



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**KATYA ANAYA JACINTO**

**EFEITO DO CONSUMO DE FARINHA DE LINHAÇA (*Linum  
usitatissimum*) NO CRESCIMENTO DE RATOS WISTAR E SUA  
RELAÇÃO COM A DIGESTIBILIDADE DE GLOBULINAS E  
FATORES ANTINUTRICIONAIS PROTÉICOS NAS ALBUMINAS**

**Natal/RN  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**KATYA ANAYA JACINTO**

**EFEITO DO CONSUMO DE FARINHA DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum*) NO CRESCIMENTO DE RATOS WISTAR E SUA  
RELAÇÃO COM A DIGESTIBILIDADE DE GLOBULINAS E  
FATORES ANTINUTRICIONAIS PROTÉICOS NAS ALBUMINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Maurício Pereira de Sales**

**Natal/RN  
2007**

**KATYA ANAYA JACINTO**

**EFEITO DO CONSUMO DE FARINHA DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum*) NO  
CRESCIMENTO DE RATOS WISTAR E SUA RELAÇÃO COM A  
DIGESTIBILIDADE DE GLOBULINAS E FATORES ANTINUTRICIONAIS  
PROTÉICOS NAS ALBUMINAS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: 28/06/2007

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Maurício Pereira de Sales  
Departamento de Bioquímica – UFRN  
Orientador

---

Profª Drª Ilka Maria Vasconcelos  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC  
1º Examinador

---

Profª Drª Edda Lisboa Leite  
Departamento de Bioquímica – UFRN  
2º Examinador

## AGRADECIMENTOS

---

Aos meus pais, João Jacinto Neto e Vanda Maria Jacinto, pelo apoio em todas as minhas decisões quando busquei delinear metas para atingir o sucesso profissional e realização pessoal.

Ao meu companheiro, Gabriel Lopes, com quem compartilho diariamente a alegria de mais um caminho percorrido. Agradeço pelo grande incentivo na etapa de conclusão deste trabalho... demorará um pouco para eu conseguir retribuir todo o cuidado a mim dedicado quando eu já estava exausta.

Ao professor Maurício Pereira de Sales, que me recebeu em seu laboratório e me permitiu realizar um trabalho que abrangesse a minha área de formação (Nutrição) sem que perdesse, no entanto, a identidade dos trabalhos do grupo. A você devo grande aprendizado em bioquímica e trabalhar contigo me possibilitou grande crescimento pessoal.

Aos meus grandes amigos, dos quais sentirei uma saudade GIGANTE Gioconda Moura, Leonardo Pepino e Ticiania Amorim, companheiros de mestrado, laboratório e, certamente, da vida. Leléo, esta alma nobre, com sua simplicidade e grande calma, sempre nos ensinando lições valiosas, além de ser um cientista cheio de idéias inovadoras e eficazes, que um dia hão de ser reconhecidas e patenteadas! Gigi, a criatura mais teimosa do mundo (depois de mim, é claro), com quem travei discussões fervorosas sobre coisas totalmente sem importância, para só depois percebermos que nos amamos. E Tici, que se tornou uma irmã, em quem descobri grande afinidade, e que não apenas quebrou galhos para mim, ela serrou troncos!

Ao professor Eliseu Antunes, um “anjo de luz”, com quem sempre foi agradável conversar e discutir resultados. A gentileza e cordialidade em pessoa, além de excelente professor, admirado por todos.

À professora Dilma Ferreira, de quem me apropriei (no bom sentido) do conhecimento e experiência em ensaios com animais, e a quem agradeço enormemente pela contribuição dada para este trabalho.

A todos os alunos e ex-alunos do Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas: Fabiano Teixeira, Anne Shirley, Anny Aquino, Adeliana Oliveira, Ludovico Migliolo, Rodrigo Aquino, Hugo Henrique, André Vianna, Raquel Araújo, Fernanda Miranda, Jannison Karly, Lussandra Thaís, Hilarina, Isabela Monteiro, Norberto de Kássio, Joelma Pitanga, Ibson Lucas e Cleysyvan Macedo. Obrigada a Juliana Alves e Gabriela Diniz, por serem minhas atentas pupilas, mesmo que por curto tempo. Um agradecimento especial à Dayse Cunha, aluna que me ofereceu um auxílio enorme no cuidado e manutenção dos animais dos experimentos, e à mestranda Ana Celly, que com sua experiência, ajudou na confecção das rações. O que seria de nós sem

o amigo doutorando Alexandre Queiroz, e nossas sessões de LOST e Heroes?  
E, vou agradecer à mestranda Virgínia Penélope também, pois se não o fizer,  
ela prometeu deixar de falar comigo (...)

À amiga, agora mestre em Bioquímica, Karla Danielly, colega desde a  
graduação, que compartilhou comigo mais esta etapa na nossa formação  
acadêmica (e que venha o doutorado!). E, não posso deixar de lembrar, da  
saudosa Illana Louise, também colega da graduação, que nos abandonou para  
realizar o mestrado em outro centro de pesquisa.

Aos demais colegas da turma de mestrado: Hérika Myrna, Leila Cardoso,  
Cibele Marques, José Edílson, Daniele Medeiros, Josane Regina, Eduardo e  
Robério. Obrigada pela companhia alegre e pelos momentos de descontração  
quase permanentes durante as disciplinas do mestrado.

À amiga, ex-orientadora, colega de profissão e tudo o mais, professora Dra.  
Ana Vlândia Bandeira Moreira (Depto. de Nutrição), por me apresentar ao  
professor Maurício, recomendar-me tão bem e confiar no meu trabalho,  
colocando-se sempre à disposição.

À professora Sandra Nunes (Depto. de Nutrição), pela valiosa assistência na  
análise morfológica e morfométrica realizada neste trabalho.

Ao professor Emerson, responsável pelo Laboratório de Nutrição Animal, pela  
concessão das análises de composição centesimal.

À Creuza Bernardino, técnica do Departamento de Bioquímica, que me auxiliou  
em parte das análises de composição centesimal.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica, que me  
auxiliaram de alguma forma, seja me ensinando bioquímica, permitindo a  
utilização das instalações e/ou equipamentos de seus laboratórios ou mesmo  
tratando-me de maneira cortês.

A CAPES.

*Vocês não gostariam de descobrir se é possível viver neste mundo ricamente, plenamente, com felicidade e criatividade, sem a compulsão destrutiva da ambição, sem competição? Não gostariam de saber como viver de modo que sua vida não destrua outra, ou lance uma sombra em seu caminho? Pensamos que isso é um sonho utópico que nunca poderá se realizar, mas não estou falando de utopia, o que seria absurdo. Podemos, vocês e eu, pessoas simples, comuns, viver criativamente nesse mundo, sem a compulsão da ambição, que se mostra como desejo de poder, de posição e de muitas outras maneiras? Descobrirão a resposta quando amarem o que estão fazendo. Se você é engenheiro porque precisa ganhar a vida, ou porque seu pai ou a sociedade esperam isso de você, essa é outra forma de compulsão, e compulsão, sob qualquer forma, cria contradição, conflito. Mas, se você realmente ama ser engenheiro, ou cientista, ama plantar uma árvore, pintar um quadro, ou escrever uma poesia, não para ser admirado, mas apenas porque ama o que faz, então descobrirá que não está competindo com ninguém. Penso que o segredo é esse: amar o que se faz.*

Jiddu Krishnamurti

## RESUMO

---

---

A linhaça (*Linum usitatissimum*) é uma importante oleaginosa consumida crua como suplemento nutricional, que apesar de representar rica fonte de nutrientes, pode ter valor nutricional reduzido devido à presença de fatores antinutricionais. Neste estudo as principais frações protéicas da farinha de linhaça crua foram extraídas e isoladas, sendo obtidos 12% de albuminas, 82% de globulinas, 5% de glutelinas e 1% de prolaminas; o padrão eletroforético das proteínas mostrou que as albuminas apresentaram bandas majoritárias de baixa massa molecular em torno de 21 kDa e menores, indicativas da presença de inibidores de tripsina, e nas globulinas foram observadas algumas bandas intensas que provavelmente compõem uma proteína multimérica de alta massa molecular do tipo legumina. Após a obtenção da composição centesimal da farinha crua, esta foi usada como fonte exclusiva de proteínas para ratos recém-desmamados, a fim de avaliar seu efeito no crescimento dos mesmos. Os resultados de depressão do crescimento (ganho de peso 73% inferior ao grupo padrão) e redução no crescimento dos vilos intestinais (35%) levaram à verificação da digestibilidade *in vitro* e *in vivo* da fração globulina e detecção de fatores antinutricionais protéicos (inibidores de enzimas digestórias de mamíferos e lectinas) na fração albumina, como possíveis fatores deletérios ao crescimento dos ratos em estudo. As globulinas nativas apresentaram baixa susceptibilidade a digestão *in vitro* por tripsina e quimotripsina, no entanto sofreram maior degradação pela pancreatina. O aquecimento das globulinas por 5 e 15 minutos a 100°C aumentou consideravelmente a digestibilidade pela



tripsina e pancreatina. No experimento de digestibilidade *in vivo*, a globulina apresentou alta susceptibilidade à degradação pelas enzimas digestivas (93,2%), semelhante à proteína padrão. Na avaliação da fração albumina, esta apresentou alta atividade inibitória de tripsina (100%) e, em menor grau, inibição de quimotripsina (28,3%), não sendo detectada atividade hemaglutinante. Os resultados obtidos são indicativos da ação negativa dos inibidores de tripsina no crescimento dos animais, no entanto não se pode descartar a possibilidade de uma ação sinérgica com outros fatores antinutricionais, que comprometem a utilização da linhaça crua como um alimento alternativo.

Palavras-chave: Linhaça. Globulinas. Albuminas. Fatores Antinutricionais. Tripsina-inibidores. Proteínas-digestibilidade.

## ABSTRACT

---

---

Linseed is an important oilseed consumed raw as nutritional supplement, that although represents a rich source of nutrients, its nutritional value could be impaired due to the presence of antinutritional factors. In this study, protein fractions from raw linseed flour were extracted and isolated being obtained 12% of albumins, 82% of globulins, 5% of glutelins and 1% of prolamins. These proteins were visualized by SDS-PAGE and albumins showed low molecular mass protein bands around 21 kDa and minor bands, similar to that of trypsin inhibitor; Globulins presented protein bands with high molecular masses, which possibly are constituents of multimeric proteins, such as legumins. After determination of the centesimal composition of raw linseed, it was used as exclusive protein source for young rats to evaluate its effect on animal growth. The results showed negative effects on rat growth (weight gain 73% less than the control group) and reduction of intestinal villus (35%), that could be related with *in vitro* and *in vivo* globulin digestibility and proteinaceous antinutritional factors (mammalian digestive enzymes inhibitors and lectins) in albumin fraction. Native globulins showed, by SDS-PAGE, low susceptibility *in vitro* to trypsin and chymotrypsin, however presented high degradation by pancreatin. Thermal treatment of globulins for 5 and 15 minutes at 100°C improved considerably its digestibility by trypsin and pancreatin. Globulins presented 93.2% *in vivo* digestibility, similar to the control protein. Albumin fraction had high trypsin inhibition activity (100%) and chymotrypsin inhibition of 28.3%; haemagglutinating activity was not detected. The results of this study indicate

the negative action of trypsin inhibitors on animal growth, but can not be discarded its combined action with other antinutritional factors, which could compromise the raw linseed utilization as an alternative food.

Key-words: Linseed. Flax. Flaxseed. Globulins. Albumins. Antinutritional Factors. Trypsin inhibitors. Protein digestibility.

## LISTA DE FIGURAS

---

---

- FIGURA 1.** A - Linhaça dourada (Fonte: [www.answer.com/topic/flax-seeds-jpg](http://www.answer.com/topic/flax-seeds-jpg)). B - Linhaça Marrom (Foto: Katya Anaya) ..... 16
- FIGURA 2.** Fluxograma dos procedimentos e ensaios realizados. .... 32
- FIGURA 3.** Fórmulas para cálculos do Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA), Coeficiente de Eficácia Protéica (CEP) e Coeficiente de Retenção Protéica (CRP), realizados com os dados referentes coletados aos 28 dias de experimento..... 37
- FIGURA 4.** Curva de crescimento dos ratos. .... 47
- FIGURA 5.** Curva de consumo de ração..... 47
- FIGURA 6.** Secções histológicas de intestino delgado em coloração hematoxilina-eosina (HE). Ratos alimentados com caseína (A), linhaça crua (B) e dieta aprotéica (C). Objetiva de aumento 10X..... 49
- FIGURA 7.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) das frações albumina (A) e globulina (G) (15 µg). Marcadores de massa molecular (M): β-galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactase desidrogenase (34 kDa), endonuclease de restrição Bsp981 (25 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa). 51
- FIGURA 8.** Digestibilidade *in vitro* de globulinas da linhaça por quimotripsina (SDS-PAGE) (A) Globulina nativa (B) Globulina desnaturada a 100°C por 5 minutos (C) Globulina desnaturada a 100°C por 15 minutos. (M) Marcador de massa molecular (1) Quimotripsina (2) amostra (3) 5' 37°C (4) 10' 37°C (5) 15' 37°C e (6) 30' 37°C. Marcadores de massa molecular (M): β-galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45

kDa), lactase desidrogenase (34 kDa), endonuclease de restrição Bsp981 (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa). ..... 52

**FIGURA 9.** Digestibilidade *in vitro* de globulinas da linhaça por tripsina (SDS-PAGE) (A) Globulina nativa (B) Globulina desnaturada a 100°C por 5 minutos (C) Globulina desnaturada a 100°C por 15 minutos. (M) Marcador de massa molecular (1) Tripsina (2) amostra (3) 5' 37°C (4) 10' 37°C (5) 15' 37°C e (6) 30' 37°C. Marcadores de massa molecular (M):  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactase desidrogenase (34 kDa), endonuclease de restrição Bsp981 (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa). ..... 53

**FIGURA 10.** Digestibilidade *in vitro* de globulinas da linhaça por pancreatina (SDS-PAGE) (A) Globulina nativa (B) Globulina desnaturada a 100°C por 5 minutos (C) Globulina desnaturada a 100°C por 15 minutos. (M) Marcador de massa molecular (1) Pancreatina (2) amostra (3) 5' 37°C (4) 10' 37°C (5) 15' 37°C e (6) 30' 37°C. Marcadores de massa molecular (M):  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactase desidrogenase (34 kDa), endonuclease de restrição Bsp981 (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa). ..... 54

**FIGURA 11.** Inibição da atividade de enzimas digestivas pela fração albumina da linhaça. .... 56

## LISTA DE TABELAS

---

---

<b>TABELA 1.</b> Composição das rações utilizadas no experimento de avaliação de crescimento de ratos Wistar alimentados com ração à base de farinha de linhaça.....	38
<b>TABELA 2.</b> Composição das rações utilizadas no experimento de avaliação da digestibilidade de globulinas da linhaça em ratos Wistar.....	43
<b>TABELA 3.</b> Composição centesimal da linhaça crua.....	46
<b>TABELA 4.</b> Ganho de peso, consumo de ração, coeficiente de eficácia alimentar, coeficiente de eficácia protéica e coeficiente de retenção protéica (média $\pm$ DP, n = 6).....	47
<b>TABELA 5.</b> Morfometria de segmento ileal do intestino delgado (Média $\pm$ DP, n = 2).....	49
<b>TABELA 6.</b> Fracionamento e quantificação das proteínas da linhaça .....	50
<b>TABELA 7.</b> Digestibilidade <i>in vivo</i> das globulinas de linhaça (% $\pm$ DP).....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

- BApNA** –  $\alpha$ -benzoil-DLarginina- $p$ -nitrosanilida
- BSA** – albumina sérica bovina
- CEA** – Coeficiente de eficácia alimentar
- CEP** – Coeficiente de eficácia protéica
- CRP** – Coeficiente de retenção de proteína
- DP** – desvio padrão
- DV** – digestibilidade verdadeira
- GA** – grupo aprotéico
- GL** – grupo linhaça
- GP** – grupa padrão
- HDL** – lipoproteína de alta densidade
- HE** – hematoxilina-eosina
- LDL** – lipoproteína de baixa densidade
- NF1** – nitrogênio fecal do grupo teste
- NF2** – nitrogênio fecal do grupo aprotéico
- Ni** – nitrogênio ingerido
- SDG** – diglicosídeo secoisolariciresinol
- SDS** – dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE** – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
- TBHQ** – butil hidroquinona terciária
- TCA** – ácido tricloroacético
- TG** – triglicerídeo
- UH** – unidade de hemaglutinação

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A LINHAÇA	16
1.2. FRAÇÃO ALBUMÍNICA DE SEMENTES: FONTE DE FATORES ANTINUTRICIONAIS	19
1.3. PROTEÍNAS DE RESERVA DE SEMENTES	22
1.4. DIGESTIBILIDADE DE PROTEÍNAS	25
1.4.1. Digestibilidade de globulinas	26
1.5. APLICAÇÃO DA LINHAÇA E ASPECTOS NUTRICIONAIS	28
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
3.1. MATERIAL	30
3.1.1. Material Biológico	30
3.1.2. Reagentes	31
3.2. MÉTODOS	31
3.2.1. Preparo da farinha de linhaça	31
3.2.2. Determinação da composição centesimal da farinha de linhaça	33
3.2.3. Avaliação biológica da qualidade protéica	36
3.2.4. Extração e fracionamento das proteínas da linhaça	39
3.2.5. Quantificação de proteínas	40
3.2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	40
3.2.7. Digestibilidade <i>in vitro</i> das globulinas de linhaça	41
3.2.8. Digestibilidade <i>in vivo</i> das globulinas de linhaça	42
3.2.9. Determinação de fatores antinutricionais protéicos na fração albumínica	43
3.2.10. Análise estatística	45
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
4.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	46
4.2. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE RATOS ALIMENTADOS COM RAÇÃO À BASE DE LINHAÇA	46



4.3. MORFOMETRIA E MORFOLOGIA DE EPITÉLIO INTESTINAL DE SEGMENTO ILEAL	48
4.4. FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DA LINHAÇA	50
4.5. SDS-PAGE DAS PRINCIPAIS FRAÇÕES PROTÉICAS DA LINHAÇA	50
4.6. DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DAS GLOBULINAS DA LINHAÇA	52
4.7. DIGESTIBILIDADE <i>IN VIVO</i> DAS GLOBULINAS DA LINHAÇA	55
4.8. FATORES ANTINUTRICIONAIS NA FRAÇÃO ALBUMINA DA LINHAÇA	55
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

---

### 1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A LINHAÇA

O linho (*Linum usitatissimum*) é uma planta pertencente à família das Lináceas, de importante cultivo em países como Canadá, China, Argentina e Índia, cujas fibras são utilizadas pela indústria têxtil na fabricação de linho, e suas sementes usadas para a extração de óleo (SAMMOUR, 1999).

A semente do linho, denominada de linhaça, é um cereal (monocotiledônea) do grupo das oleaginosas (sementes com altos teores de lipídios) que se caracteriza por ser chata e oval com uma extremidade pontiaguda e possui coloração que varia de marrom-avermelhada ao dourado (Figura 1). Em sua composição centesimal pode-se encontrar de 30 a 40% de lipídios, 20 a 25% de proteínas, 20 a 28% de fibra total, 4 a 8% de umidade, 3 a 4% de cinzas, de vitaminas A, D, E e K, e minerais; esses teores podem variar de acordo com o cultivar ou variedade, o meio ambiente, o processamento da semente e métodos de análise (TREVINO *et al.*, 2000, COSKUNER; KARABABA, 2007). A linhaça amarela ou dourada, por exemplo, contém menor quantidade de fibra total em relação à linhaça marrom, todavia, possui maiores



FIGURA 1. A - Linhaça dourada (Fonte: [www.answer.com/topic/flax-seeds-jpg](http://www.answer.com/topic/flax-seeds-jpg)). B - Linhaça Marrom (Foto: Katya Anaya)

teores de proteínas (BELL; KEITH, 1993).

Além de suas qualidades têxteis e nutricionais, a linhaça é bastante conhecida devido às suas propriedades medicinais, que já eram conhecidas desde a antiguidade, uma vez que os gregos recomendavam-na para combater inflamações nas mucosas (COSKUNER; KARABABA, 2007). Atualmente, há um crescente incentivo na inclusão de linhaça na dieta devido seus potenciais benefícios à saúde, sendo considerada um alimento funcional ou nutracêutico<sup>1</sup> (OOMAH; DER; GODFREY, 2006), especificamente pela ação anticarcinogênica e antiaterogênica, conferidos pela presença de grande quantidade de fibras, fitoestrógenos e ácidos graxos ômega-3 (PRASAD, 1997, KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002, LUCAS *et al.*, 2004, CHUNG; LEI; LI-CHAN, 2005).

Os fitoestrógenos são produtos intermediários do metabolismo das plantas, geralmente relacionados aos constituintes das fibras. Os principais grupos de fitoestrógenos encontrados na linhaça são as lignanas e os isoflavonóides (HANF; GONDER, 2005). Essas moléculas apresentam semelhança estrutural e funcional com esteróides estrogênicos, influenciando no metabolismo e atividade de estrógenos, síntese protéica, ação do fator de crescimento e angiogênese, assim como na diferenciação e proliferação de células malignas (AXELSON; SETCHELL, 1981, KNUST *et al.*, 2006). A lignana diglicosídeo secoisolariciresinol (SDG) presente na linhaça é precursora de lignanas em mamíferos (enterodiol e enterolactona), produzidas através da ação da microflora colônica (AXELSON; SETCHELL, 1981). O

---

<sup>1</sup> Segundo a ANVISA, Resolução nº18 de 30 de abril de 1999: “O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”. Assim sendo, estes alimentos têm ganhado destaque devido os aspectos positivos que promovem à saúde.

complexo lignana, que apresenta compostos tanto com ação antioxidante quanto hipolipidêmica, é efetivo na redução do estresse oxidativo, colesterol total, LDL e relação TG/HDL, e aumento de HDL sérico. Desta forma, é benéfico na prevenção da hipercolesterolemia e aterosclerose, reduz os fatores de risco de doenças coronarianas (PRASAD, 2005) e promove proteção contra a indução química de carcinogênese mamária e no cólon (YUAN; RICKARD; THOMPSON, 1999). Os ácidos graxos insaturados da linhaça, em animais com deficiência hormonal ovariana, foram eficazes na diminuição da concentração de colesterol sérico e na progressão de lesões ateroscleróticas, são capazes de restabelecer a função endotelial da circulação arterial mesentérica na hipertensão e reduzem os marcadores inflamatórios em pacientes dislipidêmicos, constituindo uma prevenção primária e secundária de desenvolvimento de doenças coronarianas (RATNAYAKE *et al.*, 1992, TALOM *et al.*, 1999, RALLIDIS *et al.*, 2003, LUCAS, *et al.*, 2004, MORISE *et al.*, 2004). A suplementação com óleo de linhaça mostrou-se benéfica ao diminuir o tamanho de tumores de mama (THOMPSON *et al.*, 1996) e auxiliar na prevenção do câncer de próstata (DALAIS *et al.*, 2004).

A composição de aminoácidos das proteínas da linhaça é comparável à da soja e canola, contendo altos teores de arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico e leucina, embora o conteúdo de triptofano seja inferior (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998, CHUNG; LEI; LI-CHAN, 2005). Treviño *et al.* (2000) comprovaram que a composição de aminoácidos essenciais na linhaça é bastante semelhante à encontrada em sementes de soja, com exceção do baixo conteúdo de lisina (39% menor do que na soja). Em contrapartida, a linhaça apresenta quantidades consideravelmente maiores de

aminoácidos sulfurados, o que a torna fonte em potencial de proteína vegetal de alta qualidade para a incorporação em produtos alimentícios (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998).

Os estudos mais recentes sobre as proteínas da linhaça têm se proposto a descrever suas características bioquímicas e nutricionais a fim de indicar sua utilização na alimentação (CHUNG; LEI; LI-CHAN, 2005). No entanto, o primeiro estudo das proteínas da linhaça data de 1892, realizado por Osborne, quem primeiro as isolou, reportando a presença de proteínas do tipo globulina e de proteínas do tipo albumina (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1994).

## 1.2 FRAÇÃO ALBUMÍNICA DE SEMENTES: FONTE DE FATORES ANTINUTRICIONAIS

Cereais, leguminosas e tubérculos podem conter quantidades significantes de componentes antinutricionais de origem não protéica, como compostos fenólicos, oligossacarídeos ( $\alpha$ -galactosídeos), fitatos, taninos, glicosídeos cianogênicos, oxalatos, saponinas, entre outros. Na fração albumínica das sementes são encontrados os fatores antinutricionais protéicos, como as lectinas, inibidores alfa-amilase, inibidores de tripsina e inibidores de quimotripsina, principalmente. Essas substâncias reduzem o valor nutricional dos alimentos por interferir na biodisponibilidade de minerais, digestibilidade de proteínas e carboidratos e produção de flatulência, tendo então, efeitos adversos na nutrição e saúde (JOOD; MEHTA; SINGH, 1986, REDDY; PIERSON, 1994, NTI; PLAHAR, 1996).

Os inibidores de enzimas digestivas (amilases e proteinases) presentes na dieta reduzem a atividade enzimática, particularmente a atividade das enzimas pancreáticas (principalmente tripsina, quimotripsina e amilases) no lúmen intestinal, reduzindo então a digestibilidade de proteínas e absorção de aminoácidos, assim como influenciam negativamente no crescimento e em praticamente todos os mecanismos onde proteínas e carboidratos são requisitados (LIENER, 1994, NTI; PLAHAR, 1996, LIMA *et al.*, 2004). No trigo, por exemplo, a maioria das albuminas tem atividade inibitória de  $\alpha$ -amilases, provocando uma redução da digestão do amido presente na alimentação, o que também é verificado em diversos tubérculos (SINGH *et al.*, 2001, BHANDARI; KAWABATA, 2006).

Os inibidores de tripsina representam um sério obstáculo à inclusão de leguminosas como feijão, soja, ervilha e grão de bico na alimentação humana; seus efeitos de redução na digestibilidade de proteínas foram demonstrados em ensaios *in vitro* e *in vivo* e nem sempre sua atividade é eliminada após o processamento, o que depende do tempo e tipo de tratamento aplicado (GENOVESE; LAJOLO, 1996b, NTI; PLAHAR, 1996, Qin *et al.*, 1996, ALONSO; ORUE; MARZO, 1998, CLEMENTE *et al.*, 1998, SAIKIA; SARKAR; BORUA, 1999, ELSHEIKH; FADUL; EL TINAY, 2000, VASCONCELOS *et al.*, 2001, OLOYO, 2004, MUBARAK, 2005, SIDDHURAJU; BECKER, 2005, HADDAD; ALLAF, 2007, SATHE; VENKATACHALAM, 2007). A toxicidade dos inibidores de proteinases em mamíferos foi bem documentada através de experimentos biológicos (CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002): em animais alimentados com soja (*Glicine max*) e feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), os inibidores de tripsina foram responsáveis pelo efeito de inibição no crescimento

e pela resposta hipertrófica do pâncreas e intestino delgado (GRANT *et al.*, 1988, GRANT; DORWARD; PUSZTAI, 1993, BAU; VILLAUME; GIANNANGELI, 2001, VASCONCELOS, *et al.*, 2001). A redução no crescimento dos animais é explicada por um mecanismo de inibição retroativa no controle da secreção do pâncreas, onde os inibidores de tripsina bloqueiam a ação da tripsina resultando em aumento excessivo da concentração plasmática de colecistocinina (uma vez que os níveis de tripsina e quimotripsina livres no intestino delgado determinam a liberação desse hormônio), e desta forma, o pâncreas é continuamente estimulado a liberar mais enzima, provocando hipertrofia pancreática (RACKIS; GUMBMANN, 1982, LIDDLE; GOLDFINE; WILLIAMS, 1984). Acredita-se que a depressão no crescimento seja uma conseqüência de perdas endógenas de aminoácidos na forma de enzimas secretadas por um pâncreas hiperativo (LIENER, 1994). Um estudo com humanos concluiu que inibidores de tripsina presentes na fração albumina de ervilhas foram os responsáveis pela diminuição na biodisponibilidade das proteínas da dieta; embora não se tenham verificado perdas intestinais de nitrogênio endógeno causada pelo consumo agudo de dieta com inibidores, os autores não descartam a possibilidade de ocorrência de efeitos mais severos em caso de ingestão prolongada (MARIOTTI *et al.*, 2001).

Um outro tipo de fator antinutricional protéico são as lectinas, proteínas de origem não imunológica que se ligam de forma reversível a carboidratos, mas são desprovidas de atividade enzimática (LORIS, 2002). As lectinas são capazes de provocar diversos efeitos biológicos nas células assim como no organismo como um todo, e sua presença nos alimentos vegetais oferece

potenciais riscos à saúde (PEUMANS; VAN DAMME, 1996). Algumas lectinas presentes nos vegetais consumidos são resistentes à degradação pelas enzimas digestivas (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004), e por isso, permanecem ativas durante a passagem pelo trato gastrintestinal e podem mediar grande variedade de efeitos biológicos (NACHBAR; OPPENHEIM, 1980, PEUMANS; VAN DAMME, 1996, CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002). As lectinas encontradas nos alimentos podem causar profundas modificações morfológicas e fisiológicas no intestino delgado. Elas podem induzir mudanças em algumas ou em todas as funções: digestiva, absorptiva, protetora e secretória de todo o sistema digestivo e afetar o turnover e proliferação celular (GRANT *et al.*, 1988, BARDOCZ *et al.*, 1996, KORDAS *et al.*, 2000). A ligação das lectinas ao epitélio intestinal é frequentemente acompanhada pela ruptura da borda em escova e desorganização das células, o que causa redução da área absorptiva e, conseqüentemente, da absorção de nutrientes (PUSZTAI; BARDOCZ, 1996, VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). Pode-se encontrar lectinas em cereais como trigo, arroz, gergelim, centeio, cevada, milho, sementes de girassol e café (NACHBAR; OPPENHEIM, 1980, PEUMANS; VAN DAMME, 1996, CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002, DAVIDSON; STEWART, 2004).

### 1.3 PROTEÍNAS DE RESERVA DE SEMENTES

Proteínas de reserva ou de armazenamento são acumuladas em quantidades significativas durante o processo de maturação das sementes e durante a germinação são rapidamente hidrolisadas fornecendo nitrogênio na



forma de aminoácidos precursores de proteínas estruturais, metabólicas e outros constituintes celulares utilizados nos primeiros estágios de desenvolvimento das plântulas. Nas sementes maduras, as proteínas de reserva são encontradas em pequenas organelas denominadas corpos protéicos, que possuem mecanismos de síntese bastante semelhantes dentre os gêneros de plantas (HIGGINS, 1984).

As proteínas de reserva presentes nas sementes foram inicialmente classificadas por Osborne (1924), de acordo com as suas propriedades de solubilidade em: globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em álcoois) e glutelinas (solúveis tanto em soluções ácidas quando basicas) (BERNARDINO-NICANOR *et al.*, 2006).

As principais proteínas de reserva de cereais (monocotiledôneas) como trigo (*Triticum sp.*), cevada (*Hordeum vulgare*) e centeio (*Secale cereale*) são as prolaminas, e a relação taxonômica destes cereais é refletida na estrutura destas proteínas (KREIS *et al.*, 1985, BURGESS; SHEWRY, 1986, TATHAM; SHEWRY, 1995, EGOROV *et al.*, 1996). Diferente dos demais cereais, a principal proteína de armazenamento da aveia (*Avena sativa*) são globulinas, e a principal globulina da aveia é uma proteína 12S e se assemelha bastante (até mesmo em relação à composição aminoacídica) com as proteínas de armazenamento das leguminosas, as leguminas (MATLASHEWSKI *et al.*, 1982).

As proteínas de reserva predominante em leguminosas são as globulinas e os primeiros trabalhos de análise das globulinas de reserva foram apresentados por Osborne e Campbell (1898) que mostraram que a fração globulínica de *Pisum sativum* podia ser separada em duas outras frações:

legumínica, que era insolúvel em soluções salinas e não coagulava quando aquecida a 100°C e vicilínica, que era solúvel em soluções salinas e coagulava quando aquecida a 95°C. Estes autores demonstraram que frações protéicas similares podiam ser extraídas de outras sementes de leguminosas, como por exemplo, *Phaseolus vulgares* e *Glycine max* (DERBYSHIRE; WRIGHT; BOULTER, 1976).

As propriedades gerais e características físicas de leguminas e vicilinas de sementes de dicotiledôneas foram sumarizadas por Derbyshire; Wright; Boulter (1976) e por Spencer *et al.* (1983). As leguminas (11S-12S) são as proteínas mais estudadas, apresentam massas moleculares variando de 300 kDa a 400 kDa, são compostas de 6 subunidades de aproximadamente 60 kDa, cada subunidade possui uma cadeia polipeptídica ácida e uma básica, de massas moleculares de 40 kDa e 20 kDa respectivamente, ligadas por pontes dissulfeto e são glicoproteínas apresentando em suas estruturas açúcares neutros como manose e algumas possuem glicosamina e galactosamina. As vicilinas (7S- 9S) são menos conhecidas, suas massas moleculares variam de 140 a 200 kDa, são compostas de três subunidades com massas moleculares em torno de 50 kDa cada uma (DESHPANDE; DAMODARAN, 1989b), apresentam baixos níveis dos aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína e, em muitos casos, são glicoproteínas contendo açúcares neutros como manose e glicosamina (BRIAN, 1981). Portanto, diversos estudos relacionados a responder questões sobre a qualidade nutricional de leguminosas focalizam a fração globulínica por esta se apresentar em grandes quantidades nas sementes como proteínas de reserva.

## 1.4 DIGESTIBILIDADE DE PROTEÍNAS

As propriedades que melhor definem a qualidade nutricional de um alimento em termos protéicos são sua digestibilidade e seu valor biológico. A digestibilidade é a medida percentual da proteína ingerida e efetivamente absorvida pelo trato gastrintestinal. Já o valor biológico refere-se ao fornecimento dos aminoácidos essenciais ao organismo em quantidades adequadas (BRESSANI; ELIAS; MOLINA, 1977, DE ALGELIS, 1995).

A digestibilidade e utilização das proteínas vegetais são limitadas por dois tipos de fatores: os exógenos e endógenos. Os fatores exógenos incluem as interações das proteínas com polifenóis, fitatos, carboidratos, lipídios, lectinas e inibidores de proteases (DUODU *et al.*, 2003, LIENER, 1994). Os fatores endógenos se referem às características estruturais da proteína, como estrutura terciária e quaternária, que pode ser parcialmente destruída pelo calor (DESHPANDE; DAMODARAN, 1989a); a estrutura terciária das proteínas vegetais é mais complexa que a estrutura de proteínas animais (BRESSANI; ELIAS; MOLINA, 1977), o que faz com que a sua digestibilidade seja limitada.

Vários métodos de processamento e cozimento podem ser empregados para melhorar a digestibilidade de proteínas e carboidratos pela diminuição dos níveis dos antinutricionais (SIDDHURAJU; BECKER, 2005). Os grãos são geralmente submetidos a algum tipo de tratamento térmico, que melhora a digestibilidade e remove alérgenos. Recentes estudos têm demonstrado que, sob condições ótimas, alta pressão hidrostática (APH), uma tecnologia não térmica aplicada em produtos alimentícios, pode inativar os fatores antinutricionais dos grãos, preservando a qualidade dos alimentos e seus

constituintes (ESTRADA-GIRON; SWANSON; BARBOSA-CANOVAS, 2005). Porém, métodos mais simples como germinação, torragem e fervura das sementes são eficazes no aumento da digestibilidade e redução drástica da atividade inibitória de tripsina (MANSOUR; ELADAWY, 1994).

#### 1.4.1 Digestibilidade de globulinas

A baixa digestibilidade *in vitro* de sementes de leguminosas ocorre devido à presença de globulinas, que como citado anteriormente, são as principais proteínas de reserva destes grãos, e são bastante resistentes ao ataque de enzimas proteolíticas de mamíferos (LIENER; THOMPSON, 1980).

Globulinas de leguminosas apresentam baixa digestibilidade, e mesmo após a desnaturação, podem permanecer pouco digeríveis, sugerindo que a estrutura protéica pode não ser o único fator que limita a sua degradação (GENOVESE; LAJOLO, 1996a, CLEMENTE *et al.*, 1998). Isto foi bem demonstrado para globulinas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), que foram resistentes à hidrólise por diversas proteases (tripsina, pepsina, ficina, bromelaina e subtilisina) e, mesmo após desnaturação por calor ou uréia, essa fração protéica foi resistente à degradação por tripsina (SEIDL; JAFFÉ; JAFFÉ, 1969). Já as globulinas de lentilhas e *Vigna aconitifolia*, apesar de resistentes à digestão por tripsina e quimotripsina quando nativas, após o tratamento térmico apresentaram aumento na susceptibilidade às enzimas proteolíticas (NEVES; LOURENCO, 1995, SATHE; VENKATACHALAM, 2007). Estudos *in vivo* comprovam a baixa digestibilidade de globulinas e, ainda, afirmam a implicação de efeitos adversos destas proteínas ou de seus produtos de

degradação no metabolismo protéico dos animais (RUBIO *et al.*, 1998, CARBONARO, 2006).

As proteínas da linhaça são conhecidas por terem baixa digestibilidade (OOMAH; MAZZA, 1998). Análises por calorimetria diferencial de varredura (DSC) mostraram que interações com componentes não protéicos podem afetar a sua desnaturação por calor; ela pode ser influenciada por vários fatores, incluindo força iônica, pH, sais caotrópicos e substâncias desnaturantes. Esses resultados sugerem que interações hidrofóbicas e iônicas assim como pontes de hidrogênio, desempenham importante papel estabilizando a conformação da proteína nativa. Pontes dissulfeto podem também ter contribuição significativa na estabilização da principal fração protéica da linhaça (LI-CHAN; MA, 2002).

Madhusudhan; Singh (1985a) conseguiram melhorar a digestibilidade *in vitro* das proteínas da linhaça através da fervura em água, que promoveu a dissociação das globulinas e aumentou a digestibilidade em 38%, apesar de ter provocado uma redução de 30% do conteúdo de lisina disponível. O tratamento térmico aplicado durante as etapas de processamento resulta na redução dos ácidos fenólicos e da solubilidade das proteínas e aumento na digestibilidade por pepsina (OOMAH; MAZZA, 1998). O emprego da fermentação também foi eficaz no aumento da digestibilidade protéica de rações à base de linhaça (MUKHOPADHAY; RAY, 2005).

## 1.5 APLICAÇÃO DA LINHAÇA E ASPECTOS NUTRICIONAIS

A recomendação do uso da linhaça como fonte de compostos nutracêuticos tem sido uma prática crescente, tornando seu consumo um hábito diário de muitas pessoas. Apesar de se conhecer as inúmeras propriedades deste cereal, relacionadas à sua excelente composição de nutrientes, faz-se necessário estabelecer níveis e formas seguras de consumo, uma vez que as sementes são ricas em compostos antinutricionais e proteínas de baixa digestibilidade, que comprometem a sua qualidade nutricional.

Estudos anteriores demonstraram efeitos adversos em animais mono e poligástricos causados pelo consumo de linhaça. Portanto, é interessante o desenvolvimento de pesquisas que se proponham a averiguar e contribuir para a descrição das implicações metabólicas provocadas pela utilização diária da linhaça crua na alimentação de mamíferos. Pesquisas sobre a digestibilidade de suas proteínas e conteúdo de fatores antinutricionais protéicos também podem gerar resultados importantes que sirvam como fundamentos para a proposição da inclusão da linhaça na alimentação de maneira adequada; esses resultados poderiam, inclusive, subsidiar a indicação da semente como um alimento alternativo em substituição a outros cereais ou mesmo leguminosas, caso sejam comprovados seus efeitos benéficos para humanos e animais.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito do consumo da linhaça (*Linum usitatissimum*) em ratos wistar, quando usada como fonte de proteínas, e relacioná-lo com a digestibilidade das globulinas e presença de fatores antinutricionais protéicos em albuminas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✦ Analisar a composição centesimal da linhaça;
- ✦ Avaliar a qualidade protéica da linhaça quando administrada em dietas para ratos em crescimento;
- ✦ Realizar análise morfológica e morfométrica em cortes histológicos do intestino delgado (íleo dos animais submetidos ao ensaio biológico);
- ✦ Quantificar as frações protéicas da linhaça;
- ✦ Avaliar a digestibilidade *in vitro* e *in vivo* das globulinas;
- ✦ Verificar a presença de fatores antinutricionais protéicos nas albuminas: inibidores de enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilase salivar,  $\alpha$ -amilase pancreática, tripsina, quimotripsina e elastase) e lectinas.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

---

#### 3.1 MATERIAL

##### **3.1.1 Material biológico**

###### ✧ *Sementes*

Neste trabalho foram utilizadas sementes de *Linum usitatissimum*, da Jasmine Comércio de Produtos Alimentícios Ltda., adquiridas em distribuidor de produtos naturais na cidade de Natal-RN.

###### ✧ *Animais*

Ratos albinos (*Ratus norvegicus*) da linhagem Wistar foram utilizados nos ensaios biológicos, os quais foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

###### ✧ *Eritrócitos humanos*

Os eritrócitos humanos tipo A, B e O, utilizados nos ensaios de hemaglutinação, foram cedidos pelo HEMONORTE, Natal-RN.



### 3.1.2 Reagentes

Albumina sérica bovina (BSA),  $\alpha$ -benzoil-DLarginina- $p$ -nitrosanilide (BApNA), azocaseína, acrilamida, N'N'-metilenobisacrilamida, quimotripsina, tripsina,  $\alpha$ -amilase pancreática, elastase pancreática, Comassie Blue G-250 e R-250 foram obtidos da Sigma Co. (St. Louis, USA). Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi adquirido da Reagen e os padrões de massa molecular para eletroforese da Amersham Biosciences. Caseína, celulose, misturas minerais e vitamínicas foram obtidas da Rhoster Indústria e Comércio LTDA, São Paulo. L-cistina, Bitartarato de colina e Terc-butilhidroquinona (TBHQ) foram adquiridos em farmácia de manipulação e o amido de milho em mercado local. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Preparo da farinha de linhaça

As sementes foram trituradas em moinho elétrico refrigerado até a obtenção de uma farinha de fina granulação, que foi passada em peneira de nylon de 40 mesh. A farinha obtida foi armazenada em recipiente plástico com tampa até a realização dos procedimentos descritos segundo o fluxograma apresentado na figura 2.

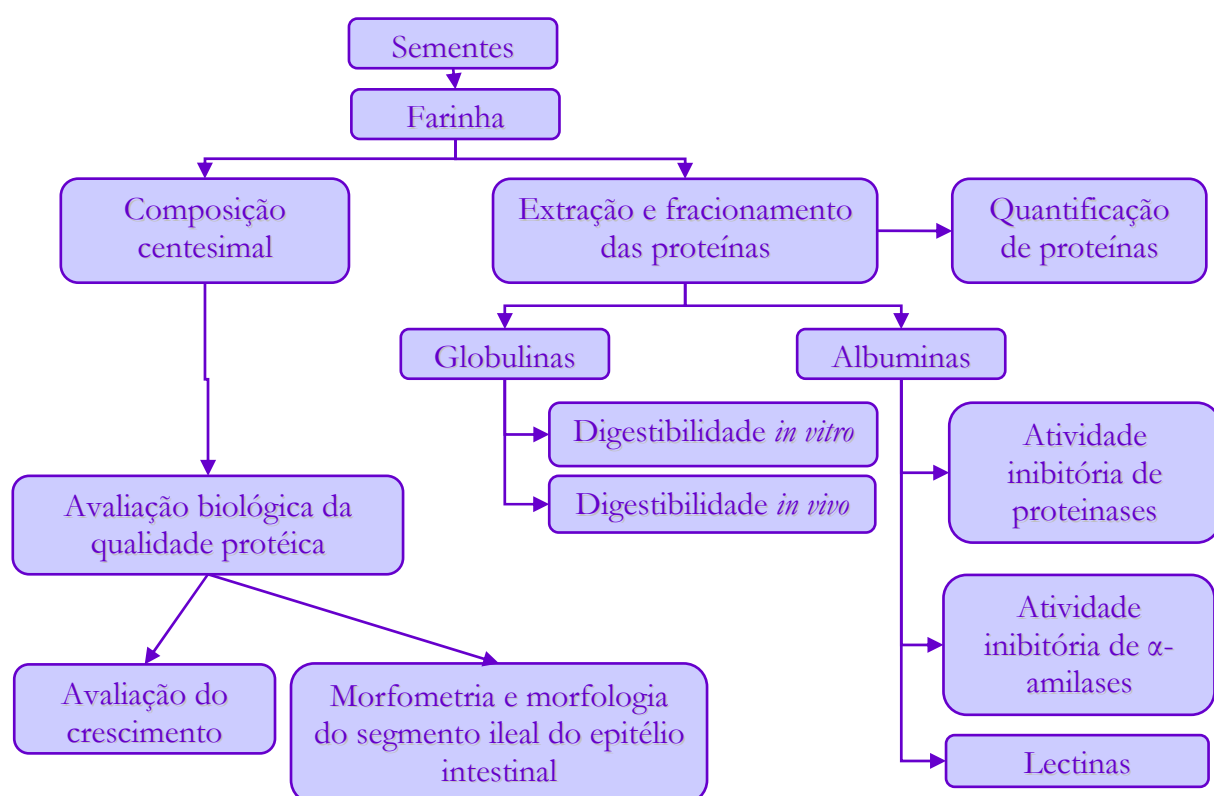


FIGURA 2. Fluxograma dos procedimentos e ensaios realizados.

### **3.2.2 Determinação da composição centesimal de farinha de linhaça**

#### *✧ Determinação do teor de umidade*

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico (AOAC, 1984), o qual quantifica o teor de água do alimento submetendo-o à desidratação. Para este procedimento foram pesadas amostras de 10 g de farinha de linhaça em cápsulas de porcelana (previamente pesadas) e levadas à estufa a 105°C para dessecar até peso constante, cujos pesos foram devidamente registrados. O teor de umidade foi determinado através da diferença entre o peso final e inicial. Foram feitas três repetições.

#### *✧ Determinação do teor de fibra bruta*

O método utilizado foi o da digestão ácida e alcalina, segundo a AOAC (1984). Amostras de 2 g de farinha de linhaça crua adicionadas de 200 ml de solução de ácido sulfúrico a 1,25% fervente foram mantidas em ebulição por 30 minutos. O material ainda quente foi filtrado em papel de filtro com auxílio de bomba a vácuo, e ao resíduo foram adicionados 200 ml de hidróxido de sódio 1,25% para a segunda digestão sob ebulição por 30 minutos. Decorrido esse tempo, o material foi filtrado em cadinhos de Gooch com lã de vidro, previamente pesados, e o material lavado sucessivamente com água destilada, álcool e éter etílico. Após a secagem em temperatura ambiente, o cadinho foi levado à estufa a 105°C até atingir peso constante. A variação de peso

encontrado fornece a quantidade de fibra bruta da amostra. A análise foi feita em triplicata.

#### ✧ *Determinação do teor de cinzas*

Os minerais (ou cinzas) foram determinados por gravimetria (AOAC, 1984), através da incineração da matéria orgânica total. Para tal procedimento foram pesados 2 g de farinha de linhaça e com o uso de cadinhos de porcelana previamente pesados, o material foi incinerado em bico de Bunsen até ponto de carvão; a seguir os cadinhos foram colocados em mufla a 550°C até adquirir cor uniforme que vai do cinza ao branco, sem pontos de carvão. Os cadinhos foram retirados da mufla quando a temperatura atingiu 50°C e colocados em dessecador para esfriamento e posterior pesagem. A diferença de peso fornece o teor de cinzas. Foram feitas três repetições.

#### ✧ *Determinação do teor de proteínas*

O teor de proteínas da amostra foi determinado pelo método de semimicro Kjeldahl descrito pela AOAC (1984), através da dosagem do nitrogênio total. Amostras 0,2 g de farinha de linhaça foram colocadas em balão de Kjeldahl onde foram adicionados 0,5 g de sulfato de cobre, 1,0 g de sulfato de sódio e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Os balões foram levados ao digestor de Kjeldahl até completa mineralização, durante aproximadamente 4 horas. Após o resfriamento do material, foram adicionados 10 ml de água destilada e, então, o balão foi acoplado ao destilador. Na mangueira do destilador foi conectado

um erlenmeyer contendo 10 ml de solução de ácido bórico saturado com 3 gotas do indicador misto. Foram adicionados 25 ml de hidróxido de sódio 40% ao balão de Kjeldahl, e prosseguiu-se a destilação de aproximadamente 50ml da amostra, a qual foi titulada com solução de ácido sulfúrico 0,02 N, previamente padronizado. A análise foi realizada em triplicata. O teor de proteína foi calculado utilizando 6,25 como fator para estimativa de proteínas, segundo as fórmulas descritas:

$$\% \text{ de nitrogênio} = \frac{\text{Volume de HCl} \times \text{Normalidade do HCl} \times \text{fator} \times 1,401}{\text{Massa da amostra (g)}}$$

$$\% \text{ de proteínas} = \% \text{ de nitrogênio} \times 6,25$$

#### ✧ *Determinação do teor de lipídios*

O método utilizado para a determinação do teor de lipídios foi o método de Soxhlet (AOAC, 1984). Cerca de 3 g de farinha de linhaça foram pesados em envelope de papel poroso, devidamente selado após a inserção da amostra, os quais foram colocados no extrator de Soxhlet. Este aparelho efetua uma extração contínua, cujo solvente utilizado foi éter etílico, o qual passa pela amostra, deposita num balão aquecido o material lipídico e volatiliza-se para posterior condensação e refluxo pelo compartimento da amostra, até completa extração dos lipídios, indicada pelo retorno à característica incolor do solvente. O balão foi então levado à estufa a 105°C para completa evaporação do solvente e colocado em dessecador para esfriar. A diferença de peso do balão

com e sem fração lipídica, determinou o teor de lipídios da amostra. Foram tomadas três repetições.

#### ⤴ *Estimativa do teor de carboidratos*

A quantidade de carboidratos da farinha de linhaça foi estimada por cálculo diferencial a partir das demais quantificações da composição centesimal:

$$\text{Carboidratos (\%)} = 100 - (\text{proteínas} + \text{lipídios} + \text{fibras} + \text{umidade} + \text{cinzas})$$

### **3.2.3 Avaliação biológica da qualidade protéica**

#### ⤴ *Avaliação nutricional*

Ratos albinos da linhagem Wistar, recém-desmamados, com 21 dias de idade e peso de  $53 \pm 2$  g foram utilizados para os experimentos de crescimento utilizando farinha de linhaça como fonte exclusiva de proteína. Os animais foram divididos em 3 grupos de 6 animais, mantidos em gaiolas metabólicas individuais com água e comida *ad libitum*. Cada grupo de animais recebeu um tipo de dieta: Caseína (dieta padrão), aprotéica (dieta basal) e farinha de linhaça crua (dieta teste) (Tabela 1). As rações foram confeccionadas segundo protocolo de Reeves (1997).

As dietas caseína e linhaça crua continham 10% de proteína. Segundo o método de Pellet; Young (1980), o coeficiente de eficácia alimentar (CEA), o coeficiente de eficácia protéica (CEP) e coeficiente de retenção protéica (CRP) foram calculados após 28 dias de experimento. O consumo de alimento e peso dos animais foram quantificados semanalmente, e os cálculos de coeficientes determinados como descrito na figura 3.

$$CEA = \frac{\text{Ganho de peso}}{\text{Consumo de ração}}$$

$$CEP = \frac{\text{Ganho de peso}}{\text{Consumo de proteína}}$$

$$CRP = \frac{\text{Ganho de peso do grupo teste} + \text{perda de peso do grupo aprotéico}}{\text{Consumo de proteína}}$$

FIGURA 3. Fórmulas para cálculos do Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA), Coeficiente de Eficácia Protéica (CEP) e Coeficiente de Retenção Protéica (CRP), realizados com os dados referentes coletados aos 28 dias de experimento.

TABELA 1. Composição das rações utilizadas no experimento de avaliação de crescimento de ratos Wistar alimentados com ração à base de farinha de linhaça

	g/kg de ração		
	Dieta padrão	Dieta aprotéica	Dieta teste linhaça crua <sup>a</sup>
Farinha de linhaça crua	-	-	431,03
Caseína	100	-	-
Celulose	50	50	7,8
Sacarose	100	100	100
Mix de Minerais	35	35	20,8
Mix de Vitaminas	10	10	10
L-Cistina	3	-	-
Terc Butilhidroquinona	0,014	0,014	0,014
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Óleo de soja	70	70	-
Amido	629,5	732,5	451,2

<sup>a</sup>A inclusão dos componentes da ração levou em consideração a composição centesimal da farinha da linhaça crua.

#### ⤴ *Morfometria e morfologia do segmento ileal do epitélio intestinal*

Ao fim do ensaio biológico, os animais foram sacrificados e dois exemplares de cada grupo experimental foram escolhidos aleatoriamente para a retirada de fragmentos do intestino delgado, porção ileal, que após excisão foram lavados com solução salina e fixados em solução de PBS 0,1 M pH 7,4, e formaldeído 10%. Foram confeccionados cortes histológicos transversais do íleo, que sofreram inclusão em parafina e tratamento de coloração com hematoxilina-eosina (HE).



A morfologia do segmento ileal dos animais que se alimentaram com ração à base de linhaça foi comparada à dos grupos caseína e aprotéico (considerados controles positivo e negativo, respectivamente), verificando o formato, integridade e quantidade dos vilos, quantidade de células secretórias e presença de células apoptóticas ou mitóticas nos vilos, além de verificação da presença de tecido inflamatório.

A análise morfométrica dos tecidos em estudo foi realizada através de microscópio ótico Olympus com ocular micrometrada, em objetiva de 10x. Os vilos foram escolhidos aleatoriamente e medida a sua altura desde a base até o ápice, assim como a profundidade da cripta adjacente à direita de cada vilos medido, sendo tomadas 10 medições de cada intestino. Os resultados são expressos em média e desvio padrão do grupo, e relação vilos:cripta.

As fotografias dos cortes histológicos foram obtidas em microscópio ótico Nikon Eclipse E-200 com câmera digital Sony Mavica.

#### **3.2.4 Extração e fracionamento das proteínas da farinha de linhaça**

O fracionamento das proteínas foi realizado de acordo com o método de Osborne (1924); albuminas e globulinas foram obtidas a partir do método de Rassam; Laing (2006), com pequenas modificações. A farinha de linhaça foi colocada sob agitação magnética numa solução de água destilada contendo 10 mM  $\text{CaCl}_2$  e 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (1/30, p/v) a 4°C por 4 h, para a extração das albuminas. A suspensão foi centrifugada a 16000 x g, 4°C por 30 minutos e o precipitado foi ressuspenso e extraído por 16 h a 4°C em tampão Tris-HCl 0,1

M pH 7,5 contendo NaCl 1,7 M (1/30, p/v). Após a centrifugação, o sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônio, saturação a 85%; após 12 h, o material foi centrifugado a 16000 x g, 4°C por 1 h, o precipitado dissolvido em Tris-HCl pH 7,5 e após diálise em água destilada foi liofilizado. As albuminas e globulinas foram quantificadas e reservadas para análises posteriores.

O precipitado resultante da extração das globulinas foi usado para a obtenção de prolaminas, que foram extraídas com etanol 70% (1/10, p/v) por 4 h, a 4°C e, em seguida, centrifugado a 16000 x g, a 4°C por 30 minutos; o sobrenadante foi reservado e o precipitado usado para a extração das glutelinas, que foram solubilizadas em tampão glicina 0,05 M pH 11,5 (1/30, p/v) por 4h a 4°C. A suspensão foi centrifugada a 16000 x g, a 4°C por 1 h, e as glutelinas e prolaminas foram quantificadas.

### **3.2.5 Quantificação de proteínas**

A determinação da quantidade de proteínas das frações foi feita através do método de Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

### **3.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

As frações albumina e globulina da linhaça foram visualizadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida, realizada segundo o método de Laemmli, 1970, na presença de SDS, usando gel de separação de 15%, gel de concentração de 4%, tampão de amostra contendo azul de bromofenol a 1%,

SDS 10% e glicerol 1% em Tris-HCl pH 6,8, e amperagem constante de 30 mA. O gel foi corado com solução corante composta por 0,25% de Comassie Blue R-250 em ácido acético/metanol/água (1:4:5) e descorado com solução contendo 30% de etanol e 10% de ácido acético em água destilada. Os marcadores de massa molecular utilizados foram:  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactato desidrogenase (34 kDa), endonuclease de restrição Bsp981 (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

### **3.2.7 Digestibilidade *in vitro* de globulinas de linhaça**

Para os ensaios de digestibilidade foram utilizadas frações globulínicas nativas e desnaturadas a 100°C por 5 e 15 minutos, submetidas a metodologia desenvolvida por Araújo *et al.* (2002). Alíquotas de 1,4  $\mu$ l da fração globulina (11 mg/ml em tampão tetraborato de sódio 0,05 M pH 7,5) foram incubados com 5  $\mu$ l de tripsina (0,3 mg/ml) ou 1,0  $\mu$ l de quimotripsina (1,5 mg/ml) ou pancreatina (1,0 mg/ml), separadamente, na proporção de 1:10 enzima/substrato. O volume da suspensão foi ajustado para 10 $\mu$ l com tampão tetraborato de sódio 0,05 M pH 7,5 e o sistema foi mantido sob incubação a 37°C por períodos de 5, 10, 15 e 30 minutos. A reação foi paralisada com 10  $\mu$ l de tampão de amostra para eletroforese. A hidrólise das globulinas foi observada através de eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo e desnaturante (SDS-PAGE) segundo item anterior.

### **3.2.8 Digestibilidade *in vivo* de globulinas da linhaça**

O experimento de digestibilidade de globulinas foi realizado de acordo com o método de Chick; Hutchinson e Jackson (1935), com ratos Wistar adultos, com peso médio de 210g, onde 18 ratos foram divididos em 3 grupos, os quais receberam ração com caseína, ração aprotéica e ração com globulina de linhaça liofilizada, compreendendo 10% de proteína na dieta (Tabela 2).

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas com água e comida *ad libitum* durante 7 dias, dos quais os primeiros 3 dias serviram como período de aclimação e nos últimos 4 dias foram registrados o consumo de ração e peso das fezes, para posterior análise de nitrogênio e determinação da digestibilidade verdadeira (DV) das globulinas. A quantificação do nitrogênio foi realizada através do método de Kjeldahl (AOAC, 1984), como descrito no item 3.2.2. A digestibilidade verdadeira foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$DV = \frac{Ni - (NF1 - NF2)}{Ni} \times 100$$

onde, Ni é o nitrogênio ingerido pelo grupo teste, NF1 o nitrogênio excretado nas fezes pelos animais do grupo teste e NF2 o nitrogênio excretado pelos animais do grupo aprotéico.

TABELA 2. Composição das rações utilizadas no experimento de avaliação da digestibilidade de globulinas da linhaça em ratos Wistar

	g/kg de ração		
	Dieta padrão	Dieta aprotéica	Dieta teste globulina de linhaça
Globulina de linhaça	-	-	100
Caseína	100	-	-
Celulose	50	50	50
Sacarose	100	100	100
Mix de Minerais	35	35	35
Mix de Vitaminas	10	10	10
L-Cistina	1,8	-	-
<i>Terc</i> Butilhidroquinona	0,008	0,008	0,008
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Óleo de soja	40	40	40
Amido	660,7	762,5	662,5

### 3.2.9 Determinação de fatores antinutricionais protéicos na fração albumínica

#### ▲ *Atividade inibitória de proteinases séricas*

Os ensaios de inibição de tripsina foram realizados utilizando o método de Xavier-Filho *et al.* (1989), onde alíquotas de 100 µl de albuminas (0,42 mg/ml) incubadas por 15 minutos a 37°C com 10 µl de solução de tripsina (0,5 mg/ml em Tris-HCl 0,05 M pH 7,5), 120 µl de HCl 2,5 mM e 370 µl de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5. Após o tempo de incubação, foram adicionados 200 µl de azocaseína a 1% seguido de incubação de por mais 30 minutos. A reação foi parada com a adição de 300µl de ácido tricloroacético (TCA) a 20%. Após

centrifugação a 12000 x *g*, à temperatura ambiente, 700 µl do sobrenadante foi alcalinizado com 700 µl de NaOH 2 N e realizada a leitura a 440 nm em espectrofotômetro. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e acompanhados com a realização dos respectivos brancos.

A inibição de quimotripsina e elastase foi determinada como descrito no parágrafo anterior, utilizando 30 µl de quimotripsina (3 mg/ml) e 5 µl de elastase (1 mg/ml), ajustando o volume de tampão para obter um volume final de enzima+tampão igual a 380 µl.

#### ▲ *Atividade inibitória de α-amilases*

A inibição de α-amilase salivar foi realizada de acordo com o método de Mao; Kinsella (1981) utilizando 40 µl de enzima (50 µg/ml), onde foram adicionados 310 µl de tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 contendo NaCl 20 mM e CaCl<sub>2</sub> 20 mM, e 100 µl da fração albumina (0,48 mg/ml), seguido de incubação por 15 minutos a 30°C e adição de 2 ml do substrato amido a 1%. O sistema foi mantido a 30°C por 1 hora e a reação foi interrompida em banho de gelo. Após a adição de substrato aos brancos, 25 µl da suspensão foram adicionados a 2,5 ml de solução de iodo 1 mM e 24 mM de iodeto de potássio. O resultado foi mensurado através de leitura em espectrofotômetro a 565 nm. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e acompanhados com a realização dos respectivos brancos.

A inibição de α-amilase pancreática foi feita de acordo com o protocolo acima descrito, utilizando 10 µl de enzima (2,7 µg/ml).

#### ▲ *Ensaio de Hemaglutinação*

A detecção de lectinas foi realizada segundo metodologia de Debray *et al.* (1981) através de testes de hemaglutinação usando eritrócitos humanos ABO na concentração de 4%, em presença ou ausência de 200 mM de íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$ . Foram utilizadas placas de microtitulação com fundo em V, sendo realizadas diluições seriadas da fração albumina (0,42 mg/ml), onde em cada poço continha 25  $\mu\text{l}$  de amostra e 25  $\mu\text{l}$  da suspensão de eritrócitos. Após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, o grau de hemaglutinação foi examinado. Os controles negativo e positivo foram feitos com solução salina e lectina purificada de mulungu (*Eritrina velutina*), respectivamente. Os resultados foram expressos em Unidade de Hemaglutinação (UH), determinada pelo inverso da máxima diluição capaz de provocar aglutinação visível das hemácias.

### **3.2.10 Análise estatística**

Para realização da análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Graphpad Instat, sendo aplicada a análise de variância (Anova), através dos Testes de Tukey e Coeficiente de Bonferroni, atribuindo significância estatística para  $p < 0,001$ .

## 4 RESULTADOS

---

### 4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A composição centesimal da farinha da linhaça crua foi determinada para orientar o preparo da ração utilizada nos ensaios biológicos. Os resultados das análises bromatológicas da linhaça crua estão expressos na tabela 3 e mostram altos teores de lipídios, proteínas e fibras.

TABELA 3. Composição centesimal da linhaça crua

	g/100g de farinha de linhaça crua $\pm$ DP
Umidade	5,4 $\pm$ 0,11
Proteínas	23,2 $\pm$ 0,07
Lipídios	35,3 $\pm$ 2,1
Cinzas	3,3 $\pm$ 0,04
Fibras	9,8 $\pm$ 1,32
Carboidratos	23

### 4.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE RATOS ALIMENTADOS COM RAÇÃO À BASE DE LINHAÇA

O ensaio biológico de crescimento de ratos Wistar alimentados com ração à base de linhaça foi realizado para avaliar a qualidade do cereal como fonte exclusiva de proteínas, e os resultados deste experimento estão representados na tabela 4 e nas figuras 4 e 5.



TABELA 4. Ganho de peso, consumo de ração, coeficiente de eficácia alimentar, coeficiente de eficácia protéica e coeficiente de retenção protéica (média  $\pm$  DP, n = 6)

	Consumo (g)		Ganho de peso g $\pm$ DP	Índice Biológico		
	ração	proteína		CEA	CEP	CRP
Caseína	292,8 <sup>a</sup> $\pm$ 20,8	29,3 <sup>a</sup> $\pm$ 2,09	101,7 <sup>a</sup> $\pm$ 11,5	0,35 <sup>a</sup>	3,47 <sup>a</sup>	4,10 <sup>a</sup>
Linhaça Crua	188,1 <sup>b</sup> $\pm$ 16,7	18,8 <sup>b</sup> $\pm$ 1,67	27,4 <sup>b</sup> $\pm$ 3,6	0,15 <sup>b</sup>	1,46 <sup>b</sup>	2,45 <sup>b</sup>

Médias, na mesma coluna, identificados com letras diferentes são estatisticamente diferentes, com  $p < 0,001$ .

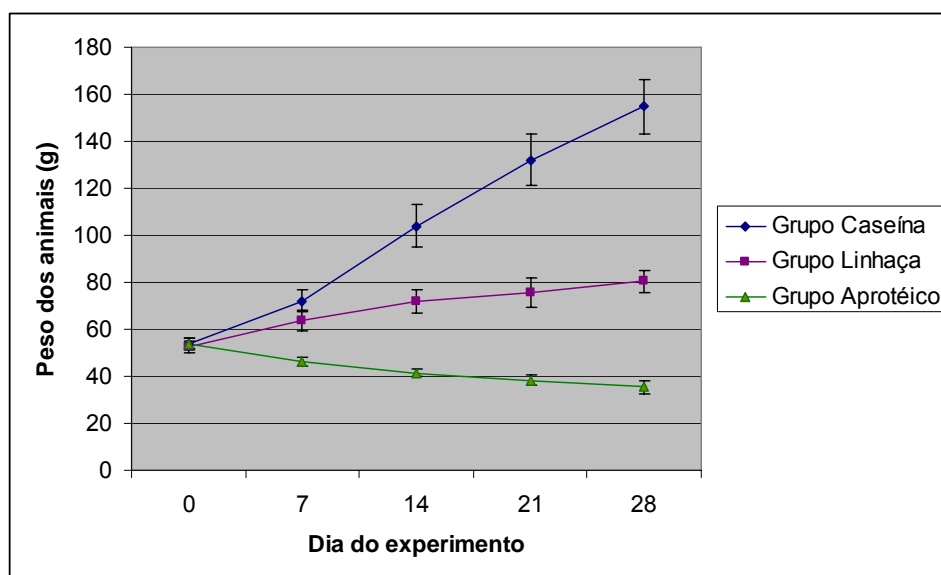


FIGURA 4. Curva de crescimento dos ratos.

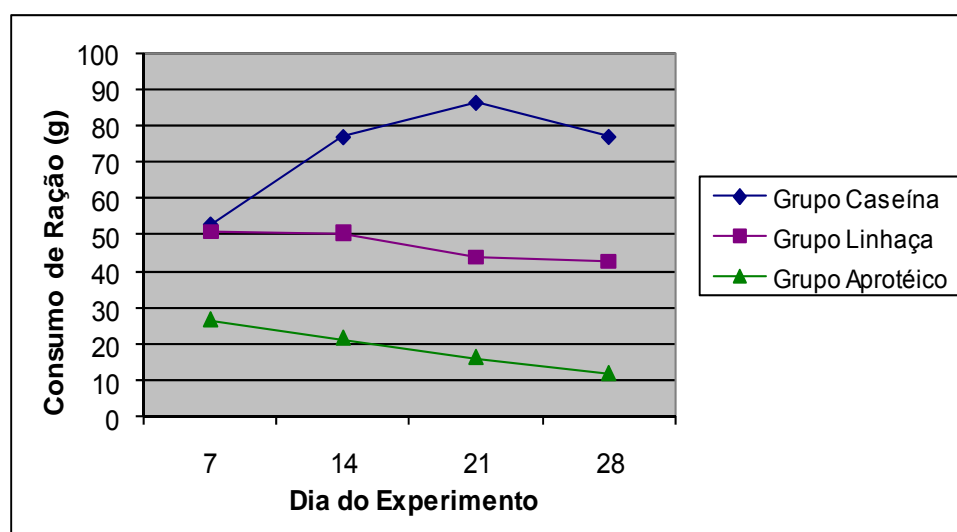


FIGURA 5. Curva de consumo de ração.

O consumo de ração e, conseqüentemente, de proteína pelos animais que ingeriram ração à base de linhaça (GL) foi 36% inferior ao consumo do grupo alimentado com proteína padrão (GP). Esse déficit foi ainda maior em se tratando do ganho de peso dos animais, onde a diferença foi de 73%. Portanto, os valores obtidos dos coeficientes de eficácia alimentar e eficácia protéica refletiram as diferenças observadas, sendo mais de 2,3 vezes maiores para o GP, enquanto que o coeficiente de retenção protéica deste grupo foi 1,6 superior ao GL.

#### 4.3 MORFOMETRIA E MORFOLOGIA DE EPITÉLIO INTESTINAL DE SEGMENTO ILEAL

A análise morfológica do íleo dos animais identificou características normais nas vilosidades do GL, com exceção de raros vilos achatados; a maioria dos vilos era foliácea e abundante em células caliciformes, semelhante ao GP. Nos ratos do grupo aprotéico (GA), observou-se atrofia, achatamento e número reduzido de vilosidades, bem como presença de poucas células secretórias. Não foram encontradas morte celular ou mitose nas criptas em nenhum dos grupos (Figura 6).

A morfometria de segmento ileal do intestino delgado mostrou diminuição da altura dos vilos e profundidade das criptas do GL, embora a relação vilo:cripta nos animais deste grupo tenha sido semelhante à do GP (Tabela 5).

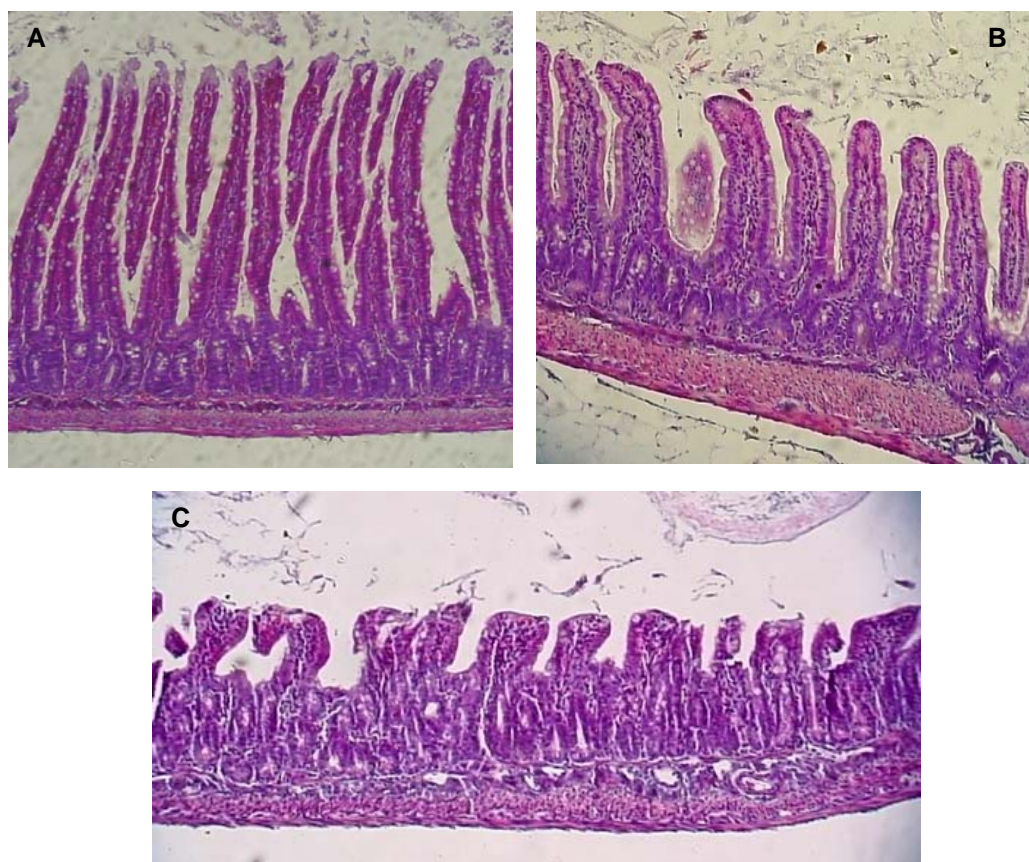


FIGURA 6. Secções histológicas de intestino delgado (íleo) em coloração hematoxilina-eosina (HE). Ratos alimentados com caseína (A), linhaça crua (B) e dieta aprotéica (C). Objetiva de aumento 10X.

TABELA 5. Morfometria de segmento ileal do intestino delgado (Média  $\pm$  DP, n = 2)

Grupo	Vilos ( $\mu\text{m}$ )	Criptas ( $\mu\text{m}$ )	Relação vilo:cripta
Caseína	517 <sup>a</sup> $\pm$ 100	187 <sup>a</sup> $\pm$ 30	2,76 <sup>a</sup> $\pm$ 0,5
Aprotéico	180 <sup>c</sup> $\pm$ 37	96 <sup>b</sup> $\pm$ 20	1,86 <sup>b</sup> $\pm$ 0,2
Linhaça Crua	334 <sup>b</sup> $\pm$ 58	120 <sup>b</sup> $\pm$ 32	2,83 <sup>a</sup> $\pm$ 0,5

Médias, na mesma coluna, identificadas com letras diferentes são estatisticamente diferentes, com  $p < 0,001$ .

#### 4.4 FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DA LINHAÇA

A quantificação das frações protéicas revelou que as globulinas compõem a fração predominante, totalizando cerca de 82% das proteínas da linhaça, enquanto que o percentual de albuminas foi de 12% (tabela 6).

TABELA 6. Fracionamento e quantificação das proteínas da linhaça

Fração	mg/ml	% do total de proteínas
Albumina	2,3 ± 0,6	12
Globulina	15,4 ± 2,3	82
Prolamina	0,2 ± 0,01	1
Glutelina	0,9 ± 0,1	5

#### 4.5 SDS-PAGE DAS PRINCIPAIS FRAÇÕES PROTÉICAS DA LINHAÇA

A figura 7 mostra o perfil eletroforético das duas principais frações protéicas da linhaça, as albuminas e globulinas. Na fração globulínica, foi possível observar 04 bandas mais intensas, uma de alta massa molecular, possivelmente um aglomerado de globulinas, e 3 bandas protéicas de massa molecular entre 40 e 55 kDa. Também foram observadas bandas de baixa massa molecular, abaixo de 34 kDa e outras por volta de 10 kDa. Na fração albumínica também foram identificadas várias bandas, com predominância de uma única banda de cerca de 21 kDa.

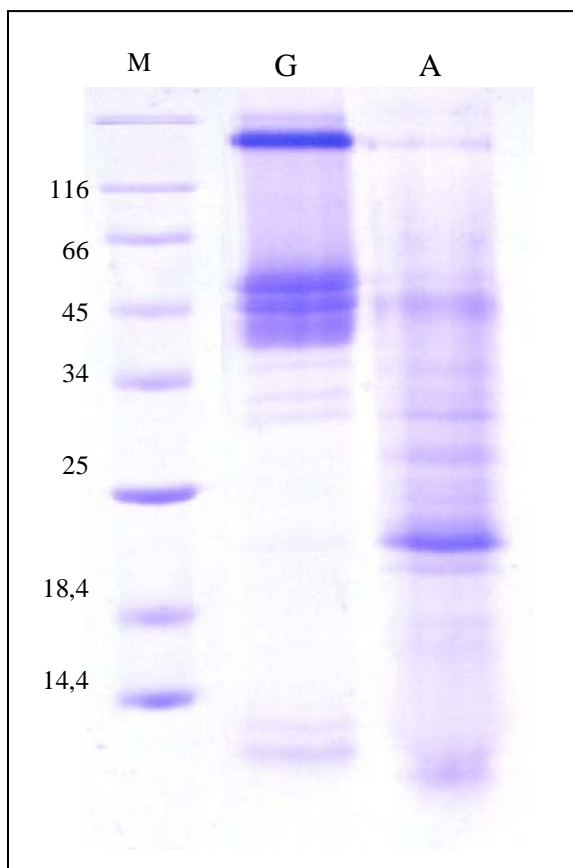


FIGURA 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) das frações albumina (A) e globulina (G) (15  $\mu$ g). Marcadores de massa molecular (M):  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactase desidrogenase (34 kDa), endonuclease de restrição Bsp981 (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

#### 4.6 DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DAS GLOBULINAS DA LINHAÇA

Os ensaios de digestibilidade *in vitro* das globulinas de linhaça, visualizados por SDS-PAGE, mostraram que a fração globulina, quando nativa, foi pouco suscetível à degradação enzimática por quimotripsina (figura 8-A), podendo ser observadas várias bandas protéicas de alta massa molecular (entre 25 e 55 kDa) mesmo após trinta minutos de incubação. A desnaturação por calor teve pouca influência na digestibilidade quando o tempo de fervura foi de 5 minutos (figura 8-B), mas foi eficaz com o tempo aumentado para 15 minutos (figura 8-C), onde se verificou que aos 15 minutos de incubação com a quimotripsina as bandas maiores desapareceram ou ficaram pouco nítidas, mostrando a degradação quase que completa.

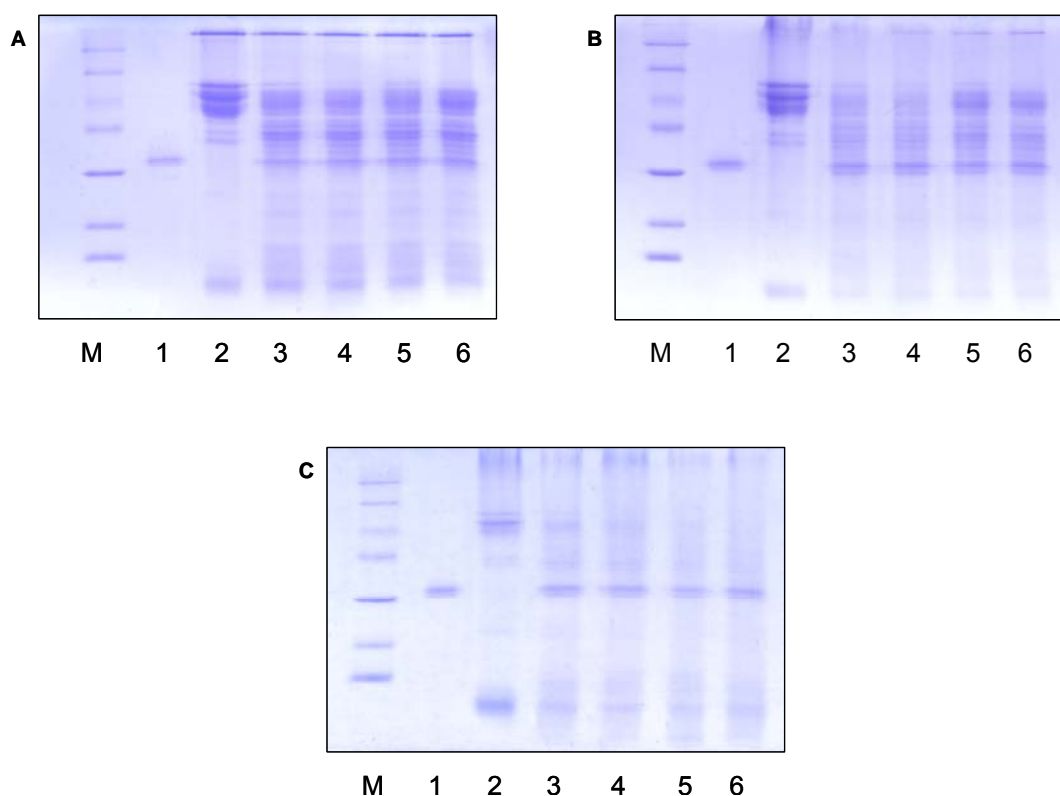


FIGURA 8. Digestibilidade *in vitro* de globulinas da linhaça por quimotripsina (SDS-PAGE) (A) Globulina nativa (B) Globulina desnaturada a 100°C por 5 minutos (C) Globulina desnaturada a 100°C por 15 minutos. (M) Marcador de massa molecular (1) Quimotripsina (2) amostra (3) 5' 37°C (4) 10' 37°C (5) 15' 37°C e (6) 30' 37°C. Marcadores de massa molecular (M):  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactase desidrogenase (34 kDa), endonuclease de restrição Bsp981 (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

A digestão por tripsina foi ainda menos efetiva que a ação da quimotripsina em se tratando da globulina nativa (figura 9-A). No entanto, a digestibilidade da fração melhorou sensivelmente quando ela foi desnaturada durante 5 minutos de fervura, pois aos 15 minutos de incubação as bandas são escassas e pouco evidentes (figura 9-B); Na figura 9-C, isto ocorre já no primeiro tempo de incubação (5 minutos), permanecendo apenas uma forte banda de baixo massa molecular com aproximadamente 10 kDa.

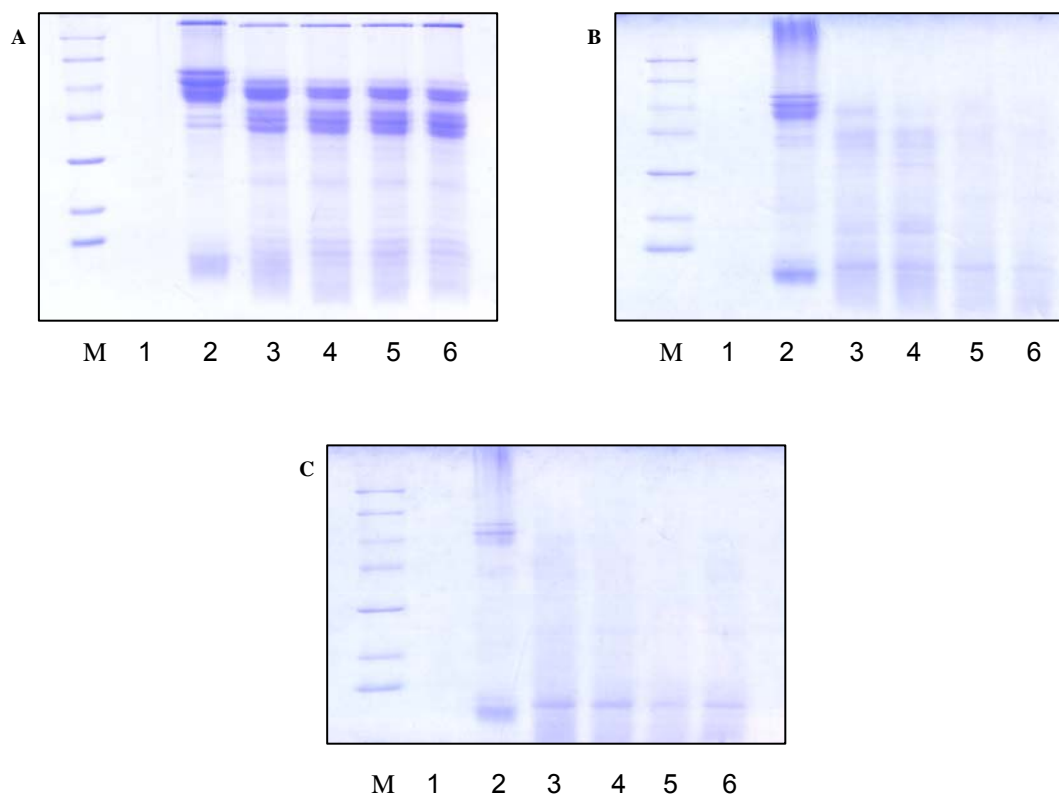


FIGURA 9. Digestibilidade in vitro de globulinas da linhaça por tripsina (SDS-PAGE) (A) Globulina nativa (B) Globulina desnaturada a 100°C por 5 minutos (C) Globulina desnaturada a 100°C por 15 minutos. (M) Marcador de massa molecular (1) Tripsina (2) amostra (3) 5' 37°C (4) 10' 37°C (5) 15' 37°C e (6) 30' 37°C. Marcadores de massa molecular (M):  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactase desidrogenase (34 kDa), endonuclease de restrição Bsp981 (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima

Quando foi utilizada a pancreatina para verificar a digestão das globulinas, foi observada a degradação completa das bandas de alta massa molecular da fração na sua forma nativa. No entanto, independente do tempo de incubação, ainda se conservaram muitas bandas intermediárias, produtos da degradação das bandas de maior massa (Figura 10-A). A digestão foi claramente aumentada quando as globulinas foram fervidas (Figura 10-B), aos 30 minutos de incubação quase não se pode mais observar bandas no gel. O maior tempo de desnaturação (Figura 10-C) promoveu melhor digestão, onde a ação conjunta das enzimas presentes na pancreatina em apenas 5 minutos de incubação demonstrou grande degradação das bandas protéicas.

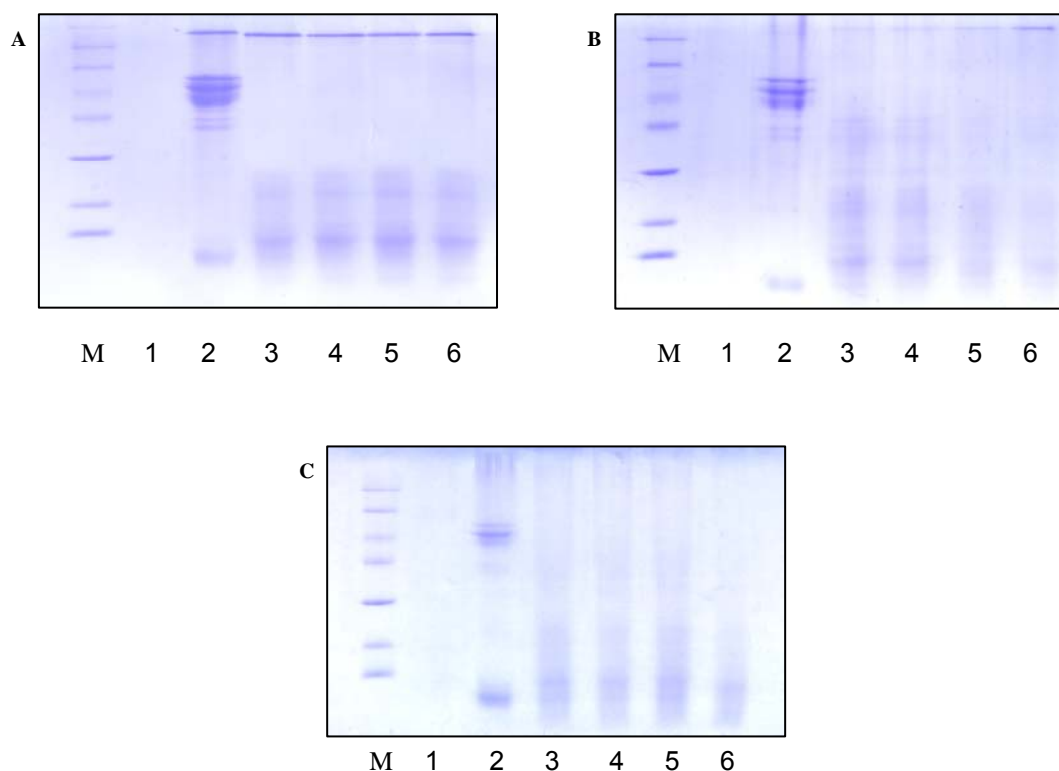


FIGURA 10. Digestibilidade in vitro de globulinas da linhaça por pancreatina (SDS-PAGE) **(A)** Globulina nativa **(B)** Globulina desnaturada a 100°C por 5 minutos **(C)** Globulina desnaturada a 100°C por 15 minutos. (M) Marcador de massa molecular (1) Pancreatina (2) amostra (3) 5' 37°C (4) 10' 37°C (5) 15' 37°C e (6) 30' 37°C. Marcadores de massa molecular (M):  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactase desidrogenase (34 kDa), endonuclease de restrição Bsp981 (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima



#### 4.7 DIGESTIBILIDADE *IN VIVO* DAS GLOBULINAS DA LINHAÇA

O experimento de digestibilidade *in vivo* da principal fração protéica da linhaça revelou que as globulinas deste cereal tiveram digestibilidade semelhante à da caseína.

TABELA 7. Digestibilidade *in vivo* das globulinas de linhaça (%  $\pm$  DP)

Proteína	Digestibilidade
Caseína	91,7 $\pm$ 5,0
Globulina de linhaça	93,2 $\pm$ 2,0

#### 4.8 FATORES ANTINUTRICIONAIS NA FRAÇÃO ALBUMINA DA LINHAÇA

Os ensaios de inibição de enzimas digestivas pela fração albumina mostraram a presença de grande quantidade de inibidores de tripsina, que resultou em 100% de inibição desta enzima. A presença de inibidores reduziu em 28,3% a atividade da quimotripsina, enquanto que as demais enzimas, elastase pancreática e  $\alpha$ -amilases, tiveram baixa redução em sua atividade na presença das albuminas de linhaça (Figura 11). Não foi detectada atividade hemaglutinante nas albuminas com nenhum dos eritrócitos utilizados.

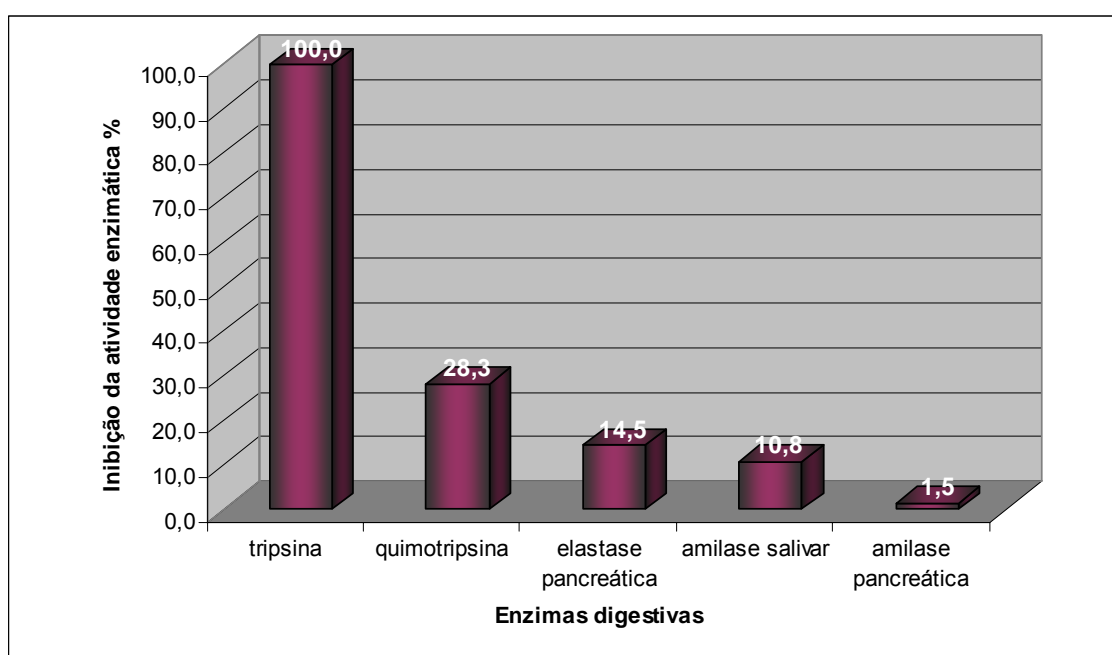


FIGURA 11. Inibição da atividade de enzimas digestivas pela fração albumina da linhaça.

## 5 DISCUSSÃO

---

Atualmente, há um crescente interesse da população em incluir nos seus hábitos diários o consumo de alimentos que promovam benefícios à saúde, os chamados alimentos com propriedades nutracêuticas ou funcionais. Dentre eles tem se destacado a linhaça, que é utilizada geralmente na forma crua, como suplemento alimentar. A composição da farinha de semente de linhaça analisada neste estudo apresentou altos teores de lipídios (35,3%) proteínas (23,2%) e fibras (13,4%), que foram similares aos encontrados em outros estudos (MADHUSUDHAN; SINGH, 1983, TREVINO *et al.*, 2000, COSKUNER; KARABABA, 2007).

No fracionamento das proteínas da semente foi verificada a predominância de proteínas do tipo globulinas, compreendendo 82% do total de proteínas da linhaça, 12% de albuminas, 5% de glutelinas e 1% de prolaminas. O teor elevado de globulinas na linhaça foi descrito por Madhusudhan e Singh (1985b), que mostraram que a linhaça possuía de 70 a 85% deste tipo de proteína de reserva e Sammour (1999) que publicou percentuais mais baixos em torno de 40% de globulinas. Essas divergências em relação à literatura podem ser justificadas pelas variações proporcionadas pelo método de análise utilizado e pela variedade de linhaça estudada. Portanto, a linhaça, assim como a aveia, possui como proteínas de reserva predominante as globulinas, assemelhando-se às leguminosas e não aos cereais que possuem ou prolaminas ou glutelinas como suas principais proteínas de reserva (SHEWRY, 1995).

Análise das frações protéicas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS mostrou que a fração albumina possui bandas protéicas de massa molecular em torno de 21 kDa, característica de inibidores de tripsina e outras com massas moleculares menores (RYAN, 1973, RICHARDSON, 1991). Nas globulinas foram visualizadas predominantemente 04 bandas mais intensas, uma de alta massa molecular, possivelmente aglomerado de proteínas, e 3 bandas protéicas de massa molecular entre 40 e 55 kDa. Madhusudhan e Singh (1985b) isolaram a principal proteína da fração globulínica e verificaram que a proteína 12S da linhaça mostrou em SDS-PAGE pelo menos cinco subunidades não idênticas com massas moleculares de 11 kDa, 18 kDa, 29 kDa, 42 kDa e 61 kDa, sendo as bandas de 18 kDa e 42 kDa mais intensas. O estudo de Chung, Lei e Li-Chan (2005) constatou a presença de pelo menos 15 bandas protéicas dentre as quais se destacaram proteínas de 40 e 48 kDa, apresentando perfil eletroforético bastante semelhante ao reportado. Alguns autores verificaram que em condições redutoras as globulinas de linhaça apresentam bandas de menor massa molecular, que não aparecem em condições não-redutoras, sugerindo a dissociação de cadeias ligadas por pontes dissulfeto (OOMAH; MAZZA, 1998, SAMMOUR, 1999, CHUNG; LEI; LI-CHAN, 2005). Esse comportamento é típico de proteínas de reserva 11S compostas por cadeias ácidas e básicas S-S ligadas que caracterizam as proteínas tipo-leguminas (SAMMOUR, 1999), uma vez que as vicilinas são desprovidas de pontes dissulfeto (KHAN; GATEHOUSE; BOULTER, 1980, CASEY *et al.*, 1988, PEDALINO *et al.*, 1992, MACEDO *et al.*, 1995, SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995, CARBONARO, 2006).

Diferente de outros cereais, o teor de proteínas da linhaça foi comparável ao das leguminosas (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995, NAVES *et al.*, 2004). Para verificar essa qualidade protéica da linhaça como única fonte de aminoácidos, foi realizado um experimento de avaliação dos seus efeitos no crescimento de ratos recém-desmamados. Os resultados obtidos mostraram que em todos os parâmetros analisados (índices biológicos), não apenas o consumo de alimentos foi determinante para a redução do crescimento dos animais usados nos estudos. Trabalhos de mesma natureza também verificaram déficit no ganho de peso de ratos alimentados com ração tendo como fonte protéica a linhaça, onde foi atribuído baixa qualidade nutricional deste alimento devido aos índices de crescimento insatisfatórios dos animais (LEITE *et al.*, 2006, LENZI *et al.*, 2006, MUNIZ *et al.*, 2006). Arora e Rajni (2006) asseguraram a inocuidade da incorporação da linhaça à dieta, onde a inclusão de até 25% de linhaça na ração de ratos mostrou alto valor biológico, mas outros estudos demonstraram efeitos adversos na utilização de linhaça como suplemento na alimentação de animais.

Após o ensaio de avaliação do crescimento dos ratos alimentados com ração a base de linhaça, foi realizada a morfometria de epitélio intestinal do segmento ileal dos ratos testados, sendo demonstrado que o consumo de linhaça crua provocou diminuição no trofismo intestinal dos vilos quando comparado ao do grupo que consumiu caseína. No entanto, não foi observada hiperplasia compensatória das criptas, fazendo com que a relação vilo:cripta tenha se mantido semelhante a do grupo protéico (caseína), o que não foi verificado no grupo aprotéico. Rangel *et al.* (2004) descreveram aspectos histológicos normais em epitélio intestinal de ratos alimentados com isolado

protéico de feijão, mesmo tendo observado diminuição na taxa de crescimento dos animais.

A relação entre o baixo crescimento dos ratos associado à diminuição no trofismo intestinal dos vilos poderia ser um indicativo do efeito deletério da linhaça crua, entretanto não explica totalmente este efeito. Para isso foi analisada a relação entre os fatores protéicos antinutricionais (inibidores de enzimas digestivas de mamíferos e lectinas) presentes na fração albumina da linhaça e a digestibilidade *in vitro* e *in vivo* da fração globulina (proteína de baixa digestibilidade) com a taxa de crescimento dos ratos, a fim de elucidar este efeito deletério.

Avaliações de qualidade nutricional de diversas leguminosas e cereais comumente chamam atenção para os efeitos lesivos que os compostos antinutricionais (proteínas deletérias e indigestas) podem causar, principalmente quando esses alimentos são utilizados na forma crua. Experimentos realizados com diferentes cultivares brasileiros de soja atribuíram o efeito negativo no crescimento dos ratos a presença de lectinas e inibidores de tripsina, além de outros compostos tóxicos (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Leguminosas do gênero *Canavalia* alcançaram coeficientes ainda menores que os encontrados para linhaça, mesmo ofertando grãos cozidos e torrados aos animais; eles identificaram a presença de altos teores de compostos fenólicos e lectinas na leguminosa crua, e embora a submetessem a tratamentos térmicos, constataram uma ação deletéria dos compostos antinutricionais que permaneceram ativos (SEENA; SRIDHAR; RAMESH, 2005, SEENA *et al.*, 2006). Até mesmo o uso de isolados protéicos de feijão (*Vigna unguiculata*) foi capaz de acarretar prejuízos ao crescimento de ratos, mostrando efetivamente

a interferência da presença de inibidores de tripsina nos índices de crescimento (RANGEL *et al.*, 2004). Lee, Olomu e Sim (1991) reportaram diminuição do crescimento e redução na eficiência alimentar em frangos que se alimentaram com dietas com 10 e 20% de linhaça; a inclusão de linhaça de 10 a 30% na dieta de frangos resultou em significativa redução na taxa de crescimento e o resultado foi relacionado a fatores antinutricionais. Treviño *et al.* (2000) afirmaram que, apesar de boa qualidade aminoacídica, a adição de linhaça como fonte protéica na ração de frangos provocou redução na retenção de nitrogênio e aminoácidos, provavelmente causada pela presença de compostos antinutricionais.

Muitos estudos com animais monogástricos têm relacionado os efeitos deletérios, principalmente alterações metabólicas do pâncreas (aumento da secreção enzimática, hipertrofia e hiperplasia) e redução da taxa de crescimento, à presença de inibidores de tripsina na alimentação (ALWESALI *et al.*, 1995). Nitsan e Liener (1976) estudaram o efeito de dietas com farinha de soja crua e aquecida sobre os níveis de tripsina, quimotripsina e amilase no pâncreas de ratos. Estes autores concluíram que a ingestão de soja crua, ao contrário da soja cozida, estimulou a secreção das enzimas pancreáticas. Neste caso, o inibidor de tripsina bloqueia a ação da tripsina resultando em aumento excessivo da concentração plasmática de colecistocinina, e desta forma, o pâncreas é continuamente estimulado a liberar mais enzima, provocando hipertrofia pancreática (LIDDLE; GOLDFINE; WILLIAMS, 1984). Bender (1987) relatou que existem discordâncias entre autores sobre a hipertrofia de pâncreas em animais, uma vez que, alguns pesquisadores observaram aumento do número de células e outros aumentos do tamanho das

células ou ambos fenômenos. Os resultados da pesquisa de Grant *et al.* (1988), com ratos alimentados com proteína de soja, mostraram considerável aumento do tamanho do pâncreas dos animais. Diferentemente de ratos e galinhas, a ingestão de farinha de soja e feijão crus por porcos da Índia, bezerros, cachorros e porcos não provocou hipertrofia pancreática, contudo, observou-se hiposecreção das enzimas pancreáticas e sérica, depressão do ganho de peso corporal ou perda de peso de animais (HASDAI *et al.*, 1989). A inibição do crescimento em animais jovens alimentados com leguminosas cruas é provocada pela excessiva perda fecal de proteína secretada pelo pâncreas, visto que as enzimas pancreáticas são ricas em aminoácidos sulfurados e esta perda endógena não pode ser compensada pela ingestão de proteína de leguminosas (RACKIS; GUMBMANN, 1982).

Outro fator antinutricional associado a baixas taxas de crescimento, quando presente na dieta, é a indigestibilidade de proteínas. As globulinas e outras proteínas de reserva são altamente indigestas devido a sua complexa forma estrutural que é bastante refratária à ação de enzimas digestivas de mamíferos (SHUTOV *et al.*, 1995).

Os experimentos de digestibilidade *in vitro* mostraram que a fração globulínica de linhaça nativa tem baixa digestibilidade por quimotripsina e tripsina isoladamente e alta digestibilidade quando submetida à ação com pancreatina. A resistência de globulinas nativas à degradação por tripsina e quimotripsina é mostrada para esta classe de proteínas em diversas sementes (SEIDL; JAFFÉ; JAFFÉ, 1969, SATHE; VENKATACHALAM, 2007), embora algumas vezes a tripsina atue melhor que a quimotripsina na sua digestão (NEVES; LOURENCO, 1995, ARAUJO *et al.*, 2002). Oliveira *et al.* (2004)



também verificaram baixa digestibilidade por tripsina e quimotripsina de globulinas de oito cultivares brasileiros de feijão (*Vigna unguiculata*) que, no entanto, quando submetidas à digestão por pepsina, apresentaram grande degradação. Uma melhor digestibilidade da faseolina (globulina de *Phaseolus vulgaris*) foi observada quando realizada uma digestão seriada com pepsina e pancreatina (GENOVESE; LAJOLO, 1996a). Isto foi igualmente verificado por Sathe e Venkatachalam (2007) para globulinas de *Vigna aconitifolia*, que afirmaram que o fato se deve a uma menor especificidade de hidrólise da pepsina em relação à tripsina e quimotripsina, e porque o pH ideal da pepsina (entre 1 e 2) usado nos ensaios de digestibilidade pode provocar a desnaturação das proteínas, aumentando a susceptibilidade do substrato à proteólise. Apesar da fração nativa não ter sido submetida à hidrólise por pepsina, acredita-se que a digestibilidade poderia ser melhorada na presença dessa enzima, embora alguns autores certifiquem pouca susceptibilidade à hidrólise por pepsina de globulinas nativas (LIENER; THOMPSON, 1980, DESHPANDE; NIELSEN, 1987, ARAÚJO *et al.*, 2002). Essas divergências de resultados provavelmente se devem a diferenças de conformação estrutural nas proteínas estudadas (leguminas, vicilinas e ou proteínas semelhantes a estas), que conferem maior ou menor suscetibilidade à degradação pelas enzimas digestivas de mamíferos.

O tratamento térmico das globulinas de linhaça melhorou a digestibilidade tanto para tripsina e quimotripsina quanto para a pancreatina, mostrando que a desnaturação é eficaz no aumento da proteólise. Na digestão das globulinas aquecidas a 100°C por 15 minutos foram observadas bandas de baixa massa molecular que possivelmente seriam degradadas com o aumento

do tempo de incubação com as enzimas. Numerosos estudos comprovam o uso de tratamento térmico como meio de melhorar a digestibilidade de globulinas (SALES; MACEDO; XAVIER-FILHO, 1992, SATHE; IDOURAINE; WEBER, 1994, NEVES, LOURENCO; DA SILVA, 1996, ARAÚJO *et al.*, 2002, LIMA *et al.*, 2004, GUO; YAO; CHEN, 2007, SATHE; VENKATACHALAM, 2007).

Ainda que verificada uma grande proteólise das globulinas da linhaça termicamente tratadas, a digestibilidade *in vivo* da fração nativa foi verificada para auxiliar na elucidação dos efeitos negativos no crescimento dos ratos quando linhaça crua foi adicionada à dieta. Quando avaliada a degradação das globulinas nativas durante a digestão em ratos, foi constatado um alto percentual de digestibilidade (93,2%), similar ao da proteína padrão (91,7%). Santoro, Grant e Pusztai (1997) ofertaram faseolina com alto grau de purificação para ratos e constataram apenas 37,5% de digestibilidade; Rangel *et al.* (2004) encontraram um percentual de digestibilidade de 86,9% para um isolado protéico de feijão de corda (*Vigna unguiculata*); já para globulinas de grão de bico (*Cicer arietinum*) foi determinada uma digestibilidade de 83,6% (RUBIO *et al.*, 1998). O resultado obtido para as globulinas de linhaça é bastante interessante, visto que valores tão adequados de digestibilidade para uma fração ou isolado protéico de sementes são raramente encontrados na literatura (Rubio *et al.*, 1994), até mesmo em se tratando de alimentos ou proteínas processadas termicamente (COELHO; SGARBIERI, 1995, OLGUIN *et al.*, 2003, MUKHOPADHAY; RAY, 2005, SEENA; SRIDHAR; RAMESH, 2005, SEENA, *et al.*, 2006). Os resultados obtidos comprovam a boa qualidade protéica da fração globulínica da linhaça, pois sabe-se que alta digestibilidade

das proteínas de um alimento é uma característica que atesta sua qualidade nutricional.

Uma vez demonstrado que a fração globulínica da linhaça possui uma boa digestibilidade, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (pancreatina), foi feita a verificação da presença de fatores antinutricionais protéicos na fração albumínica, onde foi detectada a presença de alto teor de inibidores de enzimas digestivas, com destaque aos inibidores de tripsina e, em menor relevância, para inibidores de quimotripsina. Madhusudhan e Singh (1983) também observaram a presença de inibidores de tripsina, no entanto eles analisaram extratos protéicos de farinha de linhaça processada (descascada, delipidada e isenta de mucilagens); em seu estudo não foi detectada atividade inibitória para  $\alpha$ -amilase salivar, e assim como no presente trabalho, não foi detectada atividade hemaglutinante. Os inibidores de proteases são os maiores constituintes protéicos de sementes incluindo cereais, feijões e tubérculos (5 a 15% das proteínas), pois os níveis de inibidores excedem os níveis necessários para o controle da proteólise celular, tornando-se assim, fatores antinutricionais que afetam negativamente o crescimento de animais jovens (KLOSE; HILL; FEVOLD, 1946, JONGSMA; BOLTER, 1997). Alguns autores descreveram uma inativação de inibidores de proteinases após o trânsito pelo estômago, demonstrando que a digestão gástrica é capaz de destruir os inibidores da família Kunitz, enquanto que os da família Bowman-Birk retêm sua atividade; isso acontece devido a maior quantidade de pontes dissulfeto presente nessa família de inibidores, que proporciona maior estabilidade à sua estrutura (ALARCON; MOYANO; DIAZ, 1999). Experimentos feitos com animais de laboratório indicam que a ingestão de inibidores de tripsina tem como

conseqüência imediata a hipertrofia pancreática, havendo assim uma limitação de aminoácidos para a síntese protéica normal nos demais tecidos, reduzindo então o crescimento e desenvolvimento de cobaias e larvas de insetos (BROADWAY, 1995).

É importante enfatizar que apesar da detecção de alta atividade inibitória de tripsina, que constitui um potencial fator antinutricional causador do retardo no crescimento dos animais, não se pode descartar a ação de outros compostos antinutricionais (os quais não foram alvo de análises no presente trabalho) – antagonista de vitamina B6 (linatina), glicosídeos cianogênicos, ácido fítico, taninos, alérgenos, metais pesados e goitrógenos – que possam atuar sinergisticamente, causando os efeitos deletérios quando a linhaça é consumida na forma crua (MADHUSUDHAN; SINGH, 1983, ALONSO *et al.*, 1996, NIEDZWIEDZ-SIEGIEN, 1998, OOMAH; MAZZA, 1998, BATTY, 1995, *apud* TREVIÑO *et al.*, 2000, ALZUETA *et al.*, 2002, RODRIGUEZ-RODRIGUEZ; LEON; CUEVAS, 2003, ANGELOVA *et al.*, 2004, MUKHOPADHAY; RAY, 2005, CONNORS; YANG; LACUESTA, 2006).

Deste modo, embora a linhaça possua substâncias com alegação de propriedade funcional e traga em sua composição elevado teor de proteínas de boa qualidade nutricional, a presença de inibidores de tripsina e outros fatores antinutricionais limitam a sua utilização como única fonte de proteína na alimentação sob a forma crua, representando um perigo para a saúde. A denominação da linhaça como “alimento funcional” é então questionada, uma vez que essa classificação, segundo resoluções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2002), é direcionada a nutrientes presentes nos alimentos, sendo atribuída propriedade funcional aos compostos

e não ao alimento como um todo; além disso, o alimento deve ser seguro para o consumo humano, sem necessidade de orientação e ou acompanhamento médico (BRASIL, 1999a, BRASIL, 1999b, BRASIL, 1999c). Os resultados encontrados demonstram a necessidade de estudos complementares que possam auxiliar na determinação da quantidade e formas seguras de consumo da linhaça com o intuito de isentá-lo de riscos à saúde.

## 6 CONCLUSÕES

---

- ✦ A composição centesimal da linhaça crua corroborou os altos teores de lipídios (35,3%), proteínas (23,2%) e fibras (13,4%) descritos na literatura;
- ✦ O fracionamento das proteínas da linhaça resultou em 82% de globulinas, 12% de albuminas, 5% de glutelinas e 1% de prolaminas;
- ✦ A eletroforese das principais frações mostrou que nas albuminas há bandas de massa molecular semelhante à de inibidores de proteinases encontrados em sementes, e que as globulinas apresentaram padrão eletroforético semelhante ao de vicilinas;
- ✦ Os ensaios biológicos demonstraram déficit no crescimento de animais alimentados com linhaça crua, efeito observado tanto através dos parâmetros nutricionais quanto na diminuição do trofismo dos vilos intestinais;
- ✦ A digestibilidade *in vitro* das globulinas nativas da linhaça foi efetiva apenas sob a ação da pancreatina, porém após o tratamento térmico o uso das enzimas tripsina e quimotripsina isoladamente foi capaz de promover boa digestão das globulinas.

⤴ A análise da digestão *in vivo* das globulinas comprovou a alta digestibilidade das mesmas, atingindo um percentual de 93,2% semelhante ao da proteína padrão (91,7%);

⤴ A fração albumínica da linhaça apresentou alta de inibição da atividade trípica (100%), assim como inibição menos significativa de quimotripsina (28,3%); a inibição de elastase pancreática (14,5%),  $\alpha$ -amilase salivar (10,8%) e  $\alpha$ -amilase pancreática (1,5%) foi considerada baixa, e não foi detectada atividade hemaglutinante;

⤴ A linhaça é um alimento que possui substâncias com propriedades funcionais que, no entanto, apresenta em sua composição fatores antinutricionais, os quais podem acarretar danos ao organismo, devendo, portanto, ser recomendada para consumo na sua forma crua apenas mediante estudos que ratifiquem a sua qualidade nutricional.

## REFERÊNCIAS

---

ALARCON, F. J.; MOYANO, F. J.; DIAZ, M. Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). **Aquatic Living Resources**. v. 12, n. 4, p. 233-238, 1999.

ALONSO *et al.* Anaphylaxis caused by linseed (flaxseed) intake. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 98, n. 2, p. 469-470, 1996.

ALONSO, R.; ORUE, E.; MARZO, F. Effects of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds. **Food Chemistry**. v. 63, n. 4, p. 505-512, 1998.

ALWESALI *et al.* The influence of pea seed trypsin-inhibitors on the *in vitro* digestibility of casein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 68, n. 4, p. 431-437, 1995.

ALZUETA *et al.* Effects of removal of mucilage and enzyme or sepiolite supplement on the nutrient digestibility and metabolizable energy of a diet containing linseed in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**. v. 97, n. 3-4, p. 169-181, 2002.

ANGELOVA *et al.* Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). **Industrial Crops and Products**. v. 19, n. 3, p. 197-205, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods for Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14 ed. Arlington: AOAC International, 1984.

ARAÚJO *et al.* In vitro digestibility of globulins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and xerophitic algaroba (*Prosopis juliflora*) seeds by mammalian digestive proteinases: a comparative study. **Food Chemistry**. v. 78, n. 2, p. 143-147, 2002.

ARORA, S.; RAJNI, M. Carbohydrates, minerals, phytic acid contents and in vivo protein quality of different cultivars of linseed. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**. v. 43, n. 2, p. 157-160, 2006.

AXELSON, M.; SETCHELL, K. D. R. The excretion of lignans in rats - evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds. **Febs Letters**. v. 123, n. 2, p. 337-342, 1981.

BARDOCZ *et al.* The effect of phytohaemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat. **British Journal of Nutrition**. v. 76, n. 4, p. 613-626, 1996.



BAU, H. M.; VILLAUME, C.; GIANNANGELI, F. Optimization of soybean protein qualities. **Sciences Des Aliments**. v. 21, n. 2, p. 133-147, 2001.

BELL, J. M.; KEITH, M. O. Nutritional-evaluation of linseed meals from flax with yellow or brown hulls, using mice and pigs. **Animal Feed Science and Technology**. v. 43, n. 1-2, p. 1-18, 1993.

BENDER, A. E., Effects on nutritional balance: antinutrients. In: WATSON, D. H. **Natural toxicants in food: progress and prospects**. London: Ellis Horwood International Publishers, 1987. p. 110-124.

BERNARDINO-NICANOR, A.; SCILINGO, A. A.; ANON, M. C.; DAVILA-ORTIZ, G. Guava seed storage protein: Fractionation and characterization. **Lwt-Food Science and Technology**. v. 39, n. 8, p. 902-910, 2006.

BHANDARI, M. R.; KAWABATA, J. Cooking effects on oxalate, phytate, trypsin and alpha-amylase inhibitors of wild yam tubers of Nepal. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 19, n. 6-7, p. 524-530, 2006.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Resolução ANVS/MS nº 19 de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico para procedimento de registro de alimento com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem.

BRASIL. Resolução ANVS/MS nº 18 de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.

BRASIL. Resolução ANVS/MS nº 17 de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança dos alimentos.

BRASIL. Resolução RDC nº 2 de 07 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde.

BRESSANI, R.; ELIAS, L. G.; MOLINA, M. R. Protein digestibility of some legume foods. **Archivos Latinoamericanos De Nutricion**. v. 27, n. 2, p. 215-231, 1977.

BRIAN, A. L. Seed storage proteins: Characterization and biosynthesis. **The Biochemistry of Plants**. v. 6, n., p. 449-485, 1981.

BROADWAY, R. M. Are insects resistant to plant proteinase-inhibitors? **Journal of Insect Physiology**. v. 41, n. 2, p. 107-116, 1995.

BURGESS, S. R.; SHEWRY, P. R. Identification of homologous globulins from embryos of wheat, barley, rye and oats. **Journal of Experimental Botany**. v. 37, n. 185, p. 1863-1871, 1986.

CARBONARO, M. 7S globulins from *Phaseolus vulgaris* L.: Impact of structural aspects on the nutritional quality. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 70, n. 11, p. 2620-2626, 2006.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SA, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**. v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

CASEY *et al.* The structure, expression and arrangement of legumin genes in peas. **Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen**. v. 183, n. 2-3, p. 173-180, 1988.

CHICK, H.; HUTCHINSON, J. C.; JACKSON, H. M. The biological value of proteins: Further investigation of the balance sheet method. **Biochem. J.** v. 29, n. 7, p. 1702-1711, 1935.

CHUNG, M. W. Y.; LEI, B.; LI-CHAN, E. C. Y. Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Food Chemistry**. v. 90, n. 1-2, p. 271-279, 2005.

CLEMENTE *et al.* Effect of cooking on protein quality of chickpea (*Cicer arietinum*) seeds. **Food Chemistry**. v. 62, n. 1, p. 1-6, 1998.

COELHO, R. G.; SGARBIERI, V. C. Nutritional evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) protein - *in vivo* versus *in vitro* procedure. **Journal of Food Biochemistry**. v. 18, n. 5, p. 297-309, 1995.

CONNORS, L. A.; YANG, W. H.; LACUESTA, G. A. Case reports of seed anaphylaxis: Mustard, flax and sunflower seed. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 117, n. 2, p. S52-S52, 2006.

COSKUNER, Y.; KARABABA, E. Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Journal of Food Engineering**. v. 78, n. 3, p. 1067-1073, 2007.

DALAIS *et al.* Effects of a diet rich in phytoestrogens on prostate-specific antigen and sex hormones in men diagnosed with prostate cancer. **Urology**. v. 64, n. 3, p. 510-515, 2004.

DAVIDSON, E.; STEWART, D. Novel mannose binding lectins from agricultural crops. **Industrial Crops and Products**. v. 19, n. 2, p. 137-146, 2004.

DE ALGELIS, R. C. Valor nutricional das proteínas. métodos de avaliação. **Cadernos de Nutrição**. v. 10, n., p. 8-29, 1995.

DEBRAY *et al.* Specificity of 12 lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to n-glycosylproteins. **European Journal of Biochemistry.** v. 117, n. 1, p. 41-55, 1981.

DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D. J.; BOULTER, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. **Phytochemistry.** v. 15, n. 1, p. 3-24, 1976.

DESHPANDE, S. S.; DAMODARAN, S. Heat-induced conformational changes in phaseolin and its relation to proteolysis. **Biochimica Et Biophysica Acta.** v. 998, n. 2, p. 179-188, 1989a.

DESHPANDE, S. S.; DAMODARAN, S. Structure-digestibility relationship of legume 7s proteins. **Journal of Food Science.** v. 54, n. 1, p. 108-113, 1989b.

DESHPANDE, S. S.; NIELSEN, S. S. *In vitro* enzymatic-hydrolysis of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Food Science.** v. 52, n. 5, p. 1326-1329, 1987.

DUODU *et al.* Factors affecting sorghum protein digestibility. **Journal of Cereal Science.** v. 38, n. 2, p. 117-131, 2003.

EGOROV *et al.* Disulphide structure of a sunflower seed albumin: Conserved and variant disulphide bonds in the cereal prolamin super-family. **Febs Letters.** v. 396, n. 2-3, p. 285-288, 1996.

ELSHEIKH, E. A. E.; FADUL, I. A.; EL TINAY, A. H. Effect of cooking on anti-nutritional factors and *in vitro* protein digestibility (IVPD) of faba bean grown with different nutritional regimes. **Food Chemistry.** v. 68, n. 2, p. 211-212, 2000.

ESTRADA-GIRON, Y.; SWANSON, B. G.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. Advances in the use of high hydrostatic pressure for processing cereal grains and legumes. **Trends in Food Science & Technology.** v. 16, n. 5, p. 194-203, 2005.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Effect of bean (*Phaseolus vulgaris*) albumins on phaseolin *in vitro* digestibility, role of trypsin inhibitors. **Journal of Food Biochemistry.** v. 20, n. 4, p. 275-294, 1996a.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. *In vitro* digestibility of albumin proteins from *Phaseolus vulgaris* L. Effect of chemical modification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 44, n. 10, p. 3022-3028, 1996b.

GRANT, G.; DORWARD, P. M.; PUSZTAI, A. Pancreatic enlargement is evident in rats fed diets containing raw soybeans (*Glycine max*) or cowpeas (*Vigna unguiculata*) for 800 days but not in those fed diets based on kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) or lupinseed (*Lupinus angustifolius*). **Journal of Nutrition.** v. 123, n. 12, p. 2207-2215, 1993.

GRANT *et al.* Intestinal and pancreatic responses to dietary soybean (*Glycine max*) proteins. **Biochemical Society Transactions**. v. 16, n. 4, p. 610-611, 1988.

GUO, X. N.; YAO, H. Y.; CHEN, Z. X. Effect of heat, rutin and disulfide bond reduction on in vitro pepsin digestibility of Chinese tartary buckwheat protein fractions. **Food Chemistry**. v. 102, n. 1, p. 118-122, 2007.

HADDAD, J.; ALLAF, K. A study of the impact of instantaneous controlled pressure drop on the trypsin inhibitors of soybean. **Journal of Food Engineering**. v. 79, n. 1, p. 353-357, 2007.

HANF, V.; GONDER, U. Nutrition and primary prevention of breast cancer: Foods, nutrients and breast cancer risk. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**. v. 123, n. 2, p. 139-149, 2005.

HASDAI *et al.* Growth, digestibility and enzyme-activities in the pancreas and intestines of guinea-pigs fed on raw and heated soybean flour. **British Journal of Nutrition**. v. 62, n. 3, p. 529-537, 1989.

HIGGINS, T. J. V. Synthesis and regulation of major proteins in seeds **Annual Reviews on Plant Physiology**. v. 35, n., p. 191-221, 1984.

JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**. v. 43, n. 10, p. 885-895, 1997.

JOOD, S.; MEHTA, U.; SINGH, R. Effect of processing on available carbohydrates in legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 34, n. 3, p. 417-420, 1986.

KHAN, R. I.; GATEHOUSE, J. A.; BOULTER, D. The seed proteins of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Journal of Experimental Botany**. v. 31, n. 125, p. 1599-1611, 1980.

KLOSE, A. A.; HILL, B.; FEVOLD, H. L. Presence of a growth inhibiting substance in raw soybeans. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 62, n. 1, p. 10-12, 1946.

KNUST *et al.* Contribution of linseed intake to urine and serum enterolignan levels in German females: A randomised controlled intervention trial. **Food and Chemical Toxicology**. v. 44, n. 7, p. 1057-1064, 2006.

KORDAS *et al.* Diverse effects of phytohaemagglutinin on gastrointestinal secretions in rats. **Journal of Physiology-Paris**. v. 94, n. 1, p. 31-36, 2000.

KREIS *et al.* Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. **Journal of Molecular Biology**. v. 183, n. 3, p. 499-502, 1985.

KRIS-ETHERTON *et al.* Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine.** v. 113, n., p. 71-88, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature.** v. 227, n. 5259, p. 680-&, 1970.

LEE, K. H.; OLOMU, J. M.; SIM, J. S. Live performance, carcass yield, protein and energy retention of broiler-chickens fed canola and flax full-fat seeds and the restored mixtures of meal and oil. **Canadian Journal of Animal Science.** v. 71, n. 3, p. 897-903, 1991.

LEITE *et al.* Potencial protéico da linhaça (*Linum usitatissimum*) para ração de ratos em crescimento. In: **XXI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental FeSBE: Águas de Lindóia, SP, Brasil.** ago/2006.

LENZI *et al.* Estudo longitudinal de ratas alimentadas tendo como fonte protéica a linhaça (*Linum usitatissimum*): dados de crescimento. In: **XXI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental.** FeSBE: Águas de Lindóia, SP, Brasil. ago/2006.

LI-CHAN, E. C. Y.; MA, C. Y. Thermal analysis of flaxseed (*Linum usitatissimum*) proteins by differential scanning calorimetry. **Food Chemistry.** v. 77, n. 4, p. 495-502, 2002.

LIDDLE, R. A.; GOLDFINE, I. D.; WILLIAMS, J. A. Bioassay of plasma cholecystokinin in rats - effects of food, trypsin-inhibitor, and alcohol. **Gastroenterology.** v. 87, n. 3, p. 542-549, 1984.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994.

LIENER, I. E.; THOMPSON, R. M. *In vitro* and *In vivo* studies on the digestibility of the major storage protein of the navy bean (*Phaseolus vulgaris*). **Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition.** v. 30, n. 1, p. 13-25, 1980.

LIMA *et al.* Comparative digestibility and the inhibition of mammalian digestive enzymes from mature and immature cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds. **Food Control.** v. 15, n. 2, p. 107-110, 2004.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects.** v. 1572, n. 2-3, p. 198-208, 2002.

LUCAS *et al.* Flaxseed reduces plasma cholesterol and atherosclerotic lesion formation in ovariectomized Golden Syrian hamsters. **Atherosclerosis.** v. 173, n. 2, p. 223-229, 2004.

MACEDO *et al.* Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which are susceptible or resistant to the

bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 28, n. 2, p. 183-190, 1995.

MADHUSUDHAN, K. T.; SINGH, N. Studies on linseed proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 31, n. 5, p. 959-963, 1983.

MADHUSUDHAN, K. T.; SINGH, N. Effect of detoxification treatment on the physicochemical properties of linseed proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 33, n. 6, p. 1219-1222, 1985a.

MADHUSUDHAN, K. T.; SINGH, N. Isolation and characterization of the major fraction (12-s) of linseed proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 33, n. 4, p. 673-677, 1985b.

MANSOUR, E. H.; ELADAWY, T. A. Nutritional potential and functional-properties of heat-treated with germinated fenugreek seeds. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**. v. 27, n. 6, p. 568-572, 1994.

MAO, W. W.; KINSELLA, J. E. Amylase activity in banana fruit - properties and changes in activity with ripening. **Journal of Food Science**. v. 46, n. 5, p. 1400-&, 1981.

MARIOTTI *et al.* The influence of the albumin fraction on the bioavailability and postprandial utilization of pea protein given selectively to humans. **Journal of Nutrition**. v. 131, n. 6, p. 1706-1713, 2001.

MATLASHEWSKI *et al.* *In vitro* synthesis of oat globulin. **Febs Letters**. v. 145, n. 2, p. 208-212, 1982.

MORISE *et al.* Effects of dietary alpha linolenic acid on cholesterol metabolism in male and female hamsters of the LPN strain. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 15, n. 1, p. 51-61, 2004.

MUBARAK, A. E. Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. **Food Chemistry**. v. 89, n. 4, p. 489-495, 2005.

MUKHOPADHAY, N.; RAY, A. K. Effect of fermentation on apparent total and nutrient digestibility of linseed, *Linum usitatissimum*, meal in rohu, *Labeo rohita*, fingerlings. **Acta ichthyologica et piscatorial**. v. 32, n. 2, p. 73-78, 2005.

MUNIZ *et al.* Linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte protéica exclusiva: um estudo em ratos. In: **XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. FeSBE: Águas de Lindóia, SP, Brasil. ago/2006.

NACHBAR, M. S.; OPPENHEIM, J. D. Lectins in the United-States diet - a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 33, n. 11, p. 2338-2345, 1980.

NAVES *et al.* Avaliação química e biológica da proteína do grão em cultivares de milho de alta qualidade protéica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 34, n. 1, p. 1-8, 2004.

NEVES, V. A.; LOURENCO, E. J. Isolation and *in vitro* hydrolysis of globulin G1 from lentils (*Lens culinaris*, Medik). **Journal of Food Biochemistry**. v. 19, n. 2, p. 109-120, 1995.

NEVES, V. A.; LOURENCO, E. J.; DA SILVA, M. A. Isolation and *in vitro* hydrolysis of lentil protein fractions by trypsin. **Archivos Latinoamericanos De Nutricion**. v. 46, n. 3, p. 238-242, 1996.

NIEDZWIEDZ-SIEGIEN, I. Cyanogenic glucosides in *Linum usitatissimum*. **Phytochemistry**. v. 49, n. 1, p. 59-63, 1998.

NITSAN, Z.; LIENER, I. E. Enzymic Activities in pancreas, digestive-tract and feces of rats fed raw or heated soy flour. **Journal of Nutrition**. v. 106, n. 2, p. 300-305, 1976.

NTI, C. A.; PLAHAR, W. A. Cowpea inhibition of human and bovine protease activities and the effects of processing. **Food Control**. v. 7, n. 3, p. 129-133, 1996.

OLGUIN *et al.* Nutritional and antinutritional aspects of an Argentinian soy flour assessed on weanling rats. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 16, n. 4, p. 441-449, 2003.

OLIVEIRA *et al.* *In vitro* and *in vivo* digestibility of the albumin and globulin fractions of eight Brazilian cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp] cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 84, n. 14, p. 1823-1830, 2004.

OLOYO, R. A. Chemical and nutritional quality changes in germinating seeds of *Cajanus cajan* L. **Food Chemistry**. v. 85, n. 4, p. 497-502, 2004.

OOMAH, B. D.; DER, T. J.; GODFREY, D. V. Thermal characteristics of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. **Food Chemistry**. v. 98, n. 4, p. 733-741, 2006.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Compositional changes during commercial processing of flaxseed. **Industrial Crops and Products**. v. 9, n. 1, p. 29-37, 1998.

PEDALINO *et al.* The structure of cowpea (*Vigna unguiculata* L Walp) seed storage proteins. **Seed Science and Technology**. v. 20, n. 2, p. 223-231, 1992.

PELLET, P. R.; YOUNG, V. L. Nutritional evaluation of protein foods. **Food and Nutrition Bulletin Supplement** v. 4, n., p. 154, 1980.

PEUMANS, W. J.; VANDAMME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends in Food Science & Technology**. v. 7, n. 4, p. 132-138, 1996.

PRASAD, K. Dietary flax seed in prevention of hypercholesterolemic atherosclerosis. **Atherosclerosis**. v. 132, n. 1, p. 69-76, 1997.

PRASAD, K. Hypocholesterolemic and anti atherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. **Atherosclerosis**. v. 179, n. 2, p. 269-275, 2005.

PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**. v. 8, n. 41, p. 149-165, 1996.

QIN *et al.* Thermal processing of whole soya beans: Studies on the inactivation of antinutritional factors and effects on ileal digestibility in piglets. **Animal Feed Science and Technology**. v. 57, n. 4, p. 313-324, 1996.

RACKIS, J. J.; GUMBMAN, M. R., Protease inhibitors: physiological properties and nutritional significance. In: ORY, R. L. **Antinutritional and natural toxicants in foods**. Food & Nutrition Press: Westport, 1982. p. 203-237.

RALLIDIS *et al.* Dietary alpha-linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. **Atherosclerosis**. v. 167, n. 2, p. 237-242, 2003.

RANGEL *et al.* Biological evaluation of a protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Food Chemistry**. v. 87, n. 4, p. 491-499, 2004.

RASSAM, M.; LAING, W. A. The interaction of the 11S globulin-like protein of kiwifruit seeds with pepsin. **Plant Science**. v. 171, n. 6, p. 663-669, 2006.

RATNAYAKE *et al.* Chemical and nutritional studies of flaxseed (variety Linott) in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 3, n. 5, p. 232-240, 1992.

REDDY, N. R.; PIERSON, M. D. Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation. **Food Research International**. v. 27, n. 3, p. 281-290, 1994.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **Journal of Nutrition**. v. 127, n., p. S838-S841, 1997.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. **Methods in Plant Biochemistry** v. 5, n., p. 259-305, 1991.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.; LEON, F.; CUEVAS, M. Linseed hypersensitivity: Characterization of allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 111, n. 1, Supplement 2, p. S250, 2003.



RUBIO *et al.* High *in vivo* (rat) digestibility of faba bean (*Vicia faba*), lupin (*Lupinus angustifolius*) and soya bean (*Glycine max*) soluble globulins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 66, n. 3, p. 289-292, 1994.

RUBIO *et al.* Nutritional utilization by rats of chickpea (*Cicer arietinum*) meal and its isolated globulin proteins is poorer than that of defatted soybean or lactalbumin. **Journal of Nutrition**. v. 128, n. 6, p. 1042-1047, 1998.

RYAN, C. A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 24, n., p. 173-196, 1973.

SAIKIA, P.; SARKAR, C. R.; BORUA, I. Chemical composition, antinutritional factors and effect of cooking on nutritional quality of rice bean [*Vigna umbellata* (Thunb; Ohwi and Ohashi)]. **Food Chemistry**. v. 67, n. 4, p. 347-352, 1999.

SALES, M. P.; MACEDO, M. L. R.; XAVIER-FILHO, J. Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid (insect) midgut proteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**. v. 103, n. 4, p. 945-950, 1992.

SAMMOUR, R. H. Proteins of linseed (*Linum usitatissimum* L.), extraction and characterization by electrophoresis. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**. v. 40, n. 2, p. 121-126, 1999.

SANTORO, L. G.; GRANT, G.; PUSZTAI, A. Effects of short-term feeding of rats with a highly purified phaseolin preparation. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 51, n. 1, p. 61-70, 1997.

SATHE, S. K.; IDOURAINE, A.; WEBER, C. W. Purification and biochemical-characterization of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) major globulin. **Food Chemistry**. v. 50, n. 3, p. 261-266, 1994.

SATHE, S. K.; VENKATACHALAM, M. Fractionation and biochemical characterization of moth bean (*Vigna aconitifolia* L.) proteins. **Lwt-Food Science and Technology**. v. 40, n. 4, p. 600-610, 2007.

SEENA *et al.* Effect of roasting and pressure-cooking on nutritional and protein quality of seeds of mangrove legume *Canavalia cathartica* from southwest coast of India. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 19, n. 4, p. 284-293, 2006.

SEENA, S.; SRIDHAR, K. R.; RAMESH, S. R. Nutritional and protein quality evaluation of thermally treated seeds of *Canavalia maritima* in the rat. **Nutrition Research**. v. 25, n. 6, p. 587-596, 2005.

SEIDL, D.; JAFFÉ, M.; JAFFÉ, W. G. Digestibility and proteinase inhibitory action of a kidney bean globulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 17, n. 6, p. 1318-&, 1969.

SHEWRY, P. R. Plant-storage proteins. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**. v. 70, n. 3, p. 375-426, 1995.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed storage proteins - structures and biosynthesis. **Plant Cell**. v. 7, n. 7, p. 945-956, 1995.

SHUTOV *et al.* Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: Evidence for a common single-domain ancestral gene. **Journal of Molecular Evolution**. v. 41, n. 6, p. 1057-1069, 1995.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Nutritional and antinutritional composition, in vitro amino acid availability, starch digestibility and predicted glycemic index of differentially processed mucuna beans (*Mucuna pruriens* var. utilis): an under-utilised legume. **Food Chemistry**. v. 91, n. 2, p. 275-286, 2005.

SINGH *et al.* Albumin and globulin proteins of wheat flour: Immunological and N-terminal sequence characterisation. **Journal of Cereal Science**. v. 34, n. 1, p. 85-103, 2001.

SPENCER *et al.* Sequence interrelationships of the subunits of vicilin from pea seeds. **Plant Molecular Biology**. v. 2, n. 5, p. 259-267, 1983.

TALOM *et al.* High flaxseed (linseed) diet restores endothelial function in the mesenteric arterial bed of spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**. v. 64, n. 16, p. 1415-1425, 1999.

TATHAM, A. S.; SHEWRY, P. R. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye. **Journal of Cereal Science**. v. 22, n. 1, p. 1-16, 1995.

THOMPSON *et al.* Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. **Carcinogenesis**. v. 17, n. 6, p. 1373-1376, 1996.

TREVINO *et al.* Protein quality of linseed for growing broiler chicks. **Animal Feed Science and Technology**. v. 84, n. 3-4, p. 155-166, 2000.

VASCONCELOS *et al.* Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 12, n. 1, p. 55-62, 2001.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**. v. 44, n. 4, p. 385-403, 2004.

WANASUNDARA, J. P. D.; SHAHIDI, F. Functional properties and amino acid composition of solvent-extracted flaxseed meals. **Food Chemistry**. v. 49, n. 1, p. 45-51, 1994.

WANASUNDARA, P.; SHAHIDI, F., Process-induced compositional changes of flaxseed. In: **Process-Induced Chemical Changes in Food**. Plenum Press Div Plenum Publishing Corp: New York, 1998. p. 307-325.

XAVIER-FILHO *et al.* Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 37, n. 4, p. 1139-1143, 1989.

YUAN, Y. V.; RICKARD, S. E.; THOMPSON, L. U. Short-term feeding of flaxseed or its lignan has minor influence on in vivo hepatic antioxidant status in young rats. **Nutrition Research**. v. 19, n. 8, p. 1233-1243, 1999.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)