farinha das folhas de PAM em alimentos como macarrão, visando aumentar a qualidade nutritiva do alimento, dada as propriedades da PAM. Desse modo, é possível inserir um alimento popular na dieta, mas com características mais saudáveis, sendo capaz de suprir de 30 a 50,8% da quantidade de fibras diárias. Além disso, seu uso permitiu um enriquecimento de cálcio e ferro, enquanto manteve os aspectos sensoriais do alimento (SATO *et al.*, 2019).

Outra incorporação a alimentos é a adição da PAM em formulações de sorvete. A riqueza em mucilagem não tóxica permite que essa planta possa substituir emulsionantes e estabilizantes presentes nesse produto, priorizando a utilização de componentes naturais. Os estudos envolvendo o desenvolvimento dessas fórmulas apresentou uma alta aceitação entre os participantes, considerando o sorvete produzido como saboroso e que seria uma opção procurada para consumo (SANTOS *et al*., 2022).

Maciel *et al.* (2020) elaboraram micropartículas coloidais utilizando quitosana e pectina, com extrato aquoso de PAM como fonte de ferro. Essas micropartículas

representam um potencial inovadora para incorporar em alimentos, visando a prevenção de deficiência nutricional de ferro.

A utilização da mucilagem extraída das folhas de PAM em misturas contendo goma arábica e goma guar foi implementada em bebidas lácteas fermentadas para substituir a gordura e assegurar a qualidade ao longo do prazo de validade (AMARAL *et al.*, 2018).

Neves *et al*. (2020) utilizaram a mucilagem isolada das folhas de PAM na produção de microcápsulas contendo proteína do soro de leite. Essas micropartículas demonstraram eficácia na encapsulação de alfa-tocoferol. Sendo que o encapsulamento de compostos bioativos com baixa solubilidade em meio aquoso tem muita empregabilidade nas indústrias.

A adição dessa planta a produtos de origem animal como hambúrgueres também contribuiu para um aumento significativo no conteúdo proteico. Com o uso da farinha de PAM, foi possível perceber um aumento de aproximadamente 4% de proteínas, aumentando a qualidade nutritiva do alimento. Houve também um aumento no teor de fibras presentes nos hambúrgueres contendo 6% de farinha de PAM, componente importante em fatores como redução do colesterol e prevenção de distúrbios gastrointestinais (ZIEGLER *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar um suplemento alimentar proteico a partir das folhas de PAM.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar o material vegetal;
- Secar e moer as folhas de PAM;
- Determinar a composição centesimal das folhas de PAM;
- Desengordurar as folhas de PAM*;*
- Remover a mucilagem das folhas de PAM**;**
- Extrair proteína pela técnica ácido-base;
- Determinar o Potencial Zeta;
- Determinar o peso molecular das proteínas através do método de eletroforese em gel;
- Determinar a microestrutura por MEV e EDS;
- Desenvolver um suplemento alimentar proteico em gel à base de PAM;
- Realizar teste de estabilidade acelerada do suplemento alimentar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO

No mês de novembro de 2022 foi realizada a primeira coletada das folhas de PAM, em um segundo momento no mês de setembro de 2023 sucedeu uma segunda coleta, ambas foram feitas no período da manhã do dia, em Juiz de Fora (latitude: 21° 66’7775’’S, longitude: 43° 29’5569’’O). Uma parte do material foi depositado no herbário Leopoldo Krieger CESJF da UFJF sob o número 57539 e identificada pela Dra. Daniela Zappi (Museu Paraense Emílio Goeldi-MPEG). O projeto também foi submetido ao SISGEN estando cadastrado sob o número do cadastro AAC38AA.

4.2 SECAGEM E MOAGEM DO MATERIAL

A fim de efetuar a secagem das folhas de PAM, utilizou-se a estufa de circulação e renovação de ar (SL102, SOLAB®) por 5 dias a uma temperatura de 40 ºC. Em seguida, o material foi moído em moinho de facas (SL30, SOLAB®), peneirado em malha 20 mesh (0,85 mm) e mantido a uma temperatura de - 4 ºC, até uso posterior.

4.3 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

4.3.1 Umidade por termogravimetria

Para a realização das análises de umidade, cerca de 2 g das folhas frescas de PAM foram pesadas em cápsulas de alumínio com pérolas e bastões de vidros previamente pesados e, logo após, colocados em estufa por 30 minutos a uma temperatura aproximada de 102 ºC. Em seguida, as amostras foram transferidas para dessecador por 30 minutos e foram novamente pesadas. Esse processo se repetiu até verificação de massa constante. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram calculados por meio da Equação (1) (VANQA *et al*., 2022).

$$Eq.(1) \quad \%\,\text{umidade} = \frac{100\ \text{x}\ \text{m}}{\text{m}'}$$

Em que: m = perda da massa, em gramas (corresponde à massa inicial do conjunto - cápsula, pérolas, bastão de vidro e amostra subtraída da massa final, após secagem) e m' = massa da amostra, em gramas.

4.3.2 Cinzas

Para a avaliação de cinzas, primeiramente os cadinhos de porcelana foram secos em mufla a uma temperatura de 550 °C por 1 hora e em seguida mantidos no dessecador até atingirem temperatura ambiente e massa constante para obtenção da tara. Em seguida, foram pesadas cerca de 2 g de amostra em pó de PAM em cada cadinho de porcelana e colocadas na mufla (Q318M, QUIMIS®) por 12 horas na temperatura de 550 °C. Posteriormente, foram retiradas e colocadas no dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesadas. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram calculados em base seca por meio da Equação (2) (SCHIEL *et al*., 2022).

$$Eq.(2) \quad \%\, cinzas = \frac{(m_2 - m_1)\, x\, 100}{m_0}$$

Em que: m_2 = massa da cápsula de porcelana com amostra, após incineração, em gramas; m_1 = massa da cápsula de porcelana vazia, em gramas e m_0 = massa da amostra, em gramas.

4.3.3 Lipídeos pelo método de Goldfish

No procedimento de extração de lipídio foi utilizado o equipamento de Goldfish (TE- 044, TECNAL®). Para isso, os frascos *reboiler* foram identificados e pesados previamente em balança analítica (AL500C, MARTE®). Cerca de 2 g de amostras em pó de PAM e PAM desengorduradas (PAMD) foram pesadas no cartucho extrator, sendo colocadas em um suporte a fim de manter as amostras submersas em 100 mL de éter etílico P.A. (SYNTH®). O processo de extração ocorreu no período de 1 hora e 30 minutos. Após essa etapa, ocorreu a recuperação do solvente, em seguida os frascos *reboiler,* contendo os lipídeos extraídos, foram levados ao dessecador para resfriar e, logo em seguida, pesados em balança analítica. O teor de lipídeo foi

calculado de acordo com a Equação (3). O experimento foi realizado em triplicata e calculada em base seca (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

$$Eq.(3) \quad \%\ \text{gordura} = \frac{\text{massa do material extraído}}{\text{massa da amostra no cartucho extrator}}\ x\ 100$$

Em que: massa do material extraído = massa do *reboiler* contendo a amostra após extração – massa do *reboiler* vazio.

4.3.4 Determinação de proteína pelo método de Kjeldahl

O teor proteína bruta foi determinado pelo método de Kjeldahl, considerando o fator de conversão de 6,25, conforme descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* (HORWITZ; LATIMER JUNIOR, 2011), utilizando-se bloco digestor (TE-007MP, TECNAL®) e destilador de nitrogênio (TE-036/1, TECNAL®).

A dosagem de proteína bruta foi feita pela quantificação de nitrogênio total de acordo com o método de Kjeldhal baseado no aquecimento (400 ºC) de 0,2 g de amostra em 3 mL de ácido sulfúrico P.A. e 1,6 g de catalisadores (sulfato de cobre e sulfato de potássio), para digestão da matéria orgânica. Durante o processo de digestão as moléculas de nitrogênio foram reduzidas e transformadas em sulfato de amônio. Como etapa seguinte, em destilador de nitrogênio, adicionou-se 10 mL de hidróxido de sódio 35% às amostras digeridas, sendo que tal reação ocorreu em sistema fechado e sob aquecimento, promovendo a liberação de amônia que, por sua vez, reagiu com a solução de ácido bórico 4%, culminando na formação de borato de amônia. A solução contendo borato de amônia foi titulada com solução de ácido clorídrico 0,1 N padronizado. Também foram realizadas análises de controle do teste.

O teor de proteína foi calculado em base seca de acordo com as Equações (4) e (5), os experimentos foram executados em triplicata e as análises estatísticas foram realizadas em um nível de significância de 0,05 por meio do teste de Tukey, aplicado com auxílio do *Software R*® versão 4.1.2 (*The R Foudation for Statistical Computing*).

$$Eq.(4) \quad \%\ \text{nitrogênio total (NT)} = \frac{\text{V amostra x Ci x Fc x 1,4}}{\text{massa da amostra}}$$

$$Eq.(5)\ \%\ \text{Proteína Bruta} = \%\ \text{NT x fator de conversão em proteína}$$

Em que: V amostra = volume de ácido clorídrico gasto para titular a amostra; C_i = concentração (mol/L) da solução de ácido clorídrico; F_c = fator de correção para a solução de ácido clorídrico.

4.4 TÉCNICAS EXTRATIVAS PARA AUMENTO DO TEOR DE PROTEÍNAS NAS FOLHAS DE *PERESKIA ACULEATA* MILLER (PAM)

4.4.1 Desengorduramento

A PAM em pó foi desengordurada com etanol absoluto (99,3%, TUPI®) na proporção 5:1 (5 mL de solvente para cada 1 g de PAM). O sistema foi aquecido a uma temperatura de 40 ºC no banho de aquecimento (B-490, BÜCHI®) por 1 hora e sob agitação magnética (HJ-3, WARMNEST®). Esse processo extrativo foi realizado em triplicata para a mesma amostra. Para separar o solvente da amostra, foi utilizado o processo de filtração a vácuo em um papel filtro 25 µm (QUANTY Ltd®). Posteriormente, a PAMD foi seca em temperatura ambiente (aproximadamente 25 ºC) até a completa evaporação do etanol, que durou cerca de 7 dias.

4.4.2 Remoção da mucilagem

Para a remoção de mucilagem, primeiramente as folhas frescas de PAM foram picadas. Em seguida, a fim de analisar experimentalmente a melhor condição de extração da mucilagem, foram determinadas cinco condições de extração (Tabela 1).

Tabela 1 - Condições de remoção da mucilagem de *Pereskia aculeta* Miller

Nomenclatura das condições de remoção da mucilagem (RM)	Condição de extração
RM pH 1,7	Ácido clorídrico 2 M (pH = 1,7)
RM pH 12,5	Hidróxido de sódio 0,1 M (pH = 12,5)
RM 25 ºC	Água deionizada 25 ºC (pH = 6,5)
RM 40 ºC	Água deionizada 40 ºC (pH = 6,5)
RM 10 ºC	Água deionizada 10 ºC (pH = 6,5)

Fonte: Autor (2024).

Para cada condição, foram lavadas 18 g das folhas de PAM, e submetidas a agitação à 451 rpm (RW 20, IKA®) por 5 minutos. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Posteriormente, a mucilagem obtida foi separada das folhas de PAM com o auxílio de uma peneira de aço. Logo após a retirada da mucilagem, as folhas de PAM passaram por um processo de secagem, na qual se utilizou a estufa de circulação e renovação de ar (SL102, SOLAB®) por 3 dias a uma temperatura de 40 °C.

Em um segundo momento, a partir da análise posterior, duas condições de remoção da mucilagem foram selecionadas, à 25 °C e 40 °C (RM 25 e RM 40 °C, respectivamente). Novas extrações foram realizadas nessas condições em uma escala maior, sendo que para cada condição foram lavadas 1 kg das folhas de PAM e submetidas a agitação à 451 rpm (RW 20, IKA®) por 5 minutos, esse procedimento foi realizado 6 vezes. Depois a mucilagem obtida foi separada das folhas com o auxílio de uma peneira de aço. Em seguida as folhas foram secas na estufa de circulação e renovação de ar (SL102, SOLAB®) por 5 dias a uma temperatura de 40 ºC.

4.4.3 Extração ácido-base

No primeiro momento a extração de proteínas da amostra de PAMD em pó ocorreu de acordo com Queiroz *et al*. (2021), com modificações no processo. As amostras foram suspensas em hidróxido de sódio 1 M na proporção de 1:25 p/v (1 g de PAMD: 25 mL de hidróxido de sódio). Em seguida, foram sonicadas (1400 A, UNIQUE®) por 30 a 90 minutos a uma temperatura de 30 °C, frequência de 40 KHz e potência de 135 Watts (Tabela 2). Posteriormente, aquecidas em banho maria (B-490, BÜCHI®), sob agitação de 451 rpm (RW 20, IKA®), nas temperaturas 30 ºC, 40 ºC e 60 ºC por 120 minutos. Na etapa seguinte, foram centrifugadas (NI1813, NOVA INSTRUMENTS®) a uma rotação de 2000 rpm por 10 minutos, e os pellets foram ressuspendidos para uma segunda extração alcalina realizada nas mesmas condições para promover o esgotamento do material vegetal. O pH do sobrenadante foi ajustado para o ponto isoelétrico de PAM (conforme descrito a seguir no item 4.5.1) com ácido clorídrico P.A. 37% p/v (SYNTH®), a fim de possibilitar a decantação das proteínas, e centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. Por fim, o pellet foi removido e lavado duas vezes com água destilada, sendo posteriormente liofilizado.

Tabela 2 - Condições de extração ácido-base da proteína nas folhas de *Pereskia aculeata* Miller em pó

Amostra	Tempo de sonicação (minutos)	Temperatura de agitação (ºC)	Tempo de agitação (minutos)
1	30	30	
2	30	40	
3	30	60	
4	60	30	
5	60	40	120
6	60	60	
7	90	30	
8	90	40	
9	90	60	

Fonte: Autor (2024).

No segundo momento, foi realizado a extração de proteínas das amostras RM 25 ºC e RM 40 ºC. As amostras foram suspensas em hidróxido de sódio 0,1 M na proporção de 1:16 p/v (1 g de amostra: 16 mL de hidróxido de sódio). Em seguida, foram aquecidas em banho maria (B-490, BÜCHI®), sob agitação de 451 rpm (RW 20, IKA®), na temperatura de 40 ºC por 60 minutos. Posteriormente foram centrifugadas (2K15, SIGMA®) a uma rotação de 8000 g por 20 minutos a 4 ºC, e os pellets foram ressuspendidos para uma segunda extração alcalina realizada nas mesmas condições para promover o esgotamento do material vegetal. O pH do sobrenadante foi ajustado para o ponto isoelétrico com ácido clorídrico 2 M (SYNTH®) a fim de possibilitar a decantação das proteínas, e centrifugadas a 8000 g por 20 minutos a 4 ºC. Por fim, o pellet foi removido e lavado 3 vezes com água destilada a pH 1,7 e centrifugadas a 8000 g por 10 minutos a 4 ºC, sendo posteriormente ajustado o pH para 7 e encaminhado para a liofilização. Após o processo de extração ácido-base as amostras foram nomeadas como extrato proteico com remoção de mucilagem 25 e 40 ºC (EXP RM 25 ºC e EXP RM 40 ºC, respectivamente).

Todos os experimentos foram realizados em duplicata. As análises estatísticas foram realizadas em um nível de significância de 0,05 pelo teste de Tukey, aplicado com auxílio do *Software R*® versão 4.1.2 (*The R Foudation for Statistical Computing*).

4.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DAS FOLHAS DE *PERESKIA ACULEATA* MILLER (PAM) E DO EXTRATO PROTEICO

4.5.1 Determinação do Potencial Zeta para PAM e RM 40 ºC

As medidas do PZ foram realizadas no equipamento *Zetasizer* (Nano-ZS90, Malvern®) a 25 ºC. Para a realização do ensaio, cerca de 0,2 g de amostras para PAM e RM 40 ºC foram pesados e colocados sob agitação magnética (HJ-3, WARMNEST®) em 200 mL de água deionizada por 13 horas. A solução preparada anteriormente, foi filtrada a vácuo em um papel filtro 25 µm (QUANTY Ltd®) e deixada sob agitação por 10 minutos para a homogeneização e estabilização. Uma alíquota de 30 mL foi retirada, filtrada em filtro 0,45 µm (NYLON®) e, novamente, submetida a agitação magnética e verificado o valor do seu pH inicial (PG 2000, GEHAKA®).

Para basificar o meio até atingir os pHs 11 e 9 foi inserida uma solução de hidróxido de sódio (VETEC®) a 1 mol/L. Em seguida, uma alíquota dessa solução foi adicionada na cubeta do equipamento *Zetasizer* para efetuar a leitura. O mesmo procedimento foi realizado para os pHs 7 e 5, porém, utilizando uma solução de ácido clorídrico (SYNTH®) a 1 µ mol/L. Para executar a leitura nos pHs 3, 2 e 1,7 o mesmo processo foi empregado, entretanto foi usado uma solução de ácido clorídrico mais concentrado (1 mol/L), para não diluir excessivamente a amostra (STONE *et al*., 2019).

4.5.2 Eletroforese em gel

A técnica de eletroforese em gel foi realizada no equipamento Mini – Protean® (Bio-Rad). A metodologia de preparação do gel utilizada foi descrita por Laemmli (1970). Para o gel de corrida, foi usada acrilamida a uma concentração de 15% e no gel de empilhamento uma concentração de 4%.

O perfil de peso molecular das proteínas extraídas de folha de PAM, RM 25 ºC, RM 40 ºC, EXP RM 25 ºC e EXP RM 40 ºC foram identificados de acordo com o

conteúdo de nitrogênio obtido pelo método Kjeldahl. Foram preparadas diluições em tampão da amostra (2- mercaptoetanol, SDS 10%), na proporção amostra: tampão de 1:4 para as frações de PAM, RM 25 ºC, RM 40 ºC, EXP RM 25 ºC e EXP RM 40 ºC. Foram adicionados 7 µL em cada poço do gel, para atingir concentrações de proteína de 50 µg proteína para todas as amostras. A corrida foi realizada por 2 horas sob uma tensão constante de 100 V em um gel de 10,8 × 6,8 cm. Os pesos moleculares da proteína foram determinados por comparação com a corrida de 7 µL da solução padrão *blueEye Prestained Protein Marker PS-104* (Cellco) contendo padrões de pesos moleculares de 135, 100, 75, 63, 48, 35, 25, 20, 17 e 11 kDa.

4.5.3 Microscópio eletrônico de varredura e espectroscopia de energia dispersa de raios-x

As amostras das folhas de PAM, RM 25 ºC, RM 40 ºC, EXP RM 25 ºC e EXP RM 40 ºC foram analisadas em triplicatas por MEV e por EDS (TM 3000 HITACHI®), com aceleração do feixe de 15 KV e em magnitude de 250x.

O procedimento para análise, necessitou de uma preparação prévia, na qual foi fixado uma pequena quantidade de amostra em pó em uma fita de carbono cortada no formato retangular. Essa fita foi fixada no porta-amostra e regulada a altura da haste metálica de acordo com a técnica. Em seguida, foi analisado no equipamento Hitachi.

4.6 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO

A formulação foi desenvolvida no Laboratório de Controle de Qualidade, na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Diversos testes foram realizados para a obtenção da formulação em gel comestível contendo EXP RM 40 ºC.

Inicialmente foi pesado (AL500C, MARTE®) a carboximetilcelulose (CMC), em seguida foi solubilizada em água purificada qsp., brevemente aquecida a uma temperatura de 40 ºC. Posteriormente, foi pesado e triturado no grau os demais excipientes: aromas, sorbato de potássio, benzoato de sódio, xilitol, vitamina C e E. A solução de CMC inicialmente preparada foi vertida no grau aos poucos até a solubilização dos demais excipientes.

O EXP RM 40 ºC foi triturado e tamisado em malha 20 mesh (0,85 mm), em seguida foi levigado com água purificada qsp. até sua solubilização. Foi calculado o fator de correção para EXP RM 40 ºC, de acordo com o seu teor proteico obtido na análise de Kjeldahl Equação (6), com o intuito de obter uma concentração final de 7,5% de proteína na formulação. Posteriormente foi adicionado aos poucos no grau e homogeneizado com os demais excipientes. As formulações testadas do gel, bem como a composição qualitativa da formulação escolhida para o desenvolvimento da formulação, encontram-se nas Tabela 3.

$$Eq.(6)\ \ Fc = \frac{100}{TPR}$$

Em que: Fc = fator de correção e TPR = teor proteico real da EXP RM 40 ºC.

Tabela 3 - Composição das formulações (F) testadas de gel e suas funções, valores dados em %.

Componentes (%)	Funções	F1	F2	F3	**F4***
Carboximetilcelulose (alimentícia)	gelificante	0,5	0,75	1,0	**1,0**
Aroma de limão	flavorizante	0,5	0,5	0,5	**-**
Aroma de baunilha	flavorizante	0,5	1,5	1,5	**0,5**
Aroma de chocolate	flavorizante	-	-	-	**1,5**
Xilitol	edulcorante	1,0	2,0	2,0	**5,0**
Sorbato de potássio	conservante	0,2	0,2	0,2	**0,2**
Benzoato de sódio	conservante	0,1	0,1	0,1	**0,1**
Vitamina E	antioxidante	0,05	0,05	0,05	**0,05**
Vitamina C	antioxidante	0,05	0,5	0,5	**0,5**
EXP RM 40 ºC	fonte proteica	7,5	7,5	7,5	**7,5**
Água purificada, *qsp.*	veículo	100	100	100	**100**

***Método escolhido para o estudo em negrito.**

Fonte: Autor (2024).

4.6.1 Estudo de estabilidade acelerada

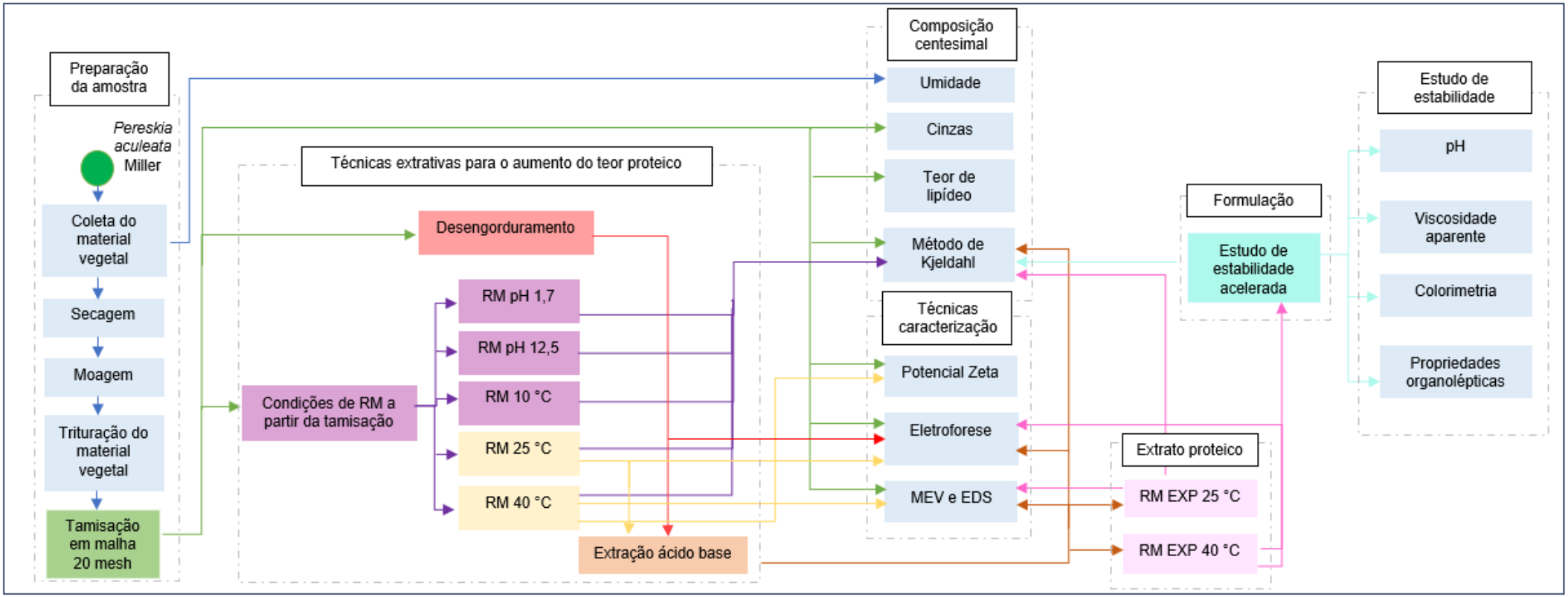
O estudo de estabilidade acelerada foi realizado de acordo com RDC 318/2019 e ANVISA 2018, na qual se baseia na avaliação de possíveis alterações, ou não, a situações de armazenamento diversas. Para realizar esse estudo, foi desenvolvido uma formulação em gel contendo EXP RM 40 ºC e submetida ao armazenamento de temperaturas diferentes: mantido em geladeira a uma temperatura de 5 °C ± 2 ºC; em câmara climática a uma temperatura de 30 °C ± 2 ºC/ 65% UR e temperatura ambiente (25 °C ± 2 ºC) e avaliadas ao longo dos dias 0, 7,15, 30, 45, 60 e 90. Foram analisados suas características organolépticas, viscosidade aparente e pH. Também, foi feito o método de Kjeldahl nos tempos 0 e 90 dias para as formulações, a fim de verificar se o nitrogênio total se manteria até o final do estudo.

Além disso, foi realizada a análise de colorimetria, na qual a cor da formulação foi obtida usando o espectrofotômetro CM-5 (CR-400, CHROMA®) operando de acordo com a escala CIE L*a*b*. Sendo L* a luminosidade que varia de 0 (preto) a 100 (branco), a* e b* coordenadas de croma (–a = verde, +a = vermelho, –b = azul e +b = amarelo). Os experimentos foram executados em triplicata e as análises estatísticas foram realizadas em um nível de significância de 0,05 pelo teste de Tukey, aplicado com auxílio do *Software R*® versão 4.1.2 (*The R Foudation for Statistical Computing*).

4.7 FLUXOGRAMA

Como maneira de ilustrar e resumir os procedimentos realizados, foi construído um fluxograma (Figura 8).

Figura 8 - Fluxograma dos processos e análises realizadas



Fonte: Autor (2024).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DA COLETA

Partindo-se de 3 kg de folhas de PAM para a primeira e a segunda coleta, nos quais após os processos de secagem e moagem foram obtidos 450 g de material vegetal em pó, o que resultou em um rendimento de 15% m/m. No trabalho desenvolvido por Franzen *et al.* (2001) realizou-se os mesmos procedimentos, obtendo-se um rendimento de 14,4% m/m de pó de PAM, corroborando com o estudo atual.

5.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS FOLHAS *PERESKIA ACULEATA* MILLER

As folhas frescas de PAM apresentaram alto teor de umidade (Tabela 4), com 86,09%. Este resultado ratifica com outros autores, como Martinevski *et al.* (2013) e Vargas (2017) que encontraram 86,8% e 87,7%, respectivamente. Pequenas variações nos valores de umidade podem ser decorrentes das coletas terem sido realizadas em localizações e estações do ano diferentes (SILVA, 2015).

Contudo, a umidade superior a 80% afeta não só a sua conservação como vegetal fresco, mas também o seu prazo de validade, e neste sentido é interessante considerar a utilização de processos que permitam prolongar a vida útil do material vegetal (ROSA *et al*., 2018). Na indústria alimentícia, como uma forma de desenvolver produtos nutritivos e com alta durabilidade, é feito a produção de farinha por meio de processos de secagem (EGEA; PIERCE, 2021).

O teor de cinzas em base seca para as folhas de PAM foi de 22,72% ± 0,02% (Tabela 4). Este percentual foi superior ao relatado por Almeida *et al*. (2014), no qual foram obtidos 14,8%. Porém, resultado semelhante ao presente estudo, foi encontrado por Gonçalves *et al.* (2014), apresentando em média 20,12%. A análise desta variável está diretamente relacionada à concentração de minerais em vegetais. Nesse sentido, a PAM é uma fonte significativa desses elementos, podendo ser um aporte na dieta alimentar (MARTINEVSKI *et al*., 2013; TAKEITI *et al*., 2009).

Uma das vantagens de se utilizar PAM é o baixo teor de lipídios, podendo ser empregada em dietas com restrições hipocalóricas (ROCHA *et al*., 2008;

RODRIGUES *et al*., 2015). No presente trabalho, se obteve um teor de lipídeo de 6,39% ± 0,40 % (Tabela 4) para a amostra de PAM em base seca. Almeida e Cambraia (1974), Albuquerque, Sabaa-Srur e Freiman (1991), Queiroz *et al.* (2015) encontraram 6,8%, 6,30% e 5,7% de lipídeo, respectivamente para a amostra de PAM.

Em base seca, as folhas de PAM apresentaram teor de proteína de 17,62% ± 0,58% (Tabela 4), semelhante ao encontrado por Girão *et al.* (2003) de 19,67%. No estudo realizado por Gonçalves *et al*. (2014), o percentual proteico encontrado foi de 27,79% para as folhas em pó.

Segundo Mercê *et al*. (2001), o teor de proteína pode variar de 15 a 28%, dependendo das condições de cultivo como solo, clima, estação do ano e região. A partir dos dados relatados na literatura e com os obtidos no atual estudo, percebe-se que a PAM é rica em proteínas e possui potencial para ser empregada nas indústrias de alimentos (QUEIROZ, 2012).

As proteínas presentes nas folhas de PAM são um dos seus constituintes de maior interesse para a população, visto que é amplamente utilizada por parte das comunidades de baixa renda como principal fonte proteica, sendo denominada popularmente como “carne de pobre” (PEREIRA *et al*., 2007).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, pela RDC nº 269 (ANVISA, 2005), um adulto deve ingerir diariamente cerca de 50 g de proteínas. Conforme a Portaria nº 27 da ANVISA (1998), um produto rico nesse macronutriente deve fornecer, no mínimo, 20% da ingestão diária recomendada para 100 g do alimento sólido.

Tabela 4 - Análise composicional das folhas da *Pereskia aculeata* Miller (n = 3)

Análise (%)	*Pereskia aculeata* Miller
Umidade das folhas frescas	86,09 ± 0,07
Cinzas das folhas secas	22,72 ± 0,02
Lipídeos das folhas secas	6,39 ± 0,40
Proteína total das folhas secas	17,62 ± 0,58

Fonte: Autor (2024).

5.3 TÉCNICAS EXTRATIVAS PARA AUMENTO DO TEOR DE PROTEÍNAS NAS FOLHAS DE *PERESKIA ACULEATA* MILLER (PAM)

5.3.1 Desengorduramento

Para realização do desengorduramento das folhas de PAM em pó (204 g) utilizou-se etanol 99,3%, obtendo-se 200 g de material desengordurado no final do processo, culminando em um rendimento de 98,03% m/m. Na literatura esse método em material vegetal é amplamente relatado antes da extração de proteína (HOU *et al*., 2010; LI *et al*., 2014; SUN *et al*., 2021), visto que a remoção do conteúdo lipídico pode promover o aumento de outros componentes presentes na amostra (KUMAR, SRUTHI *et al*., 2022).

O etanol foi o solvente de escolha para o processo de desengorduramento por conta da sua empregabilidade na indústria de alimentos e por ser priorizado em relação ao hexano como forma de se manter um "rótulo limpo" e um marketing orgânico (QUEIROZ *et al.*, 2021).

No presente trabalho, o teor de lipídeo foi de 4,15% ± 0,25% para a amostra de PAMD, demonstrando que o processo de desengorduramento com etanol foi parcialmente eficiente, visto que a amostra de PAM apresentou inicialmente teor lipídico de 6,39% ± 0,40% (conforme apresentado no item 5.2).

Para as amostras de PAMD o percentual proteico obtido foi de 20,83%± 0,37%. É esperado que as amostras desengorduradas possuam um maior teor proteico quando comparadas com as amostras de PAM (17,62% ± 0,58%), uma vez que após a extração de lipídeos, o percentual de outros macronutrientes aumente (QUEIROZ *et al.*, 2021). Entretanto, o processo extrativo de lipídios resultou em um aumento de 18,22% no teor proteica na amostra de PAMD.

Diante dos resultados obtidos, optou-se por realizar outro procedimento extrativo para remoção de mucilagem (RM) a fim de promover o aumento do teor de proteína nas amostras de PAM, como será discutido a seguir.

5.3.2 Remoção de mucilagem

A mucilagem geralmente pode ser definida como uma substância polimérica formada por cadeias de monossacarídeos. Estas cadeias são ramificadas e os monossacarídeos majoritários incluem D-galactose, D-xilose, L-ramnose e L-arabinose, bem como ácido galacturônico, sendo que suas proporções variam a depender do material vegetal (GOYCOOLEA; CÁRDENAS, 2004).

A fim de promover o aumento do teor proteico, optou-se por remover a mucilagem presente nas folhas de PAM, pois em sua composição contém um percentual considerável desse carboidrato complexo, característico de espécies pertencentes à família Cactaceae (AMARAL *et al*., 2018).

Cinco diferentes métodos de RM foram testados (Tabela 5), sendo que a condição RM 40 ºC foi a que apresentou um maior rendimento após a secagem da amostra de RM (14,10%). A partir dos resultados, podemos inferir que pHs ácido e base apresentaram um menor rendimento de RM quando comparado com as outras condições em que o pH utilizado foi neutro. Sabe-se que a temperatura e o pH de extração podem afetar significativamente na estrutura, composição e propriedades funcionais da mucilagem (PULIGUNDLA; LIM, 2022).

De acordo com a Tabela 5, o teor de proteína apresentou diferença significativa ($p<0,05$) em todas as diferentes condições de RM. De acordo com Fabre *et al*. (2015), o aumento da temperatura durante a extração permite obter uma melhor RM e, consequentemente um maior percentual proteico. Entretanto, métodos extrativos que empregam temperaturas acima de 40 ºC podem induzir a desnaturação de proteínas (BARBARY *et al.*, 2009). Portanto, optou-se, no presente trabalho, por realizar a RM em pH neutro e a 40 ºC.

Tabela 5 - Rendimento e teor de proteína presente na *Pereskia aculeta* Miller após a remoção da mucilagem em diferentes condições de pH e temperatura.

Condições de remoção da mucilagem (RM)	Rendimento após a secagem (%)	Teor de Proteína (%)[1]
RM pH 1,7	11,43	19,29 ± 0,24[a]
RM pH 12,5	11,26	16,44 ± 0,18[b]
RM 25 ºC	12,00	23,45 ± 0,10[c]
RM 40 ºC	14,10	24,93 ± 0,27[d]
RM 10 ºC	12,05	20,48 ± 0,28[e]

[1]Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Autor (2024).

5.3.3 Extração ácido-base e análise de proteínas das extrações

Após o emprego das técnicas de desengorduramento e RM nas folhas de PAM, realizou-se a extração ácido-base desses materiais, sendo que em um primeiro momento realizou-se a extração ácido-base das folhas de PAMD. Posteriormente, visto que a RM apresentou-se mais eficiente no aumento do teor proteico, realizou-se a extração ácido-base para as amostras EXP RM 25 ºC e EXP RM 40 ºC.

Na Tabela 6 são apresentadas as condições de otimização da extração ácido-base testadas para PAMD, bem como os resultados de rendimento do extrato proteico e teor de proteína.

Tabela 6 - Condições de extração, rendimentos e teores de proteínas das folhas de *Pereskia aculeata* Miller desengordurada em pó

Amostra	Tempo de sonicação (minutos)	Temperatura (ºC)	Rendimento do extrato proteico em pó (%)[1]	Teor de Proteína (%)[1]
1	30	30	18,94 ± 6,90^{a}	12,79 ± 1,79^{c}
2	30	40	24,83 ± 2,04^{a}	17,20 ± 0,53^{bc}
3	30	60	20,93 ± 2,82^{a}	20,78 ± 2,63^{ab}
4	60	30	24,90 ± 3,94^{a}	16,57 ± 0,21^{bc}
5	60	40	25,66 ± 7,06^{a}	15,87 ± 2,19^{bc}
6	60	60	25,00 ± 2,75^{a}	16,19 ± 2,50^{bc}
7	90	30	21,45 ± 7,65^{a}	17,66 ± 4,33^{bc}
8	90	40	34,71 ± 0,77^{b}	23,80 ± 2,48^{a}
9	90	60	21,75 ± 0,64^{a}	16,93 ± 1,92^{bc}

[1]Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Autor (2024).

A amostra 8, extraída na condição de 90 minutos de sonicação a uma frequência de 40 KHz e a 40 ºC, apresentou diferença significativa ($p<0,05$) quando comparada com as demais condições (Tabela 6). No trabalho desenvolvido por Wang *et al*. (2021) também verificou-se que o emprego da técnica de sonicação a 40 ºC promoveu um aumento no rendimento do teor de proteína para material vegetal.

De acordo com a Tabela 6, o teor de proteína para a amostra 8 foi de 23,80%, demonstrando que o desengorduramento do material vegetal seguido da extração ácido-base com utilização do ultrassom com potência de 135 W, resultou em um aumento de apenas 35,07% no teor proteico, considerando que a PAM apresentava inicialmente 17,62%.

Em um segundo momento (Tabela 7), verificou-se que o teor de proteína das amostras EXP RM 25 ºC e EXP RM 40 ºC foi de 47,63% e 56,53%, respectivamente, demostrando que o processo de RM seguido da extração ácido-base resultou em um aumento de 170,32% e 220,83% no teor proteico, respectivamente, considerando que a PAM apresentava inicialmente 17,62%. Assim, dentre os métodos extrativos testados após a RM, o mais eficiente foi EXP RM 40 ºC, demonstrando assim que essa etapa foi de suma importância para alcançar um resultado satisfatório e eficiente.

O aumento do teor de proteína de um produto promove benefícios nutricionais, além de melhorias na viscosidade e na capacidade emulsificante de um sistema (SILVA *et al.*, 2019).

Tabela 7 - Rendimento proteico e teor de proteína após a extração ácido-base da *Pereskia aculeata* Miller com remoção de mucilagem.

Amostra	Rendimento do extrato proteico em pó (%)[1]	Teor de proteína (%)[1]
Extrato proteico com remoção de mucilagem à 25 °C	23,83± 0,56[a]	47,63 ± 0,38[a]
Extrato proteico com remoção de mucilagem à 40 °C	32,11± 0,70[b]	56,53 ± 0,58[b]

[1]Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Autor (2024).

5.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DAS FOLHAS DE *PERESKIA ACULEATA* MILLER (PAM) E DO EXTRATO PROTEICO

5.4.1 Determinação do Potencial Zeta para PAM e RM 40 °C

O PZ é uma técnica utilizada a fim de conhecer o ponto isoelétrico de uma substância e/ou sistema. No presente estudo, utilizou-se a técnica de PZ para caracterizar o ponto isoelétrico das amostras de PAM e RM 40 °C a fim de selecionar o melhor pH para realização de uma extração ácido-base mais eficiente (item 4.4.3).

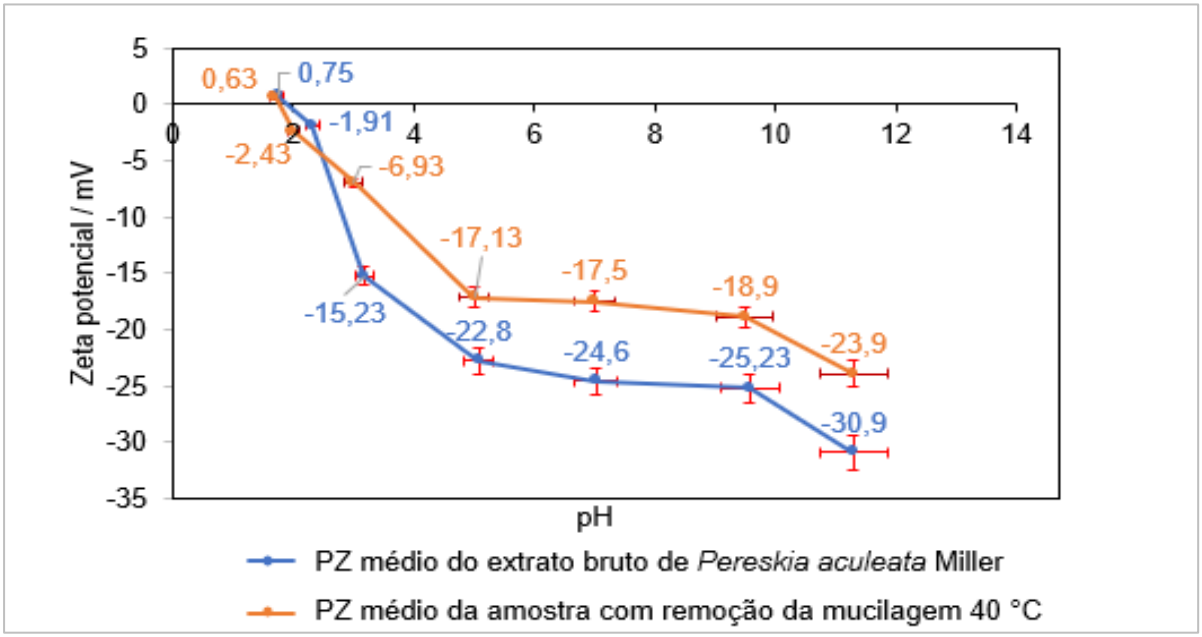
Diante dos resultados observados na Figura 9, percebe-se que o ponto isoelétrico do extrato bruto das folhas de PAM ocorreu em torno do pH 1,7. No trabalho desenvolvido por Morais *et al.* (2019) obteve-se resultado semelhante para a amostra de PAM.

Analisando a amostra RM 40 °C (Figura 9) nota-se que o ponto isoelétrico se manteve em 1,7, mesmo após o processo extrativo da RM. Acredita-se que o baixo pI

se deve à presença da mucilagem que apresenta em sua estrutura ácido galacturônico e carboxilas em cadeias laterais de aminoácidos (PATHAK *et al*., 2015; SIBAJA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015).

Uma vez que o PZ encontrado foi de 1,7 (próximo de zero), formaram-se dispersões mais instáveis, uma vez que os valores estão entre -30 mV e +30 mV (PINTO, 2019; MALVERN, 2005) (Figura 9).

Figura 9 - Potencial zeta médio em função do pH do extrato bruto de *Pereskia aculeata* Miller e da amostra com remoção da mucilagem 40 °C

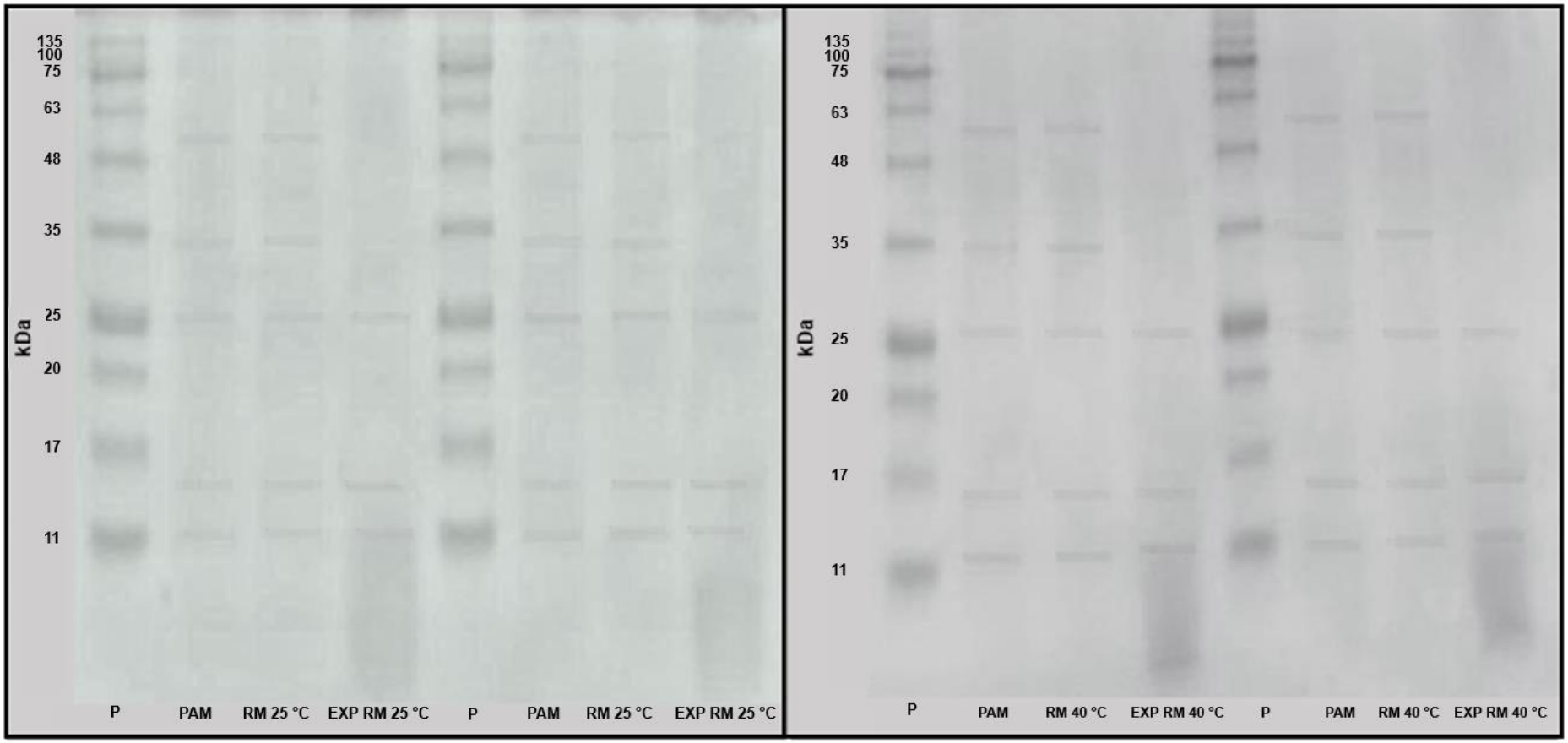


Fonte: Autor (2024).

5.4.2 Eletroforese em gel

O estudo de eletroforese foi desenhado a fim de determinar o peso molecular dos extratos proteicos das folhas de PAM, RM 25 ºC, EXP RM 25 ºC, RM 40ºC e EXP RM 40 ºC (Figura 10).

Figura 10 - Eletroforese em gel SDS-Poliacrilamida de diferentes extratos proteicos de *Pereskia aculeata* Miller



Legenda: Eletroforese em gel SDS-Poliacrilamida (15% SDS-PAGE). Em que: (P) padrão de pesos moleculares (135 kDa a 11 kDa); (PAM) *Pereskia aculeata* Miller; (RM 25 ºC) remoção da mucilagem 25 °C; (EXP RM 25 ºC) extrato proteico com remoção de mucilagem 25 °C; (RM 40 ºC) remoção da mucilagem 40 °C e (EXP RM 40 ºC) extrato proteico com remoção de mucilagem 40 °C. Todas as amostras analisadas contém uma concentração de 50 µg proteína.

Fonte: Autor (2024).

Os perfis eletroforéticos para as amostras de PAM, RM 25 ºC e RM 40 ºC foram caracterizados quanto ao seu peso molecular usando os padrões de referência, apresentando em comum bandas com peso molecular observadas em 11 kDa, entre 11 e 17 kDa, 25 kDa, entre 25 e 35 kDa e entre 48 e 63 kDa. Na pesquisa desenvolvida por Takeiti *et al.* (2009) obteve-se resultado semelhante para a amostra de PAM, em que foi observado bandas de proteínas localizadas próximas de 15 KDa e entre 45 e 66 kDa.

Os pesos moleculares encontrados para PAM, RM 25 ºC e RM 40 ºC são característicos da rubisco, que é a principal enzima do processo de fotossíntese (PEREIRA, 2017). De acordo com a literatura, a rubisco apresenta bandas proteicas detectáveis em 13 kDa, 34 kDa e 55 kDa (DESIMONE; HENKE; WAGNER, 1996; LUO *et al*., 2002; SEDIGHEH *et al*., 2011), corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Ela é uma enzima que catalisa a carboxilação da ribulose-1,5-bifosfato na primeira etapa da via de fixação de carbono através do ciclo de Calvin-Benson-Bassham (ABDULLAEV; DJUMAEV; KARIMOV, 2005).

A rubisco apresenta grande potencial atrativo para as indústrias alimentícias pelo seu valor nutricional por ser fonte de aminoácidos essenciais, como a lisina. Além disso, possui boa digestibilidade, propriedades físico-químicas e funcionais desejáveis, como: solubilidade, formação de espuma, gelificação e emulsificação. Devido a essas características, pode ser empregada como ingrediente funcional em uma grande variedade de produtos (UDENIGWE *et al*., 2017; ZANINI,2022).

As mostras de EXP RM 25 ºC e EXP RM 40 ºC também apresentaram bandas de proteínas de 11 kDa, entre 11 e 17 kDa e 25 kDa. Entretanto, não exibiu definição em maiores pesos moleculares (entre 25 e 35 kDa e entre 48 e 63 kDa). Na Figura 10 podemos observar que as amostras EXP RM 25 ºC e EXP RM 40 ºC apresentaram proteínas com peso molecular abaixo de 11 kDa, podendo-se inferir que houve degradação das proteínas de maiores peso molecular durante o processo extrativo ácido-base.

Há estudos que sugerem que as proteínas com baixo peso molecular são consideradas as mais apropriadas para a incorporação em produtos alimentícios. Isso se deve à sua melhor absorção durante a passagem pelo trato digestivo (ALUKO, 2015; JUSTINO; SANTOS; JUNIOR, 2021; MATOS; CASTRO, 2021).

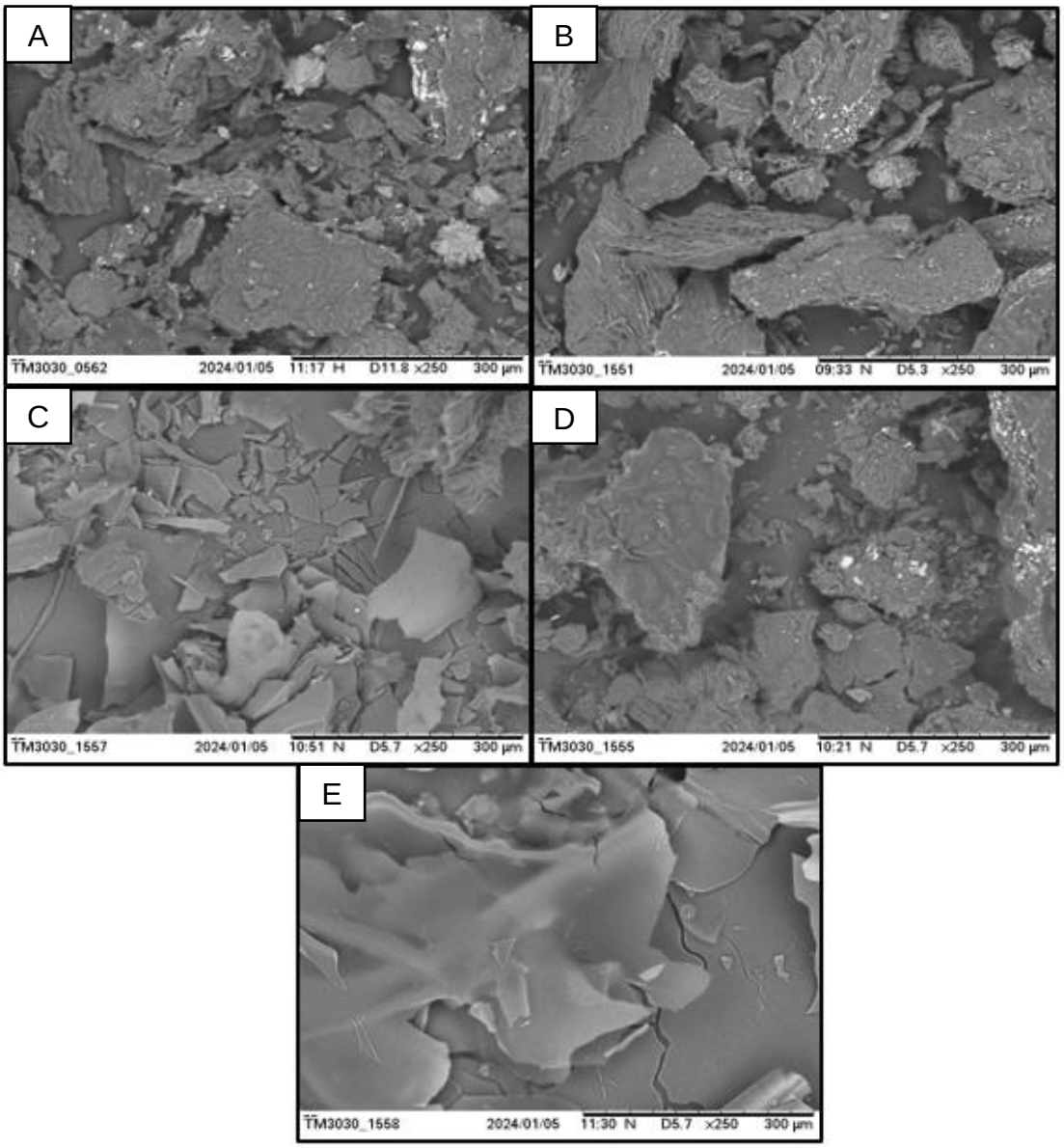
No presente trabalho definiu-se a proporções de 1:4 (amostra: tampão) a fim de promover uma melhor visualização de bandas eletroforéticas. O autor Hames

(1998) enfatizou a necessidade de manter um excesso de detergente aniônico (SDS) em relação à proteína, pois o SDS adicionado em excesso garante que todas as proteínas adquiram carga negativa (NOWAKOWSKI; WOBIG; PETERING, 2014), ocasionando que a proporcionalidade entre massa/carga seja uniforme (BERKELMAN *et al*.,2010).

5.4.3 Análise de MEV e EDS nas amostras de *Pereskia aculeata* Miller

Por meio da técnica de MEV foi possível verificar a morfologia das amostras de PAM, RM 25 ºC, EXP RM 25 ºC, RM 40 ºC e EXP RM 40 ºC (Figura 11), podendo-se concluir que as amostras apresentaram estruturas morfologicamente diferentes. As amostras (A) PAM, (B) RM 25 ºC e (D) RM 40 ºC apresentam partículas maiores, sendo heterogêneas. Em contrapartida, as amostras provenientes da extração ácido-base (C) EXP RM 25 ºC e (E) EXP RM 40 ºC, que foram congeladas e liofilizadas, apresentaram morfologia características desses processos. Pesquisas demonstram que os métodos de congelamento e liofilização proporcionam alterações na morfologia da partícula, gerando estruturas com diferentes tamanhos (DAG, KILERCIOGLU; OZTOP, 2017, SAIKIA; MAHNOT; MAHANTA, 2015).

Figura 11 - Caracterização morfológica (MEV) das amostras de PAM, RM 25 ºC, EXP RM 25 ºC, RM 40ºC e EXP RM 40 ºC



Legenda: Caracterização morfológica das folhas de *Pereskia aculeata* Miller em pó em magnificação de 250x para as amostras (A) PAM, (B) RM 25 ºC, (C) EXP RM 25 ºC, (D) RM 40 ºC e (E) EXP RM 40 ºC.

Fonte: Autor (2024).

A espectroscopia EDS foi utilizada com o objetivo de identificar os principais minerais que compõem as amostras de PAM, RM 25 ºC, EXP RM 25 ºC, RM 40ºC e EXP RM 40 ºC. Os resultados adquiridos (Tabela 8), mostram a presença expressiva dos elementos carbono e oxigênio nas cinco amostras analisadas, pelo fato de ser um

material vegetal constituído majoritariamente por aminoácidos e carboidratos em sua composição.

Além disso, foi observado em todas as amostras os elementos potássio (K) e magnésio (Mg). Sendo que o K é um dos micronutrientes essenciais mais devido à sua função relacionada com a síntese de proteínas. Já o Mg é de fundamental importância para os seres humanos, pois está presente no esqueleto e músculos (YANG *et al*., 2010). No trabalho desenvolvido por Oliveira (2019), também foi relatada a presença de C, O, K e Mg em amostras de PAM, bem como os elementos nitrogênio e cálcio.

O elemento nitrogênio (N) foi quantificado para as amostras RM 25 ºC, EXP RM 25 ºC, RM 40ºC e EXP RM 40 ºC, sendo que as amostras submetidas a extração ácido-base apresentaram um percentual maior desse elemento. Na amostra de PAM não foi observado a presença de N, muito provavelmente devido a interação ou interferência com outros compostos provenientes da matriz vegetal (SIBT-E-ABBAS *et al*., 2022). Evidenciando assim, que a RM para PAM diminuiu os interferentes e, consequentemente, aumentou o percentual proteico do material vegetal.

As amostras EXP RM 25 ºC e EXP RM 40 ºC foram as únicas que apresentaram o elemento sódio (Na) em sua composição. A presença desses elementos justifica-se pelo uso do reagente hidróxido de sódio durante a extração ácido-base.

Tabela 8 - Porcentagem dos minerais presentes nas amostras em pó de *Pereskia aculeata* Miller

Amostras	Elementos Químicos (%)						
	Carbono	Oxigênio	Magnésio	Cloro	Potássio	Sódio	Nitrogênio
Pereskia aculeata Miller	54,839 ± 3,968	38,488 ± 2,483	0,744 ± 0,146	1,645 ± 0,937	4,284 ± 1,360	-	-
Remoção de Mucilagem 25 ºC	40,448 ± 0,337	42,994 ± 0,607	1,181 ± 0,660	-	6,263 ± 0,286	-	8,273 ± 1,051
Remoção de Mucilagem 40 ºC	41,746 ± 0,975	38,301 ± 2,424	1,492 ± 0,763	-	2,507 ± 0,941	-	9,113 ± 2,284
Extrato proteico com remoção de mucilagem 25 ºC	44,098 ± 0,624	42,851 ± 1,832	0,187 ± 0,129	0,894 ± 0,199	0,465 ± 0,221	3,231 ± 1,181	14,923 ± 1,825
Extrato proteico com remoção de mucilagem 40 ºC	43,170 ± 1,037	36,291 ± 1,532	0,117 ± 0,0345	2,060 ± 0,514	0,731 ± 0,268	3,709 ± 0,582	15,955 ± 0,626

Fonte: Autor (2024).

5.5 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO

A forma farmacêutica em gel pode ser considerada uma boa escolha para o desenvolvimento de suplementos alimentares, visto que proporciona uma rápida absorção dos nutrientes pelo organismo. Além disso, ele permite a incorporação de uma proporção maior de ativos, em comparação com cápsulas, viabilizando formulações mais complexas (ABE-MATSUMOTO; SAMPAIO; BASTOS, 2015).

Após encontrar um melhor método extrativo das proteínas de folhas de PAM (EXP RM 40 ºC), buscou-se desenvolver um suplemento alimentar proteico em gel contendo 7,5% de proteínas vegetais. Tal suplemento poderá ser consumido por indivíduos que desejam aumentar o aporte proteico de sua dieta, bem como auxiliará no ganho de massa magra de praticantes de atividades físicas oferecendo boas fontes de aminoácidos para recomposição das fibras musculares (PEREIRA; COSTA; CAVALCANTI, 2021).

Assim, para a formação do gel, foi utilizado a carboximetilcelulose (CMC) que é um gelificante derivado da celulose, sendo um polímero aniônico e facilmente dispersível em água, amplamente utilizada em formulações alimentícias (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Além disso, foi empregado aroma na formulação, pois uma grande parte do sabor de um alimento é influenciado pelo seu poder flavorizante, promovendo aceitabilidade do produto pelo consumidor (HONORATO *et al*, 2013).

Como sistema conservante da formulação, foi aplicado o benzoato de sódio que é eficaz contra bactérias e fungos e o sorbato de potássio que age contra fungos e leveduras. Ambos são conservantes atuantes para prolongar a durabilidade dos alimentos, os protegendo contra a deterioração provocada por microrganismos (LIDON; SILVESTRE, 2007).

Como sistema antioxidante utilizou-se as vitaminas C e E, como forma de aumentar a estabilidade do produto. Além disso, a adição de vitaminas também contribui para a inibição e/ou redução dos efeitos do estresse oxidativo nos indivíduos (LI *et al*., 2013). Endogenamente a vitamina C atua nos tecidos por meio da inibição da oxidação de lipídeos e proteínas, além de atuar sinergicamente com a vitamina E (VONA, 2019).

Assim, diferentes formulações foram desenvolvidas e avaliadas quanto às suas características organolépticas e seus pHs. Na Tabela 9, podemos observar os critérios de escolha para o desenvolvimento de quatro bases de suplementos alimentares em gel.

Tabela 9 - Avaliação das características organolépticas e pH do gel

Fórmulas	Odor	Homogeneidade	Coloração	Aspectos Visuais	pH
F1	Característico de limão e baunilha	Homogêneo	Marrom escuro	Brilhoso e fluido	7,19
F2	Característico de limão e baunilha	Homogêneo	Marrom escuro	Brilhoso e fluido	7,18
F3	Característico de limão e baunilha	Homogêneo	Marrom escuro	Brilhoso e gelificante	7,16
F4*	**Característico de chocolate e baunilha**	**Homogêneo**	**Marrom escuro**	**Brilhoso e gelificante**	**6,7**

***Formulação de escolha para os estudos**

Fonte: Autor (2024).

5.5.1 Estudo de estabilidade acelerada

Durante o estudo de estabilidade acelerada, verificou-se que a cor visual do produto alimentício em gel permaneceu constante em todas as avaliações realizadas (0 a 90 dias), independentemente das três condições estudadas: temperatura ambiente (25 °C ± 2 ºC), geladeira (5 °C ± 2 ºC) e câmara climática (30 °C ± 2 ºC/ 65% UR). A importância deste resultado é significativa, pois pode indicar estabilidade do produto ao longo do tempo e podem ser correlacionados com outras propriedades físico-químicas.

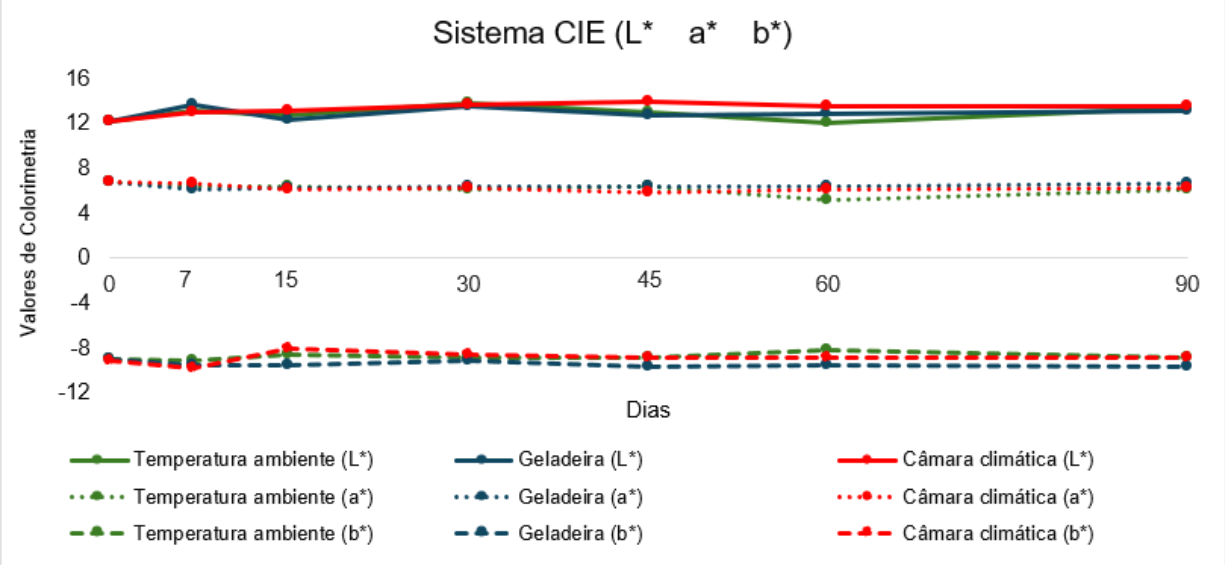
Em função disto e da rapidez e simplicidade de aferição, esta técnica tem sido utilizada como medida indireta de atributos de qualidade em alimentos, como: sabor,

conteúdo de pigmentos e cor (BADIN; QUEVEDO-LEON; IBARZ; RIBOTTA *et al.*, 2021).

No presente estudo além de verificar a cor do gel alimentício de forma visual optou-se por também utilizar o sistema CIE (Figura 12) que define a cor baseado em três elementos: luminosidade ou claridade, tonalidade e saturação ou cromaticidade (CIE, 2023).

Como representado a seguir na Figura 12, o valor de L* que se refere a luminosidade da amostra, não houve diferença significativa (p>0,05) nas três condições analisadas (temperatura ambiente, geladeira e câmara climática) durante todo o estudo de estabilidade de 90 dias. Sugerindo que este parâmetro não foi afetado de maneira significativa durantes o tratamento térmico. O mesmo comportamento de L* foi observado para coordenada cromática a* (-a =verde, +a = vermelho) e b* (azul (-) ao amarelo (+)) não apresentando diferença estatística significativa (p>0,05) em função das condições de tratamentos empregas durante o estudo de estabilidade.

Figura 12- Resultados de colorimetria do estudo estabilidade acelerada.



Legenda: temperatura ambiente (25 °C ± 2 ºC), geladeira (5 °C ± 2 ºC) e câmara climática (30 °C ± 2 ºC/ 65% UR).

Fonte: Autor (2024).

Manter a tonalidade original do produto traz diversos benefícios significativos, pois a cor costuma ser um dos principais aspectos sensoriais que os consumidores

consideram ao julgar a qualidade de um alimento (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2012). Assim, ao preservar a cor original, o produto conserva uma aparência atrativa e apetitosa, podendo aumentar a aceitação do consumidor e a probabilidade de reincidir a compra (SANTOS-ANTONIO *et al.*, 2019).

As mudanças nas tonalidades dos produtos alimentícios podem ser causadas por reações químicas indesejadas, como a oxidação de ingredientes ativos ou a criação de subprodutos através da decomposição. Dessa forma, a manutenção da cor mostra que o alimento está protegido contra esses processos prejudiciais, garantindo sua qualidade e desempenho ao longo do tempo (PANDISELVAM *et al*., 2023).

Com relação ao aspecto visual e a homogeneidade do produto, verificou-se que a formulação se manteve brilhante, gelificante e homogênea do tempo 0 aos 15 dias quando armazenada em temperatura ambiente e apenas no tempo 0 quando na câmara climática. O suplemento alimentar proteico em gel acondicionado em geladeira não se alterou quanto ao aspecto visual e homogeneidade durante todo o estudo de estabilidade. Este resultado é indicativo de uma boa estabilidade inicial do produto quando armazenado nas condições de geladeira e temperatura ambiente.

Percebeu-se separação de fase nos produtos acondicionados em câmara climática e temperatura ambiente após 15 e 30 dias, respectivamente, indicativo de instabilidade e que pode acarretar na deterioração e perda da qualidade ao longo do tempo (SARABI-AGHDAM *et al*., 2021).

Nos tempos 45, 60 e 90 dias, a separação de fase do produto foi mais evidente, ou seja, apresentou-se não homogêneo quando armazenados em temperatura ambiente e câmara climática (Figura 13). Desta forma, para que o produto possa ser armazenado à temperatura ambiente (25 °C ± 2 ºC) ou em temperaturas superiores, será necessário a realização de maiores estudos farmacotécnicos para o aprimoramento das formulações.

Figura 13 - Amostras do gel alimentício nos tempos 0 e 90 dias mantidas em condições de armazenamento diferentes

Legenda: temperatura ambiente (25 °C ± 2 ºC), geladeira (5 °C ± 2 ºC) e câmara climática (30 °C ± 2 ºC/ 65% UR).

Fonte: Autor (2024).

Os resultados do estudo de estabilidade do pH em diferentes condições de armazenamento (Figura 14) revelaram padrões interessantes e importantes para a compreensão da estabilidade do produto ao longo do tempo.

Para a condição de temperatura ambiente, o pH permaneceu constante em 6,7 nos primeiros 15 dias, o que sugere uma estabilidade inicial do produto nessa temperatura. No entanto, a partir de 30 dias, houve um aumento gradual no pH, atingindo valores de até 7,2 nos tempos subsequentes. Este aumento no pH pode indicar uma baixa estabilidade na formulação ao longo do tempo, o que pode afetar sua qualidade e segurança (DAS *et al*., 2019).

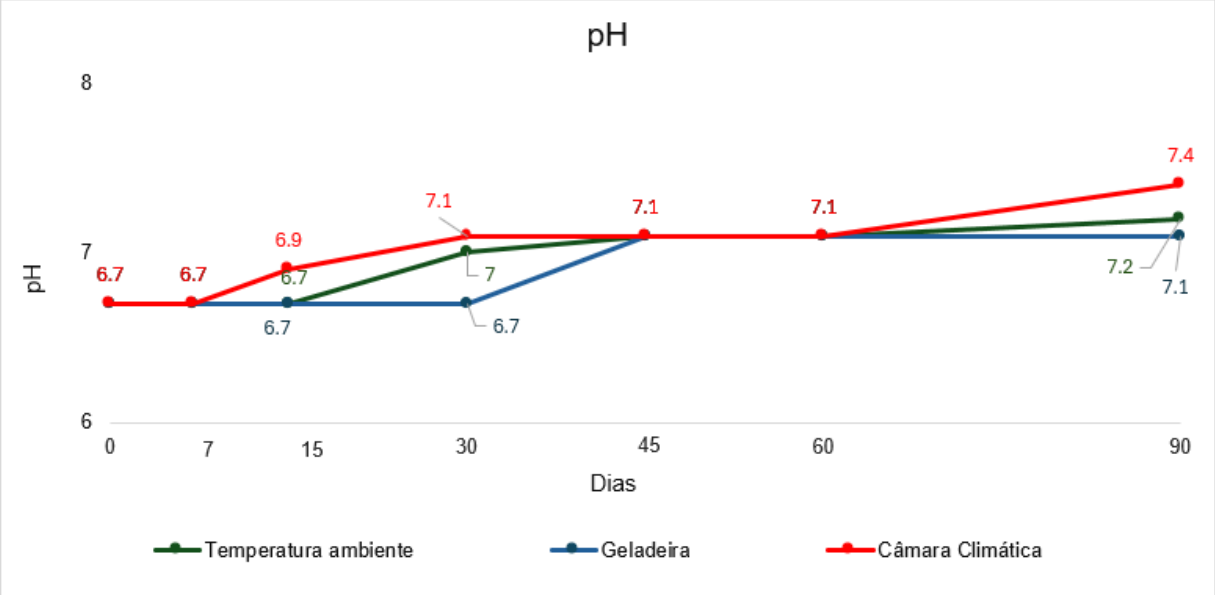
Nas formulações acondicionadas em geladeira (Figura 14), o pH também se manteve estável em torno de 6,7 nos primeiros 30 dias, indicando uma boa estabilidade do produto sob refrigeração. No entanto, a partir de 45 dias, houve um aumento significativo no pH para a faixa de 7,0, o que pode sugerir uma alteração na estabilidade do produto mesmo em condições de refrigeração.

Nas formulações acondicionadas em câmara climática, o pH permaneceu constante em torno de 6,7 até 7 dias, indicando estabilidade inicial do produto. No entanto, a partir 15 dias, houve um aumento gradual no pH, atingindo valores de até 7,4 em dias subsequentes. O aumento progressivo do pH pode ser indicativo de

degradação acelerada do produto sob condições de temperatura mais elevadas (WEN-QIONG *et al*., 2021).

Esses resultados têm implicações importantes para a estabilidade e a vida útil do produto em diferentes condições de armazenamento. O aumento no pH ao longo do tempo pode estar associado a reações químicas que ocorrem dentro do produto, como a atividade enzimática e/ou fermentação microbiológica. Além disso, essas mudanças no pH podem afetar a segurança e a aceitabilidade do produto pelos consumidores (ARSLAN *et al*., 2015).

Figura 14 - Valores dos pHs obtidos durante o estudo de estabilidade acelerada para o suplemento proteico em gel



Legenda: temperatura ambiente (25 °C ± 2 ºC), geladeira (5 °C ± 2 ºC) e câmara climática (30 °C ± 2 ºC/ 65% UR).

Fonte: Autor (2024).

A análise da viscosidade aparente do gel armazenado em temperatura ambiente, foi classificada inicialmente como média (7 dias), indicando uma consistência aceitável do produto. No entanto, nos tempos subsequentes analisados, a viscosidade aumentou para níveis considerados altos. Esse aumento pode ser indicativo de uma alteração na estrutura do gel, possivelmente devido à formação de ligações mais fortes entre as moléculas do produto ou à perda de água (HU *et al.*, 2020).

A formulação acondicionada em geladeira apresentou viscosidade aparente estável ao longo dos 90 dias de estudo, permanecendo na categoria média. Esse resultado sugere uma boa estabilidade do produto sob refrigeração, com pouca ou nenhuma mudança na estrutura do gel ao longo do tempo. A manutenção da viscosidade média indica que o produto foi capaz de manter sua textura, o que é um resultado positivo para a aceitação do consumidor (CHU *et al*., 2019).

Por outro lado, a formulação armazenada em câmara climática, apresentou viscosidade média apenas no tempo inicial (0 dias). Nos demais tempos analisados, houve o aumentou da viscosidade para níveis considerados altos. Tal alteração pode ter sido devido a perda de umidade do produto, apesar de ter sido empregado um sistema de embalagem hermética. Essa elevação significativa da viscosidade também pode ser atribuída a formação de redes poliméricas, levando a uma textura mais espessa e viscosa (HUSSAIN *et al.*, 2020).

A partir desses resultados, se infere que a temperatura desempenha um papel crucial na manutenção da viscosidade do produto. Os produtos que foram armazenador em temperatura ambiente apresentaram mudanças na estrutura do gel ao longo do tempo, resultando em um aumento na viscosidade. Por outro lado, a refrigeração pode ajudar a manter a estrutura do gel mais estável e a viscosidade do produto mais consistente (KIM; YOO, 2015).

Quanto ao odor do suplemento alimentar proteico em gel, verificou-se que nos primeiros 15 dias, tanto à temperatura ambiente quanto em câmara climática, o odor foi característico das essências de chocolate e baunilha, que foram empregadas nas fórmulas. Isso condiz com o esperado, já que essas essências foram adicionadas ao produto e devem predominar no aroma. Entretanto, após 30 dias verificou-se alteração no aroma, passando a apresentar um cheiro característico de extrato. O aparecimento de um odor diferente pode ser atribuído às reações químicas que ocorrem dentro do produto, resultando na formação de novos compostos voláteis (DIEZ-SIMON; MUMM; HALL, 2019).

Por outro lado, quando armazenado em geladeira, o odor do suplemento alimentar proteico se manteve constante ao longo de todo o período (0 a 90 dias), permanecendo característico das essências de chocolate e baunilha. Isso sugere uma boa estabilidade do produto sob refrigeração, com pouca ou nenhuma alteração nos componentes responsáveis pelo aroma.

Esses resultados destacam o impacto da temperatura sob os flavorizantes adicionados à fórmula, indicando que temperaturas superiores a ambiente podem favorecer a degradação e/ou alteração desses componentes. Por outro lado, a refrigeração pode ajudar a retardar ou inibir esses processos, mantendo o cheiro característico do produto ao longo do tempo (LEFEBVRE; BISWAS, 2019).

Na avaliação do teor de nitrogênio total para as três amostras, verificou-se que no tempo 0 a quantificação de proteínas foi de cerca de 7,1% ± 0,04%. Após 90 dias, nova quantificação foi realizada tendo sido verificado a permanência desse valor. Diante desse resultado, foi possível verificar que não houve perda de nitrogênio por formação de substâncias químicas voláteis. Contudo, não é possível afirmar o grau de degradação proteica e aminoacídica das amostras.

Dessa forma, visto que não alteração no teor de nitrogênio total da amostra ao longo do tempo de armazenamento, sugere-se que a quantidade de proteína na amostra também permaneceu constante. Entretanto, um estudo aplicando técnicas analíticas mais específicas (dissolução, HMF, ensaios de pureza e doseamento) poderiam trazer maiores informações quanto ao grau de degradação do produto.

Diante dos resultados obtidos durante o estudo de estabilidade, avaliando as características organolépticas, pH e nitrogênio total do gel alimentício, pode-se inferir que o suplemento alimentar proteico em gel quando armazenado em geladeira apresentou melhores resultados em comparação com as demais condições analisadas, mas para comercialização deverá ser realizado mais testes durante a estabilidade.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que as folhas de PAM são ricas em proteínas, destacando-se como um aporte proteico à dieta alimentar, além de apresentar um enorme potencial para aplicações nas indústrias alimentícias. Por meio de técnicas de extração, buscou-se aumentar ainda mais o teor proteico dessas folhas. Entre os métodos testados, a RM seguida da extração ácido-base (EXP RM 40 °C) obteve resultados muito satisfatórios, com um aumento de 220,83% no teor proteico das folhas de PAM. Este aumento significativo possibilitou o desenvolvimento de um inovador suplemento alimentar proteico em gel, contendo 7,5% de proteínas. O suplemento foi submetido a testes de estabilidade acelerada e demonstrou-se manter sua estabilidade quando armazenado em geladeira durante todo o período de estudo (90 dias). Além disso, em contraste com opções convencionais baseadas em proteínas de origem animal ou soja, o uso das folhas de PAM representa uma fonte alternativa e sustentável. Tornando possível atender as crescentes demandas por produtos alimentares inovadores e de alta qualidade, aproveitando os benefícios nutricionais únicos das folhas de PAM e contribuindo para uma oferta alimentar mais diversificada.

REFERÊNCIAS

ABDELMOHSEN, U. R.; SAYED, A. M.; ELMAIDOMY, A. H. Natural Products' Extraction and Isolation-Between Conventional and Modern Techniques. **Frontiers in Natural Products**, v. 1, 19 maio 2022.

ABDULLAEV, A.; DJUMAEV, B; KARIMOV, Kh Kh. Influence of UV radiation on the photosynthesis and photosynthetic carbon metabolism in high mountainous plants. **BMC Plant Biology**, vol. 5, no. S1, p. S1, 31 May 2005.

ABE-MATSUMOTO, Lucile Tiemi; SAMPAIO, Geni Rodrigues; BASTOS, Deborah H. M. Suplementos vitamínicos e/ou minerais: regulamentação, consumo e implicações à saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 31, no. 7, p. 1371–1380, Jul. 2015.

ACHILLI, C.; CIANA, A.; MINETTI, G. Oxidation of cysteine-rich proteins during gel electrophoresis. **Journal of Biological Methods**, v. 5, n. 4, p. e104, 5 dez. 2018.

ALBUQUERQUE, M. G. P. T.; SABAA-SRUR, A. U. O.; FREIMAN, L. O. Composição centesimal e escore de aminoácidos em três espécies de Ora-pro-nobis (Pereskia aculeata Mill. P. bleu de Candolle e P. pereskia (L) Karsten). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 7-12, 1991.

ALMEIDA F. J., CAMBRAIA, J. (1974). Estudo do valor nutritivo do "ora-pro-nobis" (Pereskia aculeata Mill.) **Revista Ceres**, v. 21, n. 114, p. 105-111, 1974

ALMEIDA, M.E.F. et al. Caracterização química das hortaliças não convencionais conhecidas como ora-pro-nobis. Bioscience Journal, Uberlândia, v. 30, p. 431-439, n. 03, jun. 2014.

ALMEIDA, Thiago Corrêa de et al. **Metagenômica de um Ecossistema Estromatolitogênico (Lagoa Salgada, São João da Barra, RJ, Brasil)**. 2022. Tese de Doutorado

ALUKO, Rotimi E. Antihypertensive Peptides from Food Proteins. **Annual Review of Food Science and Technology**, vol. 6, no. 1, p. 235–262, 10 Apr. 2015.

AMARAL, T. N. et al. Blends of Pereskia aculeata Miller mucilage, guar gum, and gum Arabic added to fermented milk beverages. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 331-342, 2018.

ANVISA. Portaria nº 27 - Informação Nutricional complementar. Agência Nacional de 126 Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 1998.

ANVISA. RDC 269, 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Brasília, DF. 2005.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. [Aprova o Regulamento técnico para produtos de cereais,

amidos, farinhas e farelos]. Diário Oficial da União, 23 set. 2005b. Seção1, p.368-369.

ANVISA - Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para determinação de prazo de validade de alimentos. GUIA N. 16/2018 – Versão 1, de outubro de 2018.

ARSLAN, S. et al. Determination of Microbiological and Chemical Properties of Probiotic Boza and Its Consumer Acceptability. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 56–64, 2 jan. 2015.

ASCHEMANN-WITZEL, J. et al. Plant-based food and protein trend from a business perspective: markets, consumers, and the challenges and opportunities in the future. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 18, p. 3119–3128, 11 out. 2021.

ATKINS, P.; PAULA, J. **Elements of Physica Chemistry**. 5. ed. New York: W. H. Freeman and Company New York, v. 3, 2004. 279 p.

BADIN, E. E.; QUEVEDO-LEON, R.; IBARZ, A.; RIBOTTA, P. D. *et al.* Kinetic Modeling of Thermal Degradation of Color, Lycopene, and Ascorbic Acid in Crushed Tomato. **Food and Bioprocess Technology**, 14, n. 2, p. 324-333, 2021.

BARBARY, O. M. et al. Extraction, composition and physicochemical properties of flaxseed mucilage. **J. Adv. Agric. Res**, v. 14, n. 3, p. 605-621, 2009.

BERKELMAN, T. et al. Mini-PROTEAN® TGX™ precast gel for SDS-PAGE with improved stability: comparison with standard Laemmli gels. **BioTechniques**, v. 48, n. 2, p. 156-157, 2010.

BOYE, J.; ZARE, F.; PLETCH, A. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 414–431, mar. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº318, de 06 de novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências.** Brasília: Diário Oficial da União, 2019a.

BUCAR, F.; WUBE, A.; SCHMID, M. Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 4, p. 525, 2013.

CARVALHO, E.G.; SOARES, C.P.; BLAU, L.; MENEGON, R.F.; JOAQUIM, W.M. Wound healing properties and mucilage content of Pereskia aculeata from different substrates. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 677-682, 2014.

CARVALHO, Laynne Araujo et al. Plantas alimentícias não convencionais e seus principais compostos bioativos. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 3, p. 11579-11591, 2023.

CONCEIÇÃO, Márcia C. **Otimização do processo de extração e caracterização da mucilagem de ora-pro-nobis (Pereskia aculeata Miller). 2013**. 2013. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

COSTA, F. R. T. da. Microscopia Eletrônica de Varredura: potencialidades e aplicações. 2016. 51 f. TCC (Graduação) - Curso de Química Industrial, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

CHITTAPALO, T.; NOOMHORM, A. Ultrasonic assisted alkali extraction of protein from defatted rice bran and properties of the protein concentrates. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 9, p. 1843–1849, set. 2009.

CHU, L. et al. Effect of Smilax china L. starch on the gel properties and interactions of calcium sulfate-induced soy protein isolate gel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 127–132, ago. 2019.

CIE. **COMMISSION INTERNATIONAL DE L'ECLAIRAGE - Disponível em: < http://www.cie.co.at/ . Acesso 16 maio 2023**. 2023. Disponível em: https://cie.co.at/node/2/cie-s-objectives.

CRUZ-SOLIS, I. et al. Alkaline Extraction–Isoelectric Precipitation of Plant Proteins. In: **Green Protein Processing Technologies from Plants**. Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 1–29.

DAG, D.; KILERCIOGLU, M.; OZTOP, M. H. Physical and chemical characteristics of encapsulated goldenberry (Physalis peruviana L.) juice powder. **LWT - Food Science and Technology**, [*s.l*], v. 83, n. Supplement C, p. 86–94, 15 set. 2017.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de Alimentos de Fennema. Trad. Brandelli et al. Ed 4 . Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p

DA ROCHA, L.P.B.; ALVES, J.V.O.; AGUIAR, I.F.S.; SILVA. F.H.; SILVA. R.L.; ARRUDA, G.L.; FILHO, E.J.S.; BARBOSA, B.V.D.R.; AMORIM, L.C.; SILVA, P.M.; SILVA, M.V. Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. Research, Society and Development, v. 10, n. 10, p. 82, 2021.

DAS, M. et al. Influence of extraction parameters and stability of betacyanins extracted from red amaranth during storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 643–653, 4 fev. 2019.

DA SILVA, Marco Antonio; DAMIANI, Adriani Paganini. Uso de planta alimentícia não convencional (PANC) na gastronomia e suas propriedades nutricionais: Ora-pro-nóbis (Pereskia aculeata Mill.). **Inova Saúde**, v. 12, n. 2, p. 135-147, 2022.

DEDAVID, B. A.; GOMES, Carmem Isse; MACHADO, Giovanna. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. EdiPUCRS, 2007.

DELAVI, D. G. G.; Defloculação de suspensões aquosas de argila e sua correlação com caracterizações químicas e de superfície. Dissertação de mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis – SC, 2011.

DE FREITAS, P. H. S. et al. Extratos glicólicos de “ora-pro-nobis” (Pereskia aculeata Miller): Avaliação do teor de compostos fenólicos e do potencial antioxidante. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, p. 1748-1760, 2021.

DESIMONE, M.; HENKE, A.; WAGNER, E. Oxidative Stress Induces Partial Degradation of the Large Subunit of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Isolated Chloroplasts of Barley. **Plant Physiology**, vol. 111, no. 3, p. 789–796, 1 Jul. 1996.

DIEZ-SIMON, C.; MUMM, R.; HALL, R. D. Mass spectrometry-based metabolomics of volatiles as a new tool for understanding aroma and flavour chemistry in processed food products. **Metabolomics**, v. 15, n. 3, p. 41, 12 mar. 2019.

EGEA, M. B.; P.G. Bioactive Compounds of Barbados Gooseberry (Pereskia aculeata Mill.). **Bioactive Compounds in Underutilized Vegetables and Legumes**, p. 225-237, 2021.

FABRE, Jean-François et al. Ultrasonication as a highly efficient method of flaxseed mucilage extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 354-360, 2015.

FAN, T. Y.; SOSULSKI, F. W. Dispersibility and Isolation of Proteins from Legume Flours. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 7, n. 4, p. 256–259, out. 1974.

FARFAN, J. A. Alimentação alternativa: análise crítica de uma proposta de intervenção nutricional. Caderno de Saúde Pública, v. 14, n. 1, p. 205-212, 1998.

FASOLIN, Luiz H. et al. Emergent food proteins–Towards sustainability, health and innovation. **Food research international**, v. 125, p. 108586, 2019.

FERRER-ERES, M. A. et al. Archaeopolymetallurgical study of materials from an Iberian culture site in Spain by scanning electron microscopy with X-ray microanalysis, chemometrics and image analysis. **Microchemical Journal**, v. 95, n. 2, p. 298–305, jul. 2010.

FONSECA, Elias Pinheiro. Métodos de extração de proteínas em leguminosas. 2019.

FOOD CONNECTION (2023). Plant-based: Crescimento de demanda e futuro promisor. Acesso em 14 de julho, 2023, em

https://www.foodconnection.com.br/ingredientes/plant-based-crescimento-de-demanda-e-futuro-promissor.

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

Gerhardt Analytical Methods, [s.d.]**.** Disponível em: https://www.gerhardt.de/en/know-how/analytical-methods/kjeldahl-method/. Acesso em: 26 de março de 2023.

GIRÃO, L. V. C. et al. Avaliação da composição bromatológica de ora-pro-nóbis. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 21, n. 2, jul. 2003.

GONSALVES, A. DE A. et al. Contextualizando reações ácido-base de acordo com a teoria protônica de Brönsted-Lowry usando comprimidos de propranolol e nimesulida. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1236–1241, 2013.

GONÇALVES, J. P. Z. et al. Quantificação de proteínas e análise de cinzas encontradas nas folhas e caule da ora-pro-nóbis (Pereskia aculeata Miller). XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, SC, 2014.
GOYCOOLEA, F.; CÁRDENAS, A. Pectins from opuntia spp.: a short review. Journal of the Professional Association for Cactus Development, v. 5, p. 17–29, 2004

HAMES, B. David (Ed.). **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. OUP Oxford, 1998.

HAYES, M. Measuring Protein Content in Food: An Overview of Methods. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1340, 23 set. 2020.

HERREMAN, L. et al. Comprehensive overview of the quality of plant- And animal-sourced proteins based on the digestible indispensable amino acid score. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 10, p. 5379–5391, 25 out. 2020.

HONORATO, T.C. et al. Aditivos Alimentares: Aplicações e Toxicologia. Revista Verde, Mossoró, v. 8, n. 5, p.01 -11, 2013.

HOU, Y. et al. Extraction and Purification of a Lectin from Red Kidney Bean and Preliminary Immune Function Studies of the Lectin and Four Chinese Herbal Polysaccharides. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1–9, 2010.

HOU, Y.; YIN, Y.; WU, G. Dietary essentiality of “nutritionally non-essential amino acids” for animals and humans. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 8, p. 997–1007, 2 ago. 2015.

HOU, Y.; WU, G. Nutritionally Essential Amino Acids. **Advances in Nutrition**, v. 9, n. 6, p. 849–851, nov. 2018.

HORWITZ, W.; LATIMER JUNIOR, G. W. Official methods of analysis of AOAC International. 18. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2011.

HU, W.-X. et al. Effect of the addition of modified starch on gelatinization and gelation properties of rice flour. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 26–35, jun. 2020.

HUSSAIN, S. Z. et al. Visco-thermal and structural characterization of water chestnut flour. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 8, p. 2949–2959, 27 ago. 2020.

Instituto Adolfo Luttz. (2008). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos, (4a ed).

JIN, J.; OHANENYE, I. C.; UDENIGWE, C. C. Buckwheat proteins: functionality, safety, bioactivity, and prospects as alternative plant-based proteins in the food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 7, p. 1752–1764, 12 mar. 2022.

JUSTINO, Heloisa de Fátima Mendes; SANTOS, Fabio Ribeiro Dos; JUNIOR, Bruno Ricardo De Castro Leite. PROTEÍNAS DE INSETOS: FONTE DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS. 3 Nov. 2021. **Anais do I Congresso Brasileiro On-line de Biologia de Insetos** [...]. [*S. l.*]: Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente, 3 Nov. 2021.

KALININA, E. G.; PIKALOVA, E. Y. New trends in the development of electrophoretic deposition method in the solid oxide fuel cell technology: theoretical approaches, experimental solutions and development prospects. **Russian Chemical Reviews**, v. 88, n. 12, p. 1179–1219, 1 dez. 2019.

KIM, S.; YOO, B. Viscosity of dysphagia-oriented cold-thickened beverages: effect of setting time at refrigeration temperature. **International Journal of Language & Communication Disorders**, v. 50, n. 3, p. 397–402, 3 abr. 2015.

ROTZ, Liliana et al. NITROGEN/PROTEIN DETERMINATION IN FISH MEAL BY FLASH COMBUSTION DUMAS METHOD IN COMPARISON WITH KJELDAHL DIGESTION METHOD. KRUGER, N. J. The Bradford Method For Protei Quantitation. In: [s.l: s.n.]. p. 17–24.

KUMAR, Sruthi et al. Gelling properties of black soldier fly (Hermetia illucens) larvae protein after ultrasound treatment. **Food Chemistry**, v. 386, p. 132826, 2022.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

LAMSAL, Buddhi et al. Applications of insect-derived protein ingredients in food and feed industry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 96, n. 2, p. 105-123, 2019.

LANGYAN, S. et al. Sustaining Protein Nutrition Through Plant-Based Foods.

Frontiers in Nutrition, v. 8, 18 jan. 2022.

LATORRACA, João Vicente de Figueiredo et al. Potencialidade medicinal e alimentícia da ora-pro-nobis (*Pereskia acuelata*). **Tópicos especiais em estudos agroecológicos na região sul da bahia**, v. 1, n. 1, p. 157-173, 2021.

LEFEBVRE, S.; BISWAS, D. The influence of ambient scent temperature on food consumption behavior. **Journal of Experimental Psychology: Applied**, v. 25, n. 4, p. 753–764, dez. 2019.

LI, Y.et al. Serum and dietary antioxidant status is associated with lower prevalence of the metabolic syndrome in a study in Shanghai, China. Asia Pac J Clin Nutr., Shanghai, v. 22, n. 1, p. 60-68, set. 2013.

LIMA JUNIOR FA, CONCEIÇÃO.*et al*.Response surface methodology for optimization of the mucilage extraction process from Pereskia aculeata Miller. Food Hydrocoll. 33(1):38–47. 2013

LINDON, F.; SILVESTRE, M. M. Indústrias Alimentares: aditivos e tecnologia. 1º ed. São Paulo: Escolar. 2007, 232 p

LIRA, Michelle Monteiro *et al*. Selected plants producing mucilage: overview, composition, and their potential as functional ingredients in the development of plant-based foods. **Food Research International**, p. 112822, 2023.

LISE, C. C. et al. Alternative protein from Pereskia aculeata Miller leaf mucilage: technological potential as an emulsifier and fat replacement in processed mortadella meat. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 4, p. 851–863, 10 abr. 2021.

LIU, X., HUANG, L., RENSING, C., YE, J., NEALSON, K. Syntrophic interspecies electron transfer drives carbon fixation and growth by Rhodopseudomonas palustris under dark, anoxic conditions. Science Advances. v.7,(27). 2021.

LUO, Shen; ISHIDA, Hiroyuki; MAKINO, Amane; MAE, Tadahiko. Fe2+-catalyzed Site-specific Cleavage of the Large Subunit of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase Close to the Active Site. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, no. 14, p. 12382–12387, Apr. 2002.

LUXBACHER, T. The zeta guide: principles of the streaming potential technique. 1. ed. Anton Paar GmgH, 2014. 123p.

MACIEL, Vinicius BV *et al*. Iron-rich chitosan-pectin colloidal microparticles laden with ora-pro-nobis (Pereskia aculeata Miller) extract. **Food Hydrocolloids**, v. 98, p. 105313, 2020.

MÆHRE, H. et al. Protein Determination—Method Matters. **Foods**, v. 7, n. 1, p. 5, 1 jan. 2018.

MALVERN. Zetasizer Nano Series User Manual. Malvern Instruments Ltd. Set. 2012. 270p.

MALVERN INSTRUMENTS (2005). **Pharmaceutical Formulations and The Importance of Zeta Potential to Pharmaceutical Formulations**. Disponível em: <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1234>.

MARTINEVSKI, C. S. et al. UTILIZAÇÃO DE BERTALHA (ANREDERA CORDIFOLIA (TEN.) Steenis) E ORA-PRO-NOBIS (PERESKIA ACULEATA MILL.) NA ELABORAÇÃO DE PÃES. **Brazilian Journal of Food & Nutrition/Alimentos e Nutrição**, v. 24, n. 3, 2013.

MATOS, Francielle Miranda de; CASTRO, Ruann Janser Soares de. Insetos comestíveis como potenciais fontes de proteínas para obtenção de peptídeos bioativos. **Brazilian Journal of Food Technology**, vol. 24, 2021.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, 1996.

MILIÃO, G. L. et al. Unconventional food plants: Nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v. 5, p. 100124, jun. 2022.

MONTEIRO, M. K. S. Obtenção e caracterização de bionanocompósitos de fécula de mandioca e argila bentonita organofilizada por mistura de tensoativos. 2017. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

MORAIS, L. C. DE et al. Protein recovery from Barbados gooseberry (*Pereskia aculeata* Miller) leaves by salting out and isoelectric precipitation. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. May, p. 419–430, 2019.

MUÑOZ-HUERTA, R. et al. A Review of Methods for Sensing the Nitrogen Status in Plants: Advantages, Disadvantages and Recent Advances. **Sensors**, v. 13, n. 8, p. 10823–10843, 16 ago. 2013.

NEVES, Isabelle Cristina Oliveira et al. Effect of carrier oil on α-tocopherol encapsulation in ora-pro-nobis (Pereskia aculeata Miller) mucilage-whey protein isolate microparticles. **Food hydrocolloids**, v. 105, p. 105716, 2020.

NOVÁK, P.; HAVLÍČEK, V. Protein Extraction and Precipitation. In: **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 51–62.

NOWAKOWSKI, A. B.; WOBIG, W. J.; PETERING, D. H. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. **Metallomics**, v. 6, n. 5, p. 1068–1078, 2014.

O'LEARY, B. M. *et al.* Rubisco lysine acetylation occurs at very low stoichiometry in mature Arabidopsis leaves: implications for regulation of enzyme function. **Biochemical Journal**, v. 477, n. 19, p. 3885–3896, 16 out. 2020.

OLIVEIRA, J. L. de. Emprego da folha e de material extraído da folha de ora-pro-nóbis (Pereskia aculeata Miller) na remoção de íons Cd2+ e Pb2+ de soluções aquosas. 2019

PANDISELVAM, R. et al. The influence of non-thermal technologies on color pigments of food materials: An updated review. **Current Research in Food Science**, v. 6, p. 100529, 2023.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A.-J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, 6, n. 1, p. 36-60, 2012.

PATHAK, P. O. et al. Cholesterol anchored arabinogalactan for asialoglycoprotein receptor targeting: synthesis, characterization, and proof of concept of hepatospecific delivery. **Carbohydrate research**, v. 408, p. 33-43, 2015.

PEREIRA, O.L.; BARRETO, R.W.; CAVALLAZZI, J.R.P.; BRAUN, U. The mycobiota of the cactus weed Pereskia aculeata in Brazil, with comments on the life-cycle of Uromyces pereskiae. Fungal Diversity, v. 25, p. 127-140, 2007.

PEREIRA, James Siqueira. Caracterização in silico da ribulose-1, 5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) da Alkalinema sp. CACIAM 70d (cianobactéria). 2017.

PEREIRA, J. M. F.; COSTA, M. F. D.; CAVALCANTI, J. A. Estilo de vida saudável e busca de opinião no consumo de suplementos alimentares. Revista de Administração da UFSM, v. 14, n. 4, p. 750-768, 2021.

PICCINI, C. et al. Utilização de ora-pro-nóbis (Pereskia aculeata Miller) em alimentos: Revisão da literatura científica e pesquisa exploratória. 2021.

PINTO, Roger Urgel et al. Desenvolvimento de método para remoção de água, sal e sedimento de petróleos do pré-sal empregando radiação micro-ondas. 2019.

POMPEU, D. G. et al. Fatores antinutricionais e digestibilidade “in vitro” de folhas de Pereskia aculeata Miller. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 1, 23 jun. 2014.

PULIGUNDLA, Pradeep; LIM, Seokwon. A review of extraction techniques and food applications of flaxseed mucilage. **Foods**, v. 11, n. 12, p. 1677, 2022.

QUEIROZ, C. Cultivo e composição química de Ora-pro-nóbis (Pereskia aculeata Mill.) sob déficit hídrico intermitente no solo. **Aleph**, p. 165, 2012.

QUEIROZ, C. R. A. DOS A. et al. Ora-pro-nóbis em uso alimentar humano: percepção sensorial. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 3, p. 01, 20 jul. 2015.

QUEIROZ, L. S. et al. Physical and Oxidative Stability of Low-Fat Fish Oil-in-Water Emulsions Stabilized with Black Soldier Fly (Hermetia illucens) Larvae Protein Concentrate. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 2977, 3 dez. 2021.

RAMOS-PAYÁN, M. et al. Recent trends in capillary electrophoresis for complex samples analysis: A review. **Electrophoresis**, v. 39, n. 1, p. 111–125, jan. 2018.

ROCHA, D.R. da C. et al. Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (Pereskia aculeata Miller) desidratado. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 4, p. 459-465, 2009.

RODRIGUES, A. M. T. Estudo da correlação entre curvas de fluxo em defloculação e condutividade elétrica do meio. 2018.

RODRIGUES, S. et al. Caracterização química e nutricional da farinha de ora-pro-nóbis (Pereskia aculeata Mill.). p. 1–14, 2015.

ROSA, C. I. L. F. et al. Pós-colheita e comercialização. **Hortaliças-fruto. EDUEM**, p. 489-526, 2018.

ROSA, M. de F. et al. Processo agroindustrial: obtenção de pó de casca de coco verde. 2001.

SÁEZ-PLAZA, P. et al. An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part II. Sample Preparation, Working Scale, Instrumental Finish, and Quality Control. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 224–272, 2 out. 2013.

SAHA, U. K.; SONON, L.; KISSEL, D. E. Comparison of Conductimetric and Colorimetric Methods with Distillation–Titration Method of Analyzing Ammonium

SANTOS, AMANDA MARTINS *et al*. Elaboração e caracterização físico-química e de compostos fenólicos de farinha de ora-pro-nóbis (Pereskia aculeata). 2023

Nitrogen in Total Kjeldahl Digests. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 43, n. 18, p. 2323–2341, out. 2012.

SAIKIA, S.; MAHNOT, N. K.; MAHANTA, C. L. Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. **Food Chemistry**, India, v. 171, p. 144–152, 15 mar. 2015.

SANTOS-ANTONIO, G. et al. Efectos del etiquetado nutricional frontal de alimentos y bebidas: sinopsis de revisiones sistemáticas. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 43, p. 1–8, 2019.

SANTOS, Pedro Paullo Alves dos et al. 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. e2020129, 2022.

SARABI-AGHDAM, V. et al. Phase behavior and rheological properties of basil seed gum/whey protein isolate mixed dispersions and gels. **Food Science & Nutrition**, v. 9, n. 4, p. 1881–1895, 18 abr. 2021.

SARTOR, C. F. P.; MAZIA, R. S. Influência do Tipo de Solo Usado para o Cultivo de Pereskia aculeataSobre Propriedade Protéica. **Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, 2012.

SATO, R. et al. Nutritional improvement of pasta with Pereskia aculeata Miller: a non-conventional edible vegetable. **Food Science and Technology**, v. 39, n. suppl 1, p. 28–34, jun. 2019.

SCIMECA, M. et al. Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. **European Journal of Histochemistry**, 15 mar. 2018.

Schiel, L., Wind, C., Krueger, S., Braun, P. G., & Koethe, M. (2022). Applicability of analytical methods for determining the composition of edible insects in German Food Control. Journal of Food Composition and Analysis, 112.

SEDIGHEH, Hatami Gigloo; MORTAZAVIAN, Mahdi; NOROUZIAN, Dariush; ATYABI, Mohammad; AKBARZADEH, Azim; HASANPOOR, Keyvan; GHORBANI, Masoud. Oxidative stress and leaf senescence. **BMC Research Notes**, vol. 4, no. 1, p. 477, 2 Dec. 2011.

SHARMA, V.; BHARDWAJ, A. Scanning electron microscopy (SEM) in food quality evaluation. In: **Evaluation Technologies for Food Quality**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 743–761.

SIBAJA-HERNÁNDEZ, Roberto et al. Physicochemical, shear flow behaviour and emulsifying properties of Acacia cochliacantha and Acacia farnesiana gums. **Industrial crops and Products**, v. 67, p. 161-168, 2015.

SILVA, F. L. et al. Efeito de campo magnético sobre as características físico-químicas de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) e seu desempenho na ultrafiltração. 2015.

SILVA, E. A. J. da et al. Tempo de secagem, época da coleta e ação antifúngica do óleo essencial das folhas de goiabeira. 2015.

SILVA, T. E. DA et al. Evaluation of digestion procedures in Kjeldahl method to quantify total nitrogen in analyses applied to animal nutrition. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 38, n. 1, p. 45, 1 jan. 2016.

SILVA, A. P. G. DA et al. Ripe Ora-pro-nobis (Pereskia aculeata miller) fruits express high contents of bioactive compounds and antioxidant capacity. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 3, 10 jul. 2018.

SILVA, L. W. Potencial tecnológico da folha da Pereskia aculeata Miller (ora-pro-nóbis): Uma Revisão. 2019. **Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis**, 2019.

SILVA, S. H. et al. Extraction processes and characterization of the mucilage obtained from green fruits of Pereskia aculeata Miller. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111716, nov. 2019.

SIM, S. Y. J. et al. Plant Proteins for Future Foods: A Roadmap. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1967, 23 ago. 2021.

SOUZA, L. et al. Pereskia aculeata Muller (Cactaceae) Leaves: Chemical Composition and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1478, 3 set. 2016.

Stone, A. K., Tanaka, T., & Nickerson, M. T. (2019). Protein quality and physicochemical properties of commercial cricket and mealworm powders. Journal of Food Science and Technology, 56(7), 3355–3363.

SUN, X. et al. Identification and Characterization of the Seed Storage Proteins and Related Genes of Cannabis sativa L. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 7 jun. 2021.

SWAMI, Handa Sukhdev et al. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. **Trieste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology**, v. 200, p. 266, 2008.

SYAIFUDIN, Mukh. Gel electrophoresis: The applications and its improvement with nuclear technology. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing LLC, 2021. p. 050008.

TARLEY, C. R. T.; ARRUDA, M. A. Z. Biosorption of heavy metals using rice miling byproducts.Characterisation and application for removal of metals from aqueous effluents.**Chemosphere**, v. 54, n. 7, p. 987-995, 2004.

TAKEITI, C. Y. et al. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (Pereskia aculeata Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. sup1, p. 148–160, 13 jan. 2009.

TELES, V. C.; ANDREANI, L.; VALADARES, L. F. Uso de microscopia de luz e eletrônica como técnicas de análise morfológica. 2017.

TORRES, Talyta Mayara Silva et al. Protein valorization from ora-pro-nobis leaves by compressed fluids biorefinery extractions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 76, p. 102926, 2022.

UDENIGWE, Chibuike C.; OKOLIE, Chigozie L.; QIAN, Huifang; OHANENYE, Ikenna C.; AGYEI, Dominic; ALUKO, Rotimi E. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase as a sustainable and promising plant source of bioactive peptides for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 69, p. 74–82, Nov. 2017.

Vanqa, N., Mshayisa, V. V., & Basitere, M. (2022). Proximate, Physicochemical, TechnoFunctional and Antioxidant Properties of Three Edible Insect (Gonimbrasia belina, Hermetia illucens and Macrotermes subhylanus) Flours. Foods, 11(7).

VARGAS, A. G. de et al. **Influência da sazonalidade na composição química e**

nas atividades antioxidante e antimicrobiana das folhas de ora-pro-nobis (Pereskia aculeata Miller). 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

VIEIRA, M. E. M. et al. Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV): fundamentos e aplicações em produtos lácteos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e262101018622, 10 ago. 2021.

VONA, Rosa et al. Biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome and associated diseases. Oxid Med Cell Longev, Londres, v. 2019, 19 p, 2019.

WANG, Q. et al. Ultrasound-assisted alkaline proteinase extraction enhances the yield of pecan protein and modifies its functional properties. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 80, p. 105789, dez. 2021.

WEN-QIONG, W. et al. Effect of temperature and pH on the gelation, rheology, texture, and structural properties of whey protein and sugar gels based on Maillard reaction. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 4, p. 1228–1242, abr. 2021.

XIAO, H.-W.; GAO, Z.-J. The Application of Scanning Electron Microscope (SEM) to Study the Microstructure Changes in the Field of Agricultural Products Drying. In: **Scanning Electron Microscopy**. [s.l.] InTech, 2012.

YANG, C. et al. Effects of magnesium alloys extracts on adult human bone marrow-derived stromal cell viability and osteogenic differentiation. **Biomedical materials**, v. 5, n. 4, p. 045005, 2010.

ZAGURI, M. et al. Protein quantification in ecological studies: A literature review and empirical comparisons of standard methodologies. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 12, n. 7, p. 1240–1251, 23 jul. 2021.

ZANINI, Irena. **Primjena RuBisCO proteina u prehrambenoj industriji**. 2022. Tese de Doutorado. University of Zagreb. Faculty of Food Technology and Biotechnology. Department of Management, Foreign Languages for Specific Purposes and Physical Education and Health. Laboratory for Sustainable Development.

ZEM, L. M. et al. Pereskia aculeata: biological analysis on wistar rats. **Food Science and Technology**, v. 37, n. suppl 1, p. 42–47, 21 set. 2017.

XIAO, H.-W.; GAO, Z.-J. The Application of Scanning Electron Microscope (SEM) to Study the Microstructure Changes in the Field of Agricultural Products Drying. In: **Scanning Electron Microscopy**. [s.l.] InTech, 2012.

Zetasizer Nano User Manual (2013). MAN0485 Issue 1.1

ZIEGLER, V. et al. Nutritional enrichment of beef burgers by adding components of non-conventional food plants. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, 2020.