

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FARINHAS DE TREMOÇO**  
**(*Lupinus albus*) TRATADAS POR PROCESSO AQUOSO, EXTRUSÃO E EXTRUSÃO**  
**REATIVA**

**Meiry Ellen Ramos Chamone**

**2022**



**UFRRJ**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FARINHAS DE TREMOÇO  
(*Lupinus albus*) TRATADAS POR PROCESSO AQUOSO, EXTRUSÃO E EXTRUSÃO  
REATIVA**

**MEIRY ELLEN RAMOS CHAMONE**

*Sob a Orientação do Professor Doutor*  
**José Luis Ramírez Ascheri**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

**Seropédica**  
**Novembro de 2022**

C437c Chamone, Meiry Ellen Ramos, 1994-  
Caracterização físico-química de farinhas de tremço  
(Lupinus albus) tratadas por processo aquoso,  
extrusão e extrusão reativa / Meiry Ellen Ramos  
Chamone. - Pirapora, 2022.  
67 f.: il.

Orientador: José Luis Ramírez Ascheri.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, 2022.

1. Tremço. 2. Tecnologias por extrusão. 3.  
Composição química. 4. Digestibilidade de proteínas . I.  
Ascheri, José Luis Ramírez, 1955-, orient. II  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós  
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos III.  
Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS



TERMO N° 1223/2022 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

N° do Protocolo: 23083.073489/2022-85

Seropédica-RJ, 30 de novembro de 2022

**MEIRY ELLEN RAMOS CHAMONE**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.  
TESE APROVADA EM 30/11/2022.

JOSÉ LUIS RAMIREZ ASCHERI (Dr) EMBRAPA(orientador)

MARIANA TEIXEIRA DA COSTA MACHADO (Dra) UFRRJ

DOUGLAS ROBERTO GUIMARÃES SILVA (Dr) UNIPTAN

*Documento não acessível publicamente*

*(Assinado digitalmente em 30/11/2022 18:54)*  
MARIANA TEIXEIRA DA COSTA MACHADO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
CoordCGEngA (12.28.01.00.00.00.38)  
Matricula: ###113#3

*(Assinado digitalmente em 01/12/2022 12:04)*  
DOUGLAS ROBERTO GUIMARÃES SILVA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.146-##

*(Assinado digitalmente em 30/11/2022 20:17)*  
JOSE LUIS RAMIREZ ASCHERI  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.788-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 1223, ano: 2022, tipo: TERMO, data de emissão: 30/11/2022 e o código de verificação: 9eaaa02da4

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus e a minha avó Geralda que sempre estiveram em união através da oração para conclusão desta etapa tão importante da minha vida.

Dedico também a minha fé que me fez acreditar que tudo isso seria possível um dia.

Dedico ao professor Dr. Felipe Trombete que plantou essa sementinha no decorrer da minha graduação através de suas orientações, bem como a todos os professores da Engenharia de Alimentos da UFSJ que contribuíram ricamente para minha formação.

Dedico ao Dr. Ascheri que me acolheu como orientador e me permitiu executar todo este trabalho, através do seu apoio e orientação, contribuindo de forma grandiosa para minha formação.

Dedico ao grande amigo Dr. Jhony Vargas por ter me ensinado e apoiado de forma incondicional durante todas as etapas de execução.

Dedico a minha mãe Arlene, a minha irmã Renata, a meu primo Renato, e ao meu noivo Fernando que colaboraram emocionalmente para que tudo isso fosse possível de ser realizado.

Dedico as minhas queridas amigas que sempre acreditaram no meu potencial e torceram por isso.

## **AGRADECIMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a Deus por ter me permitido chegar até aqui!

À Embrapa Agroindústria de Alimentos, por todo o suporte referente às instalações como laboratórios e todos os pesquisadores e técnicos que estiveram ao meu lado no decorrer do estágio;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de estudo e pesquisa.

À Dra. Marília Stephan, por ter me permitido realizar análises que a princípio eram inviáveis de se executar, e com seu esforço e interesse colaborou ricamente para execução deste projeto.

A todos os pesquisadores e discentes da planta IV, que estiverem no decorrer da minha rotina compartilhando bons momentos de convivência e amizade.

À Tânia da físico química, por sempre me auxiliar com maestria referente as análises que ali eram executadas.

À querida Thais Barbosa por sempre me salvar nos momentos de ansiedade em relação aos protocolos exigidos para minha formação.

Aos amigos de mestrado e doutorado do programa PPGCTA que tive o prazer de conhecer e algumas vezes desabafar sobre os desafios que encontrei durante a caminhada.

Agradeço a minha família tão amada, que mesmo com todas as suas dificuldades, me nutriram com bastante amor.

## RESUMO

CHAMONE, Meiry Ellen Ramos. **Caracterização físico-química de farinhas de tremoço (*Lupinus albus*) tratadas por processo aquoso, extrusão e extrusão reativa**. 2022. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2022.

O tremoço branco é uma leguminosa bastante nutritivas com altos teores de proteínas e fibras, sendo a espécie do gênero *Lupinus* mais aplicada na alimentação humana por possuir menor concentração de fatores antinutricionais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diversos processos (aquoso, extrusão e extrusão reativa) sob o teor de alcalóides, caracterização físico-química e digestibilidade *in vitro* de proteínas de tremoço branco. O processo aquoso reduziu (0,1 g /100 g b.s) significativamente os teores de alcalóides. A composição química variou entre os processos aplicados, com teores entre 34,13–39,29% de proteínas, 9,48–12,77% de extrato etéreo, 9,47–46,91% de fibra alimentar e 1,03–2,62% de cinzas. Os índices de absorção e solubilidade em água apresentaram maior impacto nas amostras desamargadas (processo aquoso), com maior absorção e menor solubilidade entre todas as outras avaliadas. A digestibilidade de proteínas foi melhorada pelo processo aquoso (96,62%) e por extrusão (93,31%), enquanto a extrusão reativa (adicionada de ácido cítrico 2%) reduziu a digestibilidade (79,21%) em relação a amostra *in natura* (90,53%). A eletroforese confirmou o alto índice de digestibilidade, mantendo apenas a fração da  $\gamma$ -conglutina nas amostras digeridas. Os teores de proteínas solúveis e aminoácidos aromáticos aumentaram durante a digestão, com maior bioacessibilidade de aminoácidos aromáticos nas amostras digeridas. Os processos por extrusão foram ineficientes para redução dos alcalóides, na qual a extrusão reativa apresentou menor valor de digestibilidade *in vitro* de proteínas, e redução drástica das fibras. O processo aquoso se mostrou como a melhor opção, por reduzir níveis de alcalóides e melhorar a digestão proteica das farinhas.

**Palavras chave** Proteína vegetal, SDS-PAGE, Fibra alimentar, digestibilidade *in vitro*, REX.

## ABSTRACT

CHAMONE, Meiry Ellen Ramos. **Physicochemical characterization of lupine (*Lupinus albus*) flours treated by aqueous process, extrusion and reactive extrusion.** 2022. 63p. Dissertation (Master in Food Science and Technology). Institute of Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2022

White lupine is a very nutritious legume with high levels of protein and fiber, being the species of the genus *Lupinus* most used in human food because it has a lower concentration of anti-nutritional factors. The objective of this work was to evaluate the effect of different processes (aqueous, extrusion and reactive extrusion) on the alkaloid content, physicochemical characterization and *in vitro* digestibility of white lupine proteins. The aqueous process (0.1 g /100 g b.s) significantly reduced the alkaloid contents. The chemical composition varied among the applied processes, with contents between 34.13–39.29% of proteins, 9.48–12.77% of ether extract, 9.47–46.91% of dietary fiber and 1.03 –2.62% ash. The indices of absorption and solubility in water had a greater impact on the debittered samples (aqueous process), with greater absorption and lower solubility among all the others evaluated. Protein digestibility was improved by the aqueous process (96.62%) and by extrusion (93.31%), while the reactive extrusion (added of 2% citric acid) reduced digestibility (79.21%) in relation to the sample. *in natura* (90.53%). Electrophoresis confirmed the high digestibility index, keeping only the  $\gamma$ -conglutin fraction in the digested samples. The contents of soluble proteins and aromatic amino acids increased during digestion, with greater bioaccessibility of aromatic amino acids in the digested samples. The extrusion processes were inefficient to reduce alkaloids, being the reactive extrusion negative for protein digestibility, as well as for fiber reduction. The aqueous process proved to be the best option, as it reduces levels of alkaloids and improves the protein digestion of the flours.

**Keywords:** Vegetable protein, SDS-PAGE, Dietary fiber, *in vitro* digestibility, REX.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição de aminoácidos essenciais em isolados proteicos de <i>Lupinus</i> (tremoços). .....	4
<b>Tabela 2.</b> Composição de aminoácidos essenciais em sementes de <i>Lupinus in natura</i> . ....	5
<b>Tabela 3.</b> Composição química e teor de alcalóides em sementes de quatro espécies de tremoços. .....	6
<b>Tabela 4.</b> Composições (%) de alcalóides quinolizidínicos em grãos <i>in natura</i> de diferentes espécies de tremoço. ....	9
<b>Tabela 5.</b> Processo aquoso por imersão, cocção e lavagens de tremoço branco. ....	20
<b>Tabela 6.</b> Valores reais das variáveis independentes a ser utilizados no delineamento. ....	21
<b>Tabela 7.</b> Delineamento completo do ensaio experimental extrudado. ....	22
<b>Tabela 8.</b> Torque, vazão e energia mecânica específica (EME) obtidas através do processo por extrusão de tremoço branco. ....	29
<b>Tabela 9.</b> Resultado da análise qualitativa de alcalóides do processo I e III pela intensidade da coloração ao aplicar o reagente de Wagner .....	30
<b>Tabela 10.</b> Composição química em farinhas de tremoços branco ( <i>Lupinus albus</i> ) por diferentes tratamentos. ....	34
<b>Tabela 11.</b> Grau de digestibilidade <i>in vitro</i> de proteínas em tremoço branco <i>in natura</i> (I0), desamargado (I7), extrudado (III0), extrudado com adição de ácido cítrico (III6). ....	39

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Inflorescência de <i>Lupinus albus</i> (tremoço branco), <i>Lupinus luteus</i> (tremoço amarelo) e <i>Lupinus angustifolius</i> (tremoço azul). .....	3
<b>Figura 2.</b> Vagem e semente de tremoço branco ( <i>Lupinus albus</i> ).. .....	3
<b>Figura 3.</b> Biossíntese de alcalóides de quinolizidina. ....	10
<b>Figura 4.</b> Esquema de um extrusor de rosca única. ....	15
<b>Figura 5.</b> Grãos de tremoço branco. A) Grãos não selecionados. B) Grãos Sadios selecionados .....	19
<b>Figura 6.</b> Análise qualitativa de alcalóides realizada nas amostras do processo aquoso (A) e do processo por extrusão (B). ....	30
<b>Figura 7.</b> Teor de alcalóides totais em amostras de tremoço branco <i>in natura</i> (I0), desamargado (I7), extrudado (III0), extrudado com adição de ácido cítrico (III6). ....	32
<b>Figura 8.</b> Índice de absorção de água (IAA) e Índice de solubilidade em água (ISA) em amostras de tremoço branco <i>in natura</i> (I0), desamargado (I7), extrudado (III0), extrudado com adição de ácido (III6). ....	37
<b>Figura 9.</b> Eletroforese SDS-PAGE de tremoço branco <i>in natura</i> (I0), desamargado (I7), extrudado (III0), extrudado com adição de ácido cítrico 2% (III6), digeridos (D) e não digeridos (ND). ....	40
<b>Figura 10.</b> (A) Proteínas solúveis e (B) Aminoácidos aromáticos, em amostras de tremoço digerido (D), não digerido (ND) e simulado com fluidos gastrointestinais (S). Médias com letras minúsculas diferentes dentro de um tratamento, ou médias com letras maiúsculas diferentes dentro de um tipo de processo digestivo, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). ....	42

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1 Tremoços .....	2
2.1.1 Composição química das espécies mais importantes .....	3
2.1.2 Tremoço branco ( <i>Lupinus albus</i> ).....	6
2.1.3 Aplicação na alimentação humana .....	8
2.1.3 Alcalóides de quinolizidina – fator antinutricional .....	8
2.1.4 Processos de redução de alcalóides (desamargor) .....	10
2.4. Extrusão reativa .....	12
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral .....	18
3.2 Objetivos específicos .....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Local de execução.....	19
4.2 Material.....	19
4.3 Seleção de Grão .....	19
4.4 Processo aquoso (I).....	19
4.5. Testes preliminares a extrusão (II).....	20
4.6. Processos por extrusão (III) .....	20
4.6.1. Produção de farinha crua .....	20
4.6.2. Extrusão Termoplástica e Reativa .....	21
4.6.3 Energia mecânica específica (EME).....	23
4.7. Análises de Alcalóides.....	23
4.7.1. Análise qualitativa por Wagner .....	23
4.7.2. Quantificação de alcalóides por titulação colorimétrica.....	24
4.8. Seleção de amostras .....	25
4.9. Análises de composição química.....	25
4.10. Índice de absorção e solubilidade em água.....	25
4.11. Digestão <i>in vitro</i> de proteínas .....	26
4.11.1. Amostras não digeridas.....	27
4.11.2 Influência dos fluidos gastrointestinais sobre as proteínas.....	27
4.11.3. Proteínas solúveis (PS) e aminoácidos aromáticos (AA) .....	27
4.12. Eletroforese de proteínas .....	28
4.13. Análise estatística .....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO: .....	29
5.1. Energia mecânica específica (EME).....	29

5.2. Análise qualitativa por Wagner .....	30
5.3. Quantificação de alcalóides por titulação colorimétrica.....	31
5.4 Amostras selecionadas .....	33
5.5 Composição Química.....	33
5.5. Índice de absorção (IAA) e solubilidade (ISA) em água.....	36
5.6. Digestibilidade de proteínas <i>in vitro</i> .....	38
5.6.1. Eletroforese de proteínas digeridas e não digeridas.....	40
5.6.1. Proteínas solúveis (PS) e Aminoácidos aromáticos (AA) .....	41
6 CONCLUSÃO.....	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

# 1 INTRODUÇÃO

Os tremoços (*Lupinus* spp.) são leguminosas da família Leguminosae (Fabaceae) pertencente ao gênero *Lupinus*, cujo as espécies de cultivo mais importantes são os tremoços branco (*L. albus*), azul (*L. angustifolius*), amarelo (*L. luteus*) e andino (*L. mutabilis*) (ERBAS, 2010; PLUSTEA et al., 2022; TOUNSI-HAMMAMI et al., 2019; WILCZURA et al., 2018a). Todos eles são bastante nutritivos e promissores entre as leguminosas, com melhor adaptação a diferentes tipos de solo (GULISANO et al., 2019; LAMRABET et al., 2022), alta digestibilidade proteica e boas propriedades tecnológicas (BURGOS-DÍAZ et al., 2016; MONTEIRO et al., 2014; VAN DE NOORT, 2016). Se apresentam como uma boa alternativa à soja, com propriedades proteicas tanto quanto importantes (BOUKID; PASQUALONE, 2022; PRUSINSKI, 2017). Possuem altos teores de proteínas (35-40%), fibras (30-40%), ácidos graxos essenciais (8-10%), compostos bioativos, vitaminas e minerais, com baixa predominância de carboidratos digeríveis (OLIVEIRA et al., 2018; PRUSINSKI, 2017; YAVER; BILGIÇLI, 2021).

O tremoço branco é a espécie de cultura mais antiga do gênero *Lupinus*, e também a mais aplicada na alimentação humana por possuir menor concentração de fatores antinutricionais. Suas propriedades são bastante atrativas, além da nutrição oferecem também benefícios à saúde, reduzindo níveis de glicose e lipídeos, evitando doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes (ARNOLDI et al., 2015; GUZMÁN et al., 2021; SANDOVAL-MUÑÍZ et al., 2018). Seu conteúdo de fibras também auxilia de forma preventiva ao desenvolvimento de câncer colorretal.

Apesar do alto valor nutricional, os tremoços possuem em sua composição alcalóides amargos de quinolizidina, como Lupanina e 13-Hidroxilupanina, que em certas proporções podem ser tóxicos ao consumo ( $\leq 0,02$  g /100 g b.s), fazendo-se necessário a realização de processos tecnológicos capazes de reduzir ou eliminar estes compostos, que também conferem amargor ao grão (CORTÉS-AVENDAÑO et al., 2020; VAN DE NOORT, 2016). Diante disso, vários métodos vêm sendo testados (ESTIVI et al., 2022a; VILLACRÉS; ÁLVAREZ; ROSELL, 2020; YAVER; BILGIÇLI, 2021) uma vez que os métodos tradicionais mais usados são bastante demorados (5 a 6 dias), com etapas de cocção e várias lavagens de alto consumo de água e perdas de nutrientes (CÓRDOVA-RAMOS et al., 2020; ERBAS, 2010; ESTIVI et al., 2022; VILLACRÉS; ÁLVAREZ; ROSELL, 2020). Ainda não estão disponíveis métodos que avaliassem o impacto da extrusão e da extrusão reativa sobre os conteúdos de alcalóides presentes nos grãos de tremoços.

A extrusão termoplástica e reativa são formas de cocção rápida, capazes de operar em temperaturas elevadas e em curto espaço de tempo (HTST), com vantagens econômicas e nutritivas em comparação aos processos térmicos convencionais. Os processos por extrusão oferecem viabilidade de melhorar propriedades sensoriais e funcionais dos alimentos, aumentando a digestibilidade de proteínas e solubilização das fibras, além de reduzir ou inativar compostos antinutricionais encontrados em vegetais (CÓRDOVA-RAMOS et al., 2020; ORTIZ-CRUZ et al., 2020; ZHONG et al., 2019). A diferença entre elas, é que a extrusão reativa utiliza o extrusor como um reator, que intensifica reações de compostos químicos adicionadas à mistura, em busca de atributos desejáveis nas matrizes alimentares (ARORA et al., 2020).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diversos processos (aquoso, extrusão e extrusão reativa) sob o teor de alcalóides, caracterização físico-química e digestibilidade *in vitro* de proteínas de tremoço branco.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Tremoços

Os tremoços são leguminosas da família Leguminosae (Fabaceae) pertencentes ao gênero *Lupinus*, sendo cultivado há mais de 4000 anos (VAN DE NOORT, 2016). Suas espécies podem ser classificadas em dois grupos, "Velho Mundo" e "Novo Mundo". As provenientes do mediterrâneo e leste africano, como o *L. albus* (tremoço branco), *L. luteus* (tremoço amarelo) e *L. angustifolius* (tremoço azul) são classificadas como espécies do "Velho Mundo" (**Figura 1**); já as provenientes do sul e norte da América como o *L. mutabilis* (tremoço andino), *L. polyphillus* (tremoço de folhas grandes), *L. argenteus* (tremoço prateado) são classificadas como espécies do "Novo Mundo" (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2013; BOSCHIN; RESTA, 2013; LAMRABET et al., 2022; WILCZURA et al., 2018a).

A planta do tremoço possui folhas que contém sete folículos na mesma altura do pecíolo, alongados e de coloração verde, com floração de coloração diferente, dependendo do tipo da espécie (Figura 1), os frutos dos tremoços apresentam-se em forma de vagem (Figura 2), com sementes em seu interior (CREMONEZ et al., 2013; OLIVEIRA, 2013).

Sua cultura é anual, com maior adaptação às regiões de temperaturas mais baixas (GULISANO et al., 2019), capazes de tolerar acidez de solos, e se desenvolver em solos de média fertilidade. São bastante empregados para a adubação verde por possuírem alta taxa de fixação de nitrogênio (REDIN et al., 2016).



**Figura 1.** Inflorescência de *Lupinus albus* (tremoço branco), *Lupinus luteus* (tremoço amarelo) e *Lupinus angustifolius* (tremoço azul). Fonte: (CREMONEZ et al., 2013).



**Figura 2.** Vagem e semente de tremoço branco (*Lupinus albus*). Fonte: OLIVEIRA, 2013.

A produção anual de grãos de tremoço é ao redor de um milhão de toneladas, sendo a Austrália o maior produtor (46%), seguido por Polônia (25%), Rússia (10%), e Marrocos (5,4%) (FAO, 2020). No Brasil a produção ainda é baixa, por volta de 30 a 40 toneladas, com cultivos predominantes em regiões mais frias, como Paraná e Santa Catarina (CAETANO, 2021).

### **2.1.1 Composição química das espécies mais importantes**

As espécies de cultivo mais importantes são: *Lupinus albus* (tremoço branco), *Lupinus angustifolius* (tremoço azul), *Lupinus luteus* (tremoço amarelo) e *Lupinus mutabilis* (tremoço andino) (ERBAS, 2010; TOUNSI-HAMMAMI et al., 2019; WILCZURA et al., 2018a). Os grãos destas leguminosas são ricas em proteínas (35-40%), fibras (30-40%) e ácidos graxos essenciais (8-10%), com baixa predominância de carboidratos digeríveis (ARNOLDI et al., 2015; CORTÉS-AVENDAÑO et al., 2020).

Algumas espécies de tremoços apontam teores mais significativos de óleo nos seus grãos, como é o caso do *L. mutabilis*, que apresenta em sua composição uma alta concentração de 18% a 20% de óleo, sendo este o mais alto entre todas as espécies de *Lupinus* relatada (GULISANO et al., 2019; ŚWIĘCICKI; KROC; KAMEL, 2015). Enquanto o *L. angustifolius* apresenta teor de 6,5% e o *L. luteus* 5,1% (RYBIN et al., 2018). Já o *L. albus*, apresenta teor de óleo moderado (8%–13%) com conteúdo de ácidos ômega-6 e ômega-3 atrativos para consumo final (BOSCHIN et al., 2007; PRUSINSKI, 2017).

O perfil de aminoácidos essenciais encontrados em isolados proteicos de *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* e *Lupinus mutabilis* doce, são relatados na Tabela 1. De acordo com a pontuação de aminoácidos indispensáveis digeríveis (DIAAS) recomendado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), os isolados proteicos do *Lupinus* apresentaram aminoácidos limitantes (triptofano e lisina em *L. albus* e metionina em *L. mutabilis*), sendo a metionina o aminoácido essencial em menor concentração (0,73 - 0,80%) relatado para todos os isolados. Enquanto *Lupinus angustifolius* não apresentou deficiência em aminoácidos essenciais, sendo classificado como proteína de alta qualidade nutricional (AGUILAR-ACOSTA et al., 2020).

**Tabela 1.** Composição de aminoácidos essenciais em isolados proteicos de *Lupinus* (tremoços).

<i>Espécies</i>	<i>Lupinus albus</i>		<i>Lupinus angustifolius</i>		<i>Lupinus mutabilis</i> doce	
	(mg aa/g ptna)	DIAAS	(mg aa/g ptna)	DIAAS	(mg aa/g ptna)	DIAAS
Treonina	36,5	1,1	37,6	1,1	36,1	1,1
Valina	43,5	1,2	45,6	1,3	43,2	1,2
Metionina + Cisteína	25,0	1,0	25,7	1,0	21,9	0,9
Isoleucina	47,1	1,7	45,6	1,6	48,2	1,7
Leucina	77,4	1,2	75,2	1,1	68,7	1,0
Fenilalanina+ Tirosina	83,9	1,3	78,1	1,2	81,7	1,3
Lisina	50,2	0,9	56,2	1,0	59,3	1,0
Histidina	23,8	1,3	29,1	1,5	29,5	1,6
Triptofano	7,6	0,7	10,6	1,0	9,7	0,9

DIAAS = (mg de aminoácido indispensável digestível em 1 g de proteína dietética) / (mg do mesmo aminoácido indispensável em 1g da proteína de referência).

aa: aminoácido. ptna: proteína.

Já a composição de aminoácidos essenciais avaliados diretamente na semente, apresentou pouca variação entre as espécies (Tabela 2). Na qual o *L. angustifolius* e o *L. albus* apresentaram

deficiência de aminoácidos essenciais, como lisina, metionina e triptofano, enquanto o *L. mutabilis* amargo, teve apenas o triptofano como limitante. O *Lupinus mutabilis* desamargado, além de obter deficiência em triptofano, evidenciou também ausência de metionina e cisteína, levando a crer que foram perdidos no processo de lavagem, com intuito de remover os compostos antinutricionais (CARVAJAL-LARENAS et al., 2016). Além disso, o conteúdo de lisina (78 mg/g de proteína) se apresentou em maior quantidade no *L. mutabilis* amargo, podendo estar relacionado ao fato da lisina ser o aminoácido precursor dos alcaloides de quinolizidina presentes em espécies amargas, e em menores conteúdos nas espécies doces e desamargada (*L. albus*, *L. angustifolius*) (BOSCHIN; RESTA, 2013; CARVAJAL-LARENAS et al., 2016).

**Tabela 2.** Composição de aminoácidos essenciais em sementes de *Lupinus in natura*.

Espécies	<i>L. albus</i>		<i>L. angustifolius</i>		<i>L. mutabilis</i> desamargado		<i>L. mutabilis</i> amargo	
	(mg aa/ g ptna)	DIAAS	(mg aa/g ptna)	DIAAS	(mg aa/g ptna)	DIAAS	(mg aa/g ptna)	DIAAS
Treonina	34,0	1,0	34,0	1,0	41,0	1,2	35,0	1,0
Valina	38,0	1,1	37,0	1,1	34,0	1,0	38,0	1,1
Metionina+Cisteína	22,0	0,9	23,0	0,9	0,0	0,0	24,0	1,0
Isoleucina	41,0	1,5	40,0	1,4	40,0	1,4	42,0	1,5
Leucina	68,0	1,0	69,0	1,0	67,0	1,0	70,0	1,1
Fenilalanina+Tirosina	82,0	1,3	71,0	1,1	72,0	1,1	75,0	1,2
Lisina	45,0	0,8	46,0	0,8	78,0	1,3	58,0	1,0
Histidina	20,0	1,1	26,0	1,4	29,0	1,5	35,0	1,8
Triptofano	9,0	0,8	9,0	0,8	6,0	0,5	8,0	0,7

DIAAS = [(mg de aminoácido indispensável digestível em 1 g de proteína dietética) / (mg do mesmo aminoácido indispensável em 1g da proteína de referência)].

aa = aminoácido, ptna = proteína.

Fatores antinutricionais como saponinas e lectinas são ausentes em tremoços, enquanto fitatos e inibidores de tripsina se apresentam em quantidades bem baixas em relação a soja e outras leguminosas, extinguindo por estes a necessidade de processamentos prévio para sua remoção (VAN DE NOORT, 2016).

Alcalóides de quinolizidina são os fatores antinutricionais de grande relevância apresentado nos tremoços, que em certas proporções (acima de 0,02 g/ 100 g de alimentos) são tóxicos para o consumo humano, necessitando de tratamentos de redução apropriados para serem inseridos na alimentação (CARVAJAL-LARENAS et al., 2016; ESTIVI et al., 2022a; FRITSCH; VOGEL; TOELSTEDE, 2015).

Diferentes teores de nutrientes e antinutrientes observados nos tremoços, variam conforme a espécie, modo de preparação e também com as condições ambientais que esses tremoços foram cultivados, como tipo de solo, clima, manejo da cultura e ainda processos de germinação (GULISANO et al., 2019).

A composição centesimal e a capacidade tecnológica das farinhas de tremoço branco e azul foram estudadas por Monteiro et al. (2020), os quais observaram diferenças na composição centesimal entre essas duas espécies. O tremoço branco apresentou 10,57% de lipídios, 35,45% de proteínas e 48,8% de carboidratos enquanto o tremoço azul apresentou apenas 4,20% de lipídeos, 32,48% de proteínas e 58,9% de carboidratos. Os teores de cinzas, bem próximos para as duas variedades (3,09% para o tremoço branco e 3,96% para o azul), enquanto a umidade foi de 2,81% para o tremoço branco e 1,27% para o azul.

A Tabela 3 apresenta resultados da composição química, de variedades silvestres de tremoços cultivadas no México, na qual o *L. albus* se destaca por apresentar menor toxicidade entre as espécies avaliadas (0,04 g de alcalóides/ 100 g de MS)(RUIZ-LÓPEZ et al., 2019).

**Tabela 3.** Composição química e teor de alcalóides em sementes de quatro espécies de tremoços.

Componente*	<i>L. albus</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. luteus</i>	<i>L. Mutabilis</i>
Matéria seca	90,4	90,6	91,7	62,0
Proteínas	36,3	33,0	46,5	44,7
Cinzas	3,9	3,7	3,7	3,0
Lipídios	11,5	6,8	4,6	14,07
Fibra bruta	14,4	14,0	13,9	7,04
Alcalóides	0,04	0,06	0,1	1,27

\* g/100 g matéria seca. Fonte: Ruiz-Lopez et al. (2019).

### 2.1.2 Tremoço branco (*Lupinus albus*)

O tremoço branco é a espécie de cultura mais antiga do gênero *Lupinus*, cultivado na região mediterrânea desde aproximadamente 400 anos aC, com posteriores cultivos no Mar Magro, Vale do Nilo, entre outras regiões, expandindo-se também para as Américas (PRUSÍNSKI, 2015). Sua produção é de grande potencial, com elevada capacidade de cultivo, resistentes a solos pobres e situações adversas, capazes de melhorar a fertilidade da terra por fixação de nitrogênio em solo e relação simbiótica com bactérias (*Bradyrhizobium* ou *Rhizobium*)(HUYGHE, 1997), voltada para adubação verde e também para alimentação humana e animal (GLADSTONES, 1970; KURLOVICH, 2002; PRUSINSKI, 2017).

As sementes do tremoço branco apresentam alto valor nutritivo, com baixo teor de amido, com teores de proteína de 32,9% a 38%, com predominância no teor de gordura a 8%, com conteúdo de fibra total podendo chegar até 37% (PRUSINSKI, 2017), sendo que 18% do peso total da semente corresponde a casca (HUYGHE, 1997), que é composta por polissacarídeos estruturais, como celulose, hemicelulose, pectina e uma pequena parte de lignina (HUYGHE, 1997; PRUSINSKI, 2017).

Ao investigar as proteínas, as globulinas foram identificadas como proteínas de armazenamento predominantes no tremoço, responsáveis por 90% do total contido, enquanto as albuminas representam apenas 10% do restante (ARNOLDI et al., 2015; MANE et al., 2018). As frações  $\alpha$ - (proteína semelhante à leguminosa ou globulina 11S) e  $\beta$ - (proteína semelhante à vicilina ou globulina ácida 7S) conglutinas são as duas frações de globulina mais abundantes, já a  $\gamma$ - (globulina 7S básica) e  $\delta$ - (albumina rica em enxofre 2S) conglutina se apresentam em menores quantidades (DURANTI et al., 2008; FOLEY et al., 2015).

Em outros trabalhos, as frações de proteína da farinha de tremoço branco foram analisadas por Molina (2010) que identificaram 11,33% de albumina, 41,37% de globulina, 19,24% de glutelina e 7,66% de globulina sobrenadante.

Os aminoácidos essenciais como leucina, lisina, isoleucina, cisteína, treonina, valina, e histidina se apresentaram de forma abundante nas proteínas avaliadas das sementes de tremoço branco (CARVAJAL-LARENAS et al., 2016).

Ao investigar a composição e as propriedades dos grãos de tremoço branco, Erbaş, Certel e Uslu (2005), quantificaram 32,2% de proteína, 16,2% de fibras, 5,95% de óleo e 5,82% de açúcares. O principal componente lipídico encontrado foi o ácido graxo monoinsaturados (55,4%), seguido do poli-insaturados (31,1%) e do saturado (13,5%). Destes, o principal ácido graxo encontrado foi o ácido oleico. Com relação ao teor de açúcar, os autores encontraram sacarose (71%), galactose (8,4%) e glicose (6,7%). A niacina foi a vitamina encontrada em maior teor, e a tiamina em menor.

Castilho, Fontanari e Batistuti (2010) ao comparar a farinha de tremoço branco com a de feijão guandu, identificaram que a farinha de tremoço branco apresentou maior quantidade de proteína (41%) em relação à farinha de feijão guandu (22%). De acordo com os autores, as proteínas presentes no tremoço branco apresentam importantes propriedades emulsificadoras e colaboram para o processo de estabilização das partículas de gordura, contidas em emulsão, em sistemas que contenham carnes processadas.

### **2.1.3 Aplicação na alimentação humana**

Novos produtos vem sendo formulados utilizando tremoços para enriquecer produtos como pães, bolos, massas, bolachas, laticínios e fermentados, bem como também, substituir carne e lácteos (KOHAIJDOVÁ; KAROVIČOVÁ; MAGALA, 2013; PLUSTEA et al., 2022; VILLARINO et al., 2016)

As proteínas do tremoço branco, podem impactar positivamente a saúde humana, principalmente as  $\beta$ -,  $\gamma$ - conglutinas que são capazes de modular o metabolismo de lipídios e glicose, controlando a glicemia pós-prandial e reduzindo níveis de colesterol no estágio de disglícemia (GUZMÁN et al., 2021).

Outros agentes promotores da saúde humana, também são encontrados nas sementes de tremoços branco, conferindo ação antioxidante, antibacteriana e antimutagênica, provenientes principalmente de compostos fenólicos, como as isoflavonas, flavonas e ácidos fenólicos. Além desses, também são encontrados fitoesteróis, tocoferóis e esqualeno (KARAMAĆ et al., 2018). Tornando a comercialização dos tremoços imprescindíveis no mercado, podendo ser associados a tratamentos preventivos, bem como a doenças, como doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, colesterol e obesidade (YAVER; BILGIÇLI, 2021).

Além disso, a inserção dos tremoços na alimentação humana como alternativa proteica, poderá atender consumidores de hábitos veganos e alimentos sem glúten.

### **2.1.3 Alcalóides de quinolizidina – fator antinutricional**

O tremoço branco também é conhecido como tremoço doce, sendo um dos mais usados na alimentação humana por conter proporções reduzidas de alcalóides de quinolizidina e outros fatores antinutricionais (SCHINDLER et al., 2011; VAN DE NOORT, 2016). O termo doce é dado as espécies de tremoços que possui concentrações de alcaloides de até 0,5 g / kg MS de sementes (HAMA et al., 2022).

De acordo com Van De Noort, 2016 e Ruiz-López et al., 2019 os tremoços brancos apresentam alcalóides em sua composição variando entre 0,1 e 0,4 g/kg. Enquanto Magalhães et al. (2017) quantificou alcalóides em 5 variedades de tremoços branco, nas quais apenas 3 apresentaram teores totais de alcalóides abaixo de 0,5 g/kg MS, sendo consideradas espécies doces, e somente 1 delas respeitou o limite máximo permitido (0,2 g/kg MS) para alimentação humana. Já Carvajal-larenas et al. (2016) declara, que tremoço branco apresenta em média 1,86 g de alcalóides por kg de sementes, sendo considerado como o tremoço de menor toxicidade,

enquanto o tremoço andino possui o maior teor de alcalóides (28 g/kg MS) entre as espécies mais importantes cultivadas.

Embora o teor de alcalóides em tremoços doces muitas vezes foge do limite máximo considerado, vários outros autores reafirmaram que o tremoço branco faz parte das espécies doces domesticadas, entretanto devido os alcalóides de quinolizidina serem responsáveis por proteger à planta contra patógenos e pragas, as espécies ficam susceptíveis a readquirir teores tóxicos de alcalóides amargos (alcalóides de quinolizidina), conforme as condições de estresse no plantio ao ataque de doenças e pragas (ESTIVI et al., 2022a; FRICK et al., 2017; KROC et al., 2017). Fazendo-se necessário um processamento de remoção e ou quantificação dos alcalóides amargos, garantindo que seu conteúdo total esteja abaixo do máximo permitido (200 mg/kg) para ingestão humana e animal (SCHRENK et al., 2019).

A Tabela 4 demonstra os alcaloides mais comuns encontrados nas variedades de *Lupinus*, a qual a esparteína é o alcalóide de maior toxicidade, apresentando-se duas a três vezes mais tóxica que a lupanina, sendo comumente encontrado em *L. luteus* e *L. mutabilis*. Apesar das diferenças nas toxicidades, ambas em caso de toxicação aguda, podem apresentar sintomas de fraqueza, dor de cabeça, distúrbios visuais, náuseas, vômitos, e até mesmo episódios fatais por parada cardíaca e respiratória (BOSCHIN; RESTA, 2013; CORTÉS-AVENDAÑO et al., 2020; PRUSINSKI, 2017).

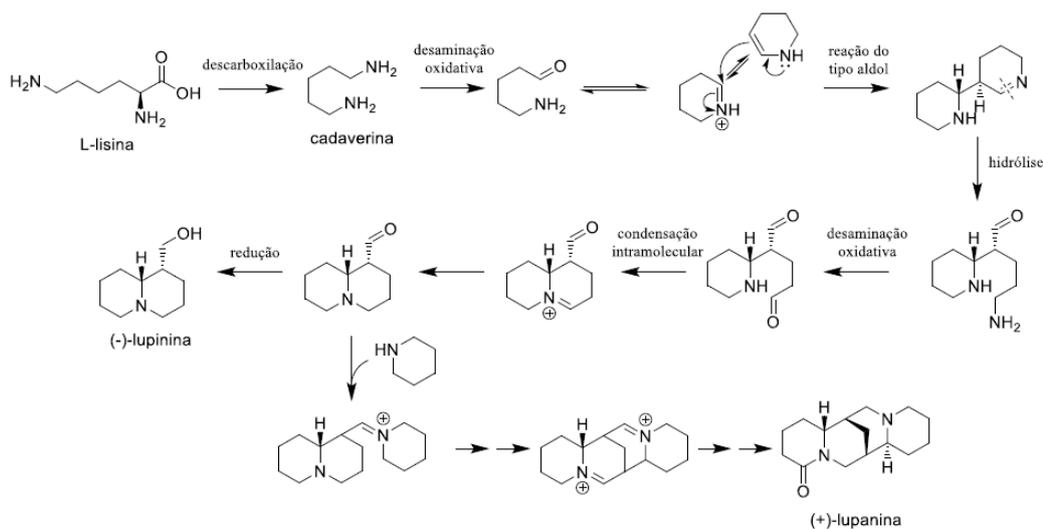
**Tabela 4.** Composições (%) de alcalóides quinolizidínicos em grãos *in natura* de diferentes espécies de tremoço.

Alcalóides	<i>L. albus</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. luteus</i>	<i>L. mutabilis</i>
Albino	15 %			
Lupanina	70%	70%		46%
Multiflorado	3%			
3-Hidroxlupanina				12%
13-Hidroxlupanina	8%	12%		12%
Angustifolina		10%		
Lupinina			60%	
Esparteína			30%	16%

Fonte: VAN DE NOORT (2016)

A estrutura química dos alcalóides de quinolizidina são heterocíclicas, contém nitrogênio, e conferem basicidade ao vegetal alocado. São originados do aminoácido lisina que após sofrer a descarboxilação é convertido em cadaverina, o qual é o composto principal responsável por formar todos os outros alcalóides quinolizidínicos. Após a formação da cadaverina, ocorre a desaminação oxidativa, obtendo uma enamina, que posteriormente sofre uma reação do tipo

aldol, obtendo um composto intermediário, que na sequência sofre uma hidrólise no grupo imina, repetindo a reação de desaminação e formação de um novo composto concluindo o núcleo de quinolizidina. A lupanina, que é o alcalóide majoritário no tremçoço branco, se forma através da incorporação de a uma terceira molécula de lisina ao núcleo quinolizidina, formando tetraciclos bis-quinolizidínicos, nomeado por lupanina (Figura 3) (AFONSO, 2020; BOSCHIN; RESTA, 2013; FRICK et al., 2017).



**Figura 3.** Biossíntese de alcalóides de quinolizidina. Fonte: AFONSO, 2020.

Os alcalóides se apresentam nos vegetais como bases livres e sais, podem ser extraídos quimicamente com auxílio de soluções ácidas e ou básicas seguidas de técnicas laboratoriais e solventes orgânicos. Entretanto, as extrações químicas no aporte nutricional, pode gerar riscos à saúde humana assim como afetar o sabor do vegetal, uma vez que o tratamento químico gera resíduos, podendo deixar resquícios no vegetal, bem como consome elevados litros de água, podendo chegar até 60 vezes ou mais do peso da semente tratada (CARVAJAL-LARENAS et al., 2016).

### 2.1.4 Processos de redução de alcalóides (desamargar)

Diante da possível toxicidade e do sabor amargo encontrado nas sementes de tremçoços, o método mais antigo e comumente usados para a ingestão dessa leguminosa, consiste em lavagens aquosas, as quais levam em torno de 5 a 6 dias para serem concluídas, acarretando em elevados consumos de água com perdas nutricionais, como fibras, vitaminas, proteínas solúveis e minerais (CARVAJAL-LARENAS et al., 2016; CÓRDOVA-RAMOS et al., 2020; ERBAS, 2010; VILLACRÉS; ÁLVAREZ; ROSELL, 2020). As lavagens são encerradas através de provas

sensoriais como teste de verificação da remoção de alcalóides, pela presença ou ausência do sabor amargo (CORTÉS-AVENDAÑO et al., 2020) que expõe os provadores a riscos de toxidades.

Em busca de alternativas mais eficientes, vários métodos vêm sendo desenvolvidos para remover ou reduzir os alcalóides amargos, com propósito de diminuir o tempo de processamento e o consumo de água.

Métodos biológicos como a fermentação foram capazes de remover os alcalóides e outros compostos antinutricionais das sementes de tremoços, promovendo uma melhora na qualidade nutricional dos grãos, sem interferir na disponibilidade de minerais, como o cálcio, zinco e ferro (CURIEL et al., 2015; GHOSHAL; BASU; SHIVHARE, 2012; SAHARAN et al., 2020). Estes processos se baseiam principalmente na fermentação em estado sólido usando fungos (VILLACRÉS et al., 2020) ou bactérias (BARTKIENE et al., 2013). Estudos indicam que a fermentação fúngica tem efeito na redução de oligossacarídeos e alcalóides quinolidínicos, como observado por Jiménez-Martínez et al. (2009) ao avaliar o efeito do crescimento de *Rhizopus oligosporus* nos níveis de alcalóides quinolizidínicos, oligossacarídeos e compostos fenólicos em espécies de tremoço e soja. Os resultados mostraram que após 48 horas de fermentação, o teor de alcalóides e oligossacarídeos diminuíram em mais de 90% no total.

Segundo Carvajal-Larenas et al. (2016), apesar do uso potencial dos processos biológicos, eles apresentam diversas limitações, como ao fato deste processo demandar também um método físico, como descasque, moagem, imersão, cocção entre outros, exigindo dos estudos uma metodologia acurada para diferenciação do que seria um resultado para o processo biológico e para os processos físicos e aquosos, ou seja, um tratamento controle. Os autores argumentam também, que em alguns casos, o método biológico pode reduzir os teores de gordura, proteína e eficiência proteica, além de utilizar grande quantidade de água e tempo mínimo de dois dias.

Villacrés, Álvarez e Rosell (2020) conduziram um trabalho que teve como objetivo determinar o efeito de dois tratamentos térmicos, aquoso e salino, sobre a redução dos alcalóides quinolizidínicos. Neste estudo, os autores obtiveram bons resultados, e demonstraram que tanto o tratamento aquoso quanto o salino resultaram na remoção de aproximadamente 80% dos alcalóides presentes nos grãos, sendo que ambos tratamentos aplicaram imersão (80°C), cozimento (90°C) e lavagens (35°) nos grãos, com uma variação no tempo de cada aplicação de um tratamento para outro, e uma exceção na temperatura da última lavagem salina (18°C). Descreveram um processamento mais biologicamente viável, com relação à economia de água e tempo de processamento, na qual o tratamento salino se destacou por uma diferença de 26 h a

menos no processamento e 30 L a menos no volume de água utilizado, além de favorecer a qualidade do grão, melhorando sua textura, ampliando seu tamanho, e reduzindo sua dureza.

Estivi et al. (2022), avaliaram a remoção de amargor em tremoço branco por diferentes solventes (água, NaCl 0,5% e 1%, ácido cítrico 0,5% e 1%), com diversos tempos de imersão (28, 45, 57 e 69 h), com ou sem aplicação do equipamento de ultrassom nas etapas de lavagem ( $65,0 \pm 3,3$  W a  $50^\circ\text{C}$ ) e cozimento ( $26,9 \pm 1,7$  W a  $95^\circ\text{C}$ ), sendo a sonicação aplicada somente nos ensaios com solventes de NaCl 1%, ácido cítrico 1% e água. Além disso, realizaram também métodos de controle, como o método aquoso proposto por Córdova-Ramos et al., 2020, e o método salino aquoso proposto por Villacrés; Álvarez E Rosell, 2020. Os resultados relatados foram que a aplicação do ultrassom não colaborou em nada para a redução de alcalóides nos ensaios, entretanto a combinação de solvente e tempo de imersão apresentaram resultados significativos para a redução dos alcalóides, destacando maior redução para a combinação de 45h com a solução de ácido cítrico 1% (alcalóides residuais:  $0,80 \pm 0,09$  g/kg MS), seguido pela solução de NaCl 1% ( $1,37 \pm 0,15$  g/kg MS), e por último a água se apresentando como o pior solvente ( $5,42 \pm 0,24$  g/kg MS) no ensaio de tempo de 45h (figura 3). Em geral as amostras desamargadas pelo método experimental, tratadas com soluções de ácido cítrico a 1% apresentaram os melhores resultados em termos de redução de alcalóides, chegando até  $0,31 \pm 0,09$  g/kg MS no tempo de operação mais estendido de 69 h, com o consumo de água de 45 L/kg de semente, obtendo resultados mais eficientes quando comparados aos métodos controles realizados. O método controle com água obteve um valor de alcalóides residuais de  $0,95 \pm 0,12$  g/kg MS após 133 h de tratamento, com o consumo de 100 L água/kg de semente seca, enquanto o método controle da solução de NaCl reduziu o teor de alcalóides para  $0,66 \pm 0,00$  g/kg MS após 58 h de processamento, consumindo 66 L de água/kg de semente seca. Ressaltando que o método experimental proposto pelos autores não só reduziu os teores de alcalóides a níveis mínimos relatados, bem como economizou tempo e água, reduzindo volume de efluentes tóxicos a serem descartados, assim como encontrou resultados semelhantes aos métodos controles avaliando, das amostras tratadas com NaCl 1% e ácido cítrico 0,5% por 57 h e 40 L água/kg de semente, e com ácido cítrico 1% por 45 h e 35L água/kg de semente, sendo muito mais otimizados.

#### **2.4. Extrusão reativa**

A extrusão reativa (REX) é uma extrusão termoplástica adicionada de algum reagente químico, na qual tem sido usada para a modificação química de vários polímeros. É um processo

termomecânico, capaz de operar em temperaturas elevadas e em curto espaço de tempo (HTST), plastificando ou cozinhando alimentos como amiláceos e/ou proteínáceos no barril do equipamento, pela combinação de fatores como: umidade do material, pressão no canhão, temperatura, cisalhamento, mais adição de reagente químico (MILOTSKYI et al., 2019; PANDIYAN et al., 2019; SMITH, 1976).

O processo da extrusão é contínuo e de um único estágio, que por envolver elevadas temperaturas e tempo curto por ensaios, ocorrem diferentes operações unitárias, como texturização, redução do tamanho de partícula, mistura, transferência de calor e massa, cisalhamento, modelagem, caramelização, fusão, entre outros mais, colaborando com a transformação dos alimentos quanto as suas características químicas, físicas e nutricionais (GUY, 2002; NIKMARAM et al., 2017), diminuindo não só as perdas nutricionais e sabores dos alimentos pós-colheita, como também inativando enzimas, reduzindo compostos antinutricionais e microorganismos presentes nos vegetais (BERRIOS; ASCHERI; LOSSO, 2012).

Durante a REX, ocorre o fornecimento de campos multi-físicos que promove diversas transformações químicas e físicas, incluindo esterificação, quando reage com ácido cítrico (ABURTO et al., 1999), anidro acético e anidros (CHI et al., 2008; SHOGREN, 2003). Os ácidos orgânicos, como o ácido cítrico por exemplo, têm sido utilizados como compatibilizantes, devido aos seus grupos de ácidos carboxílicos poderem reagir com grupos hidroxilas de amidos através de forças de ligação secundárias, reduzindo a hidrofobicidade do amido (GARCIA et al., 2014; MARTINS; SANTANA, 2016). Além disso, foi constatado uma melhora nas propriedades mecânicas das misturas na presença do ácido cítrico como compatibilizante (OLIVATO et al., 2011). As reações são controladas através de dois fatores importantes, que são o tempo e a mistura. O tamanho da rosca da extrusora, a taxa de adição dos reagentes e também a configuração e a velocidade da rosca irão influenciar na complexidade da mistura e no período de tempo da reação (RIGOLIN, 2014).

A extrusão reativa necessita de controle de processo preciso, em alguns parâmetros como tempo e temperatura, por causa da capacidade das estruturas de levar reagentes de alta pureza e viscosidade, produzindo materiais com alta taxa de conversão e elevadas massas molares (GUTIÉRREZ; PAULA GUARÁS; ALVAREZ, 2017).

O material processado é submetido a diversas modificações, como: homogeneização, liquefação de gorduras, hidratação de proteínas e amidos, desnaturação de proteínas, gelatinização do amido, plastificação e expansão do material processado. Estruturando produtos

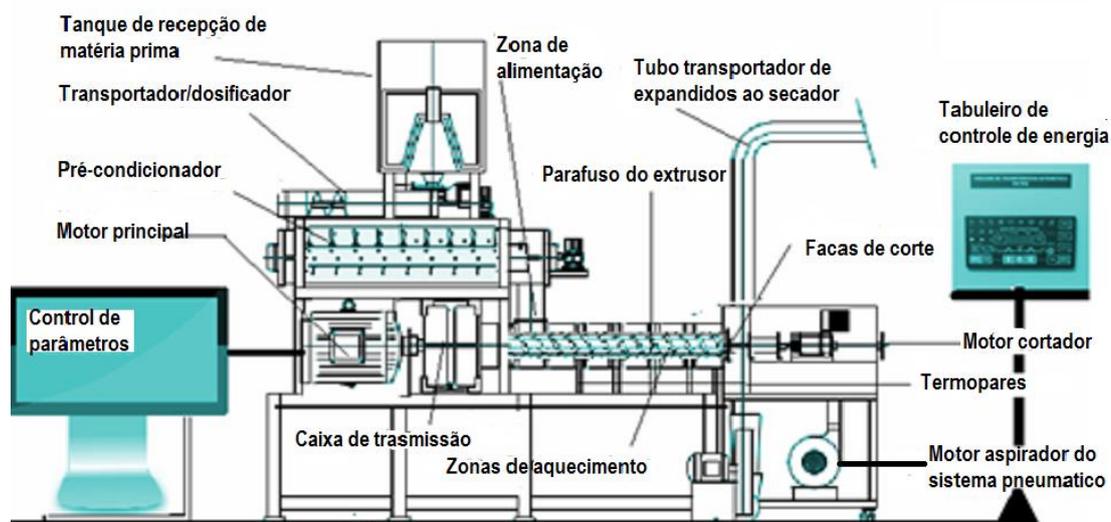
com novas formas e texturas prontas para o consumo, ou pré-gelatinizadas, servido como ingredientes ou formulados instantâneos solúveis em água (TOLEDO et al., 2020).

A extrusão é uma forma de cocção rápida que produz extrudados do tipo salgadinhos, crispbread, cereais matinais, farinhas pré-gelatinizadas, massas pré-cozidas, biscoitos, bolachas, rações para animais, entre outros, se destacando na produção de “snacks” em geral e na texturização de proteína vegetal (ALAM et al., 2016). Os produtos extrudados são mais chamativos aos consumidores, por possuírem uma enorme variedade de ingredientes, texturas, e formas a base de sementes (NIKMARAM et al., 2015).

O equipamento que realiza a extrusão, denominado por extrusor, contém na sua estrutura: silo de alimentação, canhão, parafuso(s), motor, caixa de transmissão, sistema de aquecimento e resfriamento, matriz e mecanismo de corte (ASCHERI, 2022).

Na etapa de extrusão, o material é inserido no extrusor por meio do alimentador, que é responsável por armazenar e alimentar o canhão, o canhão é um cilindro onde toda a matéria prima é processada, por meio de uma ou duas rosca(s) associadas que levam o produto às distintas zonas do canhão da extrusora (de alimentação, de alta pressão e de transição) com rotação e temperaturas já predeterminadas, com o aumento progressivo do cisalhamento mecânico provocado pela rotação da(s) rosca(s) é gerando a transferência de calor das camisas do canhão para o material processado, então este é convertido em uma massa fundida provocando transformações moleculares como resultado, a pressão e a temperatura também se elevam conforme o produto vai sendo processado, até que se encerra dando-se cozimento ao produto, saindo pela matriz, que modela o produto nas características desejadas, acompanhada de um mecanismo de corte.

A capacidade produtiva de uma extrusora depende do tipo e modelo da mesma, bem como das características físico-químicas da matéria prima, podendo chegar a processar até 25 toneladas de produto por hora (MRS-EXTRUDER da Gneuss). A Figura 4 ilustra a estrutura de uma de extrusora de rosca única.



**Figura 4.** Esquema de um extrusor de rosca única. Fonte: Ascheri (2022).

Após a extrusão realiza-se a secagem dos extrudados para umidades inferiores a 5% associando ao resfriamento, e em algumas situações aplicam temperos e sabores (ASCHERI; CARVALHO, 2022).

As vantagens da extrusão estão relacionadas a flexibilidade de combinar ingredientes, utilizando vários tipos de vegetais, bem como subprodutos agroindustriais, ou resíduos previamente tratados, para o desenvolvimento de novos produtos, com alto valor agregado, baixo custo de produção associado, sem geração de efluentes, sendo biologicamente viável (TOLEDO et al., 2020). Por ser um processo HTST apresenta vantagens econômicas e nutritivas pelo seu tempo de processamento ser curto e contínuo, em comparação aos processos térmicos convencionais, bem como oferece viabilidade de melhorar propriedades sensoriais e funcionais dos alimentos processados, aumentando a digestibilidade de proteínas e amido, além de reduzindo ou inativar compostos antinutricionais, que muitas vezes são encontrados nos vegetais responsáveis por conferir toxicidade ao consumo humano e animal (GALDEANO, 2022; SOARES JÚNIOR et al., 2011; WANG et al., 2009).

As características dos extrudados são baseadas nas composições químicas do produto, no estado físico que ele entra, nas propriedades reológicas que possuem, nas características da extrusora e dos parâmetros de processo preestabelecidos. A composição dos materiais influencia na qualidade dos extrudados processado. Alimentos proteicos, são importantes para extensibilidade, elasticidade, retenção de gás e estrutura celular, absorção de água, adesividade, ligação e expansão. Já os amiláceos são importantes principalmente para adesão, expansão e

coesão. Os alimentos fibrosos são usados para controle da textura e da densidade, agregando valor funcional aos processados. Enquanto os lipídeos são os fatores de maior desafio, pois em concentrações elevadas dificulta o processo de expansão (SHUKLA,1998).



## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes processos (aquoso, extrusão e extrusão reativa) sob o teor de alcalóides, caracterização físico-química e digestibilidade *in vitro* de proteínas de tremoço branco.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar sementes de tremoço selecionadas através da quantificação de alcalóides, análises físico-químicas, eletroforese e digestibilidade *in vitro* de proteínas.
- Processar farinha de tremoço por extrusão e extrusão reativa para avaliar o impacto do processamento sobre a redução de alcalóides amargos presentes no grão.
- Realizar um processo térmico aquoso avaliando o comportamento dos alcalóides no grão durante as etapas de imersão, lavagens e cocção.
- Selecionar os melhores tratamentos de remoção ou redução de alcalóides do grão para caracterização físico-química, digestibilidade *in vitro* de proteínas e eletroforese dos tratamentos e da digestão.
- Avaliar o comportamento das proteínas solúveis e aminoácidos aromáticos nas amostras digeridas, não digeridas e simuladas sob o efeito dos fluidos gástricos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de execução

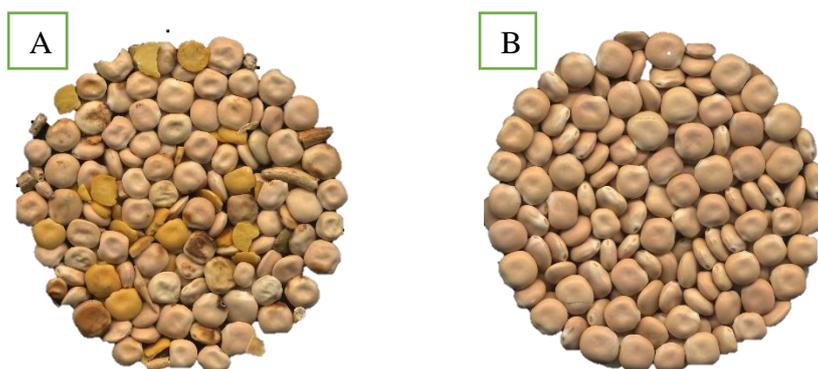
O trabalho de pesquisa foi desenvolvido nas instalações da Embrapa Agroindústria de Alimentos, planta piloto IV. O acondicionamento do material, o processo de extrusão e as avaliações físicas tanto da matéria prima quanto dos extrudados foram realizados nos laboratórios de Moagem, Extrusão e Análises Físicas da planta piloto IV. As avaliações químicas da matéria prima e dos extrudados foram realizadas nos laboratórios de Bioquímica e Físico-química da mesma instituição.

### 4.2 Material

Os grãos de tremoço branco (*Lupinus albus*) foram adquiridos da empresa BRSEEDS (São Paulo, Brasil). O ácido cítrico utilizado no experimento foi de qualidade analítica sem a necessidade de purificação adicional, fornecido pela própria instituição (Embrapa).

### 4.3 Seleção de Grão

Os grãos de tremoço branco foram selecionados manualmente, removendo os grãos chochos, ardidos, quebrados, descascados, assim como as partículas estranhas e as impurezas (Figura 5).



**Figura 5.** Grãos de tremoço branco. A) Grãos não selecionados. B) Grãos Sadios selecionados

### 4.4 Processo aquoso (I)

O processo aquoso (I) foi realizado como um método controle para remover alcalóides nas sementes de tremoços branco, de acordo com CÓRDOVA-RAMOS et al., (2020). Utilizou-

se 2,8 kg de grãos integrais, submetendo-os em processos de imersão, cocção e lavagens, coletando-se amostras (350 g) a cada etapa realizada durante o processo ocorrido. Primeiramente separou-se uma porção dos grãos integrais *in natura* (I0), grãos após 12 h de imersão (I1), grãos após 12h de imersão mais 1h de cocção (I2), grãos após 12 h de imersão mais 1h de cocção e mais 24 h, 48 h, 60 h, 72 h e 84 h de imersão, correspondente as amostras I3, I4, I5, I6 e I7 respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 5. Após a coleta das amostras, os grãos foram secos em estufa com circulação de ar a 50°C por 18 h, resfriados a temperatura ambiente, e moídos em moinho de martelo LM3100 (Perten Instruments AB, Huddinge, Suécia) equipado com uma peneira de 0,8 mm de abertura, obtendo um tamanho de partícula desejável para as análises. As farinhas obtidas foram acondicionadas em embalagens hermeticamente fechadas (EHF), sem incidência de luz e armazenada em refrigeração a 4 °C, até serem analisadas.

**Tabela 5.** Processo aquoso por imersão, cocção e lavagens de tremoço branco.

Tratamentos <sup>1</sup>	Amostras							
	I0	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7
Imersão em água*	-	12h						
Fervura por 1h com troca de água a cada 30 min. **	-	-	1h	1h	1h	1h	1h	1h
Molho com troca de água a cada 24 h. **	-	-	-	24h	48h	60h	72h	84h

<sup>1</sup> De acordo com CÓRDOVA-RAMOS et al., (2020). Proporção semente-água: \* 1:6 (p/v). \*\* 1:3 (p/v).

#### 4.5. Testes preliminares a extrusão (II)

Para determinar os parâmetros dos processos por extrusão, várias condições foram previamente testadas (granulometria da farinha, teor de ácido cítrico, umidade, taxa de alimentação, rotação do parafuso e temperatura de aquecimento), de modo assegurar que as condições de ensaio seriam processadas sem qualquer interferente.

Os resultados destes testes geraram os parâmetros definitivos do delineamento experimental.

#### 4.6. Processos por extrusão (III)

##### 4.6.1. Produção de farinha crua

Uma porção dos grãos de tremoço branco já selecionados, foram secos em estufa com circulação de ar à  $50 \pm 0,5$  °C por 12 h, resfriadas em temperatura ambiente, e moídas em moinho de discos (Perten Laboratory Mill 3600, USA) com abertura seis entre os discos, afim de obter um tamanho de partícula desejável para extrudar. A farinha obtida foi acondicionada em EHF

sem incidência de luz, armazenada em refrigeração a 4 °C até serem analisadas e preparadas conforme o delineamento experimental da REX.

#### 4.6.1.1. Umidade

Um dia antes do processo de extrusão, determinou-se a umidade das farinhas por termogravimetria, em duplicata, por secagem de  $2 \pm 0,005$  g de farinha à 105°C em balança de umidade MOC-120H (Shimadzu, Japão) e secado até atingir uma umidade constante.

#### 4.6.2. Extrusão Termoplástica e Reativa

A REX proposta neste estudo foi conduzida usando um delineamento fatorial  $2^2$  com quatro pontos centrais aumentados. As variáveis de estudo consideradas foram umidade de cozimento por extrusão ( $X_1$ ) e adição de ácido cítrico ( $X_2$ ). Os níveis reais para cada fator (Tabela 6) foram determinados com base nos testes preliminares (item 4.5) e também considerando as condições de operação da extrusora utilizada. Para  $X_1$  foram 15 a 25% e para  $X_2$  foram 1 e 3%. Os níveis codificados (-1 e +1) foram calculados de acordo com a equação (1).

$$x_i = \frac{X_i - Z}{\Delta X_i} \quad (1)$$

Onde  $x_i$  é o valor codificado da variável;  $X_i$  é o valor real da variável;  $Z$  é o valor real da variável no ponto central e  $\Delta X_i$  é o valor do intervalo de variação.

**Tabela 6.** Valores reais das variáveis independentes a ser utilizados no delineamento.

Variáveis independentes	Valores codificados		
	-1	0	+1
$X_1$ : Umidade de alimentação (%)	15	20	25
$X_2$ : Inclusão de ácido cítrico (%) <sup>a</sup>	1	2	3

<sup>a</sup> em base seca.

Um total de 9 ensaios experimentais foram conduzidos, sendo 8 do delineamento experimental e 1 controle sem adição de ácido e água. A Tabela 7 apresenta todos os ensaios experimentais extrudado, bem como a matriz do delineamento com valores codificados e valores reais por ensaio, e a ordem que ocorreu a extrusão de cada um.

Cada ensaio foi pré condicionado com base no teor de umidade e acidez de acordo com o delineamento experimental. A quantidade de água ( $W$ , g) adicionada para ajustar o teor de umidade de alimentação ( $X_1$ ) foi calculada conforme a equação (2).

$$W = B \frac{(M_f - M_0)}{(100 - M_f)} \quad (2)$$

Onde  $B$  é a quantidade do material a ser umedecida (400 g),  $M_0$  é o teor de umidade inicial determinado no item 4.6.1.1,  $M_f$  é o teor de umidade final de acordo com o delineamento experimental.

A mistura foi realizada conforme os níveis determinados pelo delineamento experimental, na qual o ácido cítrico ( $X_2$ ) foi dissolvido na quantidade de água ( $W$ ) determinada, que posteriormente foi acrescido na farinha de tremoço (produzida no item 4.6.1.) já pesada. As misturas foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 30 min no acondicionamento de umidade em EHF, na sequência foram peneiradas em peneiras de aço inox (Newark, U.S.A.) com abertura de 2 mm, distribuindo uniformemente a umidade adicionada, desfazendo os possíveis grumos formados, e por fim foram novamente acondicionadas em EHF, deixadas em repouso por 3h e 30 min, até que foram extrudadas.

O extrusor utilizado foi de parafuso simples (Brabender, 19/20 DN, Duisburg, Alemanha), equipado com um alimentador volumétrico, sendo a taxa de alimentação mantida a 4 kg/h (correspondente a rotações do parafuso do alimentador de 12 a 20 rpm). A taxa de compressão do parafuso inserido no canhão foi de 3:1. O perfil de temperaturas para aquecer, as três zonas do canhão, foi fixado em 40, 80 e 120 °C respectivamente. A velocidade de rotação do parafuso foi mantida em 150 rpm. Uma matriz circular de 3 mm de diâmetro foi acoplada na saída do canhão.

**Tabela 7.** Delineamento completo do ensaio experimental extrudado de tremoço branco.

Código da Amostra	Ordem da Extrusão	Valores codificados		Valores reais	
		$x_1$	$x_2$	$X_1$ (%)	$X_2$ (%) <sup>a</sup>
III0	9°	-	-	8,29	-
III1	3°	-1	-1	15	1
III2	1°	1	-1	25	1
III3	5°	-1	1	15	3
III4	7°	1	1	25	3
III5	2°	0	0	20	2
III6	4°	0	0	20	2
III7	6°	0	0	20	2
III8	8°	0	0	20	2

$x_1 = X_1$ : umidade de alimentação;  $x_2 = X_2$ : inclusão de ácido cítrico; <sup>a</sup> em base seca.

Após atingir condições estáveis de torque na extrusão, extrudados cilíndricos de 50 a 60 cm de comprimento foram coletados e em bandejas de aço inox perfuradas e identificadas de acordo com cada ensaio. Após 5 a 10 min de repouso ao ambiente, os extrudados cilíndricos

foram secos em estufa de ar a 50°C por 4h. Ao término da secagem o material foi triturado manualmente, resfriados a temperatura ambiente, e moídos em moinho de martelo. As farinhas obtidas foram acondicionadas em EHF, sem incidência de luz e armazenada em refrigeração a 4°C, até serem analisadas.

### 4.6.3 Energia mecânica específica (EME)

Durante o processo da REX foi calculada a vazão mássica de extrudado. coletando em sacos plásticos previamente tarados, uma quantidade de massa extrudada à saída da matriz durante um intervalo de 20 s. A massa coletada ( $m$ ) em g, foi registrada através de balança semi analítica, realizada em duplicata, com espaçamento de 3 min para amostragem de cada ensaio realizado.

O cálculo da vazão mássica ( $Q$ ) em kg/min foi realizado com a equação (3).

$$Q = \frac{m}{t} \quad (3)$$

Onde  $m$  é a massa coletada, em kg;  $t$  é o tempo de coleta, em minutos. A partir do cálculo de vazão mássica, e do registro do torque da REX monitorado pelo software WINEXT, versão 4.4.0 (Brabender, Duisburg, Alemanha) que acompanha o extrusor, foi possível calcular a energia mecânica específica (EME).

A EME foi calculada de acordo com Fan, Mitchell e Blanshard (1996) usando a equação (4).

$$EME = \frac{(Torque) \times (V. angular) \times (n^\circ \text{ parafusos})}{vazão mássica} = \frac{T \times 2\pi f \times n}{Q} \quad (4)$$

Onde  $T$  é o torque gerado no processo de extrusão em N.m,  $f$  é a frequência de rotação do parafuso em  $min^{-1}$ ,  $n$  é o número de parafusos e  $Q$  é a vazão mássica em kg/min.

## 4.7. Análises de Alcalóides

### 4.7.1. Análise qualitativa por Wagner<sup>1</sup>

Em razão ao grande número de amostras geradas pelos processos I e III, o método colorimétrico por Wagner foi aplicado como uma técnica de triagem, selecionando amostras que apresentaram diferenças visuais na coloração ao aplicar o reagente de Wagner sobre os extratos

---

<sup>1</sup> Wagner, é uma solução constituído de: iodo e iodeto de potássio (1:2)

das amostras geradas, esse método foi realizado de acordo com WILCZURA et al., (2018), com algumas modificações.

Para produção dos extratos, 1g de amostra (item 4.4 e 4.6.2) foi pesado, adicionando-se 15 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH, 0,1 M), a mistura formada foi homogeneizada em blender por 1 min, e filtrada em filtro de algodão. O filtrado foi centrifugado a 8000 rpm, por 5 min em temperatura ambiente, coletando o sobrenadante livre de lipídeos. Após a obtenção de todos os extratos, sobre uma placa de vidro devidamente identificada, adicionou-se 100 µL de cada extrato, e de forma simultânea pingou-se sobre os mesmos duas gotas do reagente de Wagner, avaliando de forma imediata a reação colorimétrica ao reagente adicionado.

#### **4.7.2. Quantificação de alcalóides por titulação colorimétrica**

A análise de quantificação de alcalóides por titulação foi aplicada nas amostras já selecionadas pelo método de Wagner (item 4.7.1), sendo quantificadas em duplicatas, de acordo com Von Baer et al. (1979) e algumas modificações.

Em um béquer adicionou-se 0,2 g de farinha de tremoço, 0,2 mL de hidróxido de potássio a 15% e 0,6 g de óxido de alumínio básico homogeneizado manualmente até que a mistura ficasse uniforme. A mistura foi então transferida para um tubo falcon de 25 mL, e foram adicionados 6 mL de clorofórmio. Após o tubo hermeticamente fechado, o conteúdo foi agitado em vórtex por 1 min e centrifugado por 2 min a 3.000 rpm. Dentro de uma capela de exaustão, o sobrenadante contendo os alcalóides foi filtrado em filtro de algodão e coletado em Erlenmeyer de 250 mL. A extração com clorofórmio foi realizada até esgotamento total dos alcalóides (10 vezes). A comprovação do esgotamento iniciou-se a partir da oitava extração através de 1 mL de extrato evaporado e ressuspenso em 5 gotas de ácido sulfúrico 0,01 N, com adição subsequente de 3 gotas do reagente de Wagner. Os volumes filtrados foram somados e transferidos à um béquer para facilitar a evaporação do solvente (clorofórmio) na capela de exaustão, levando em torno de 4 h para completa secagem, obtendo o filtrado em base seca (b.s).

Para titulação, 5 mL de solução de ácido sulfúrico 0,01 N foram adicionados na matéria seca (filtrado b.s) e com auxílio de um bastão de vidro foram homogeneizados. O excesso de ácido foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,01 N, na presença de 4 gotas de vermelho de metila. O volume (mL) de solução de hidróxido de sódio ( $V_{\text{NaOH}}$ ) consumido durante a titulação foi medido e o teor de alcaloides, expresso em g/kg (b.s), foi calculado através da equação 5, considerando que 1 mL de ácido sulfúrico 0,01 N equivale a 2,48 mg de Lupanina (INEN, 2005).

$$\text{Teor de alcaloides} \left( \frac{\text{g}}{100 \text{ g b. s.}} \right) = \frac{2,48 \times (5 - V_{NaOH}(\text{mL})) * 10}{\text{Peso de amostra seca (g)}} \quad (5)$$

#### 4.8. Seleção de amostras

Através das análises qualitativa (item 4.7.1) e quantitativa (item 4.7.2) de alcalóides nos processos I e III, selecionaram-se as amostras mais significativas para caracterização físico-química e digestibilidade *in vitro* de proteínas.

#### 4.9. Análises de composição química

As análises de composição química foram realizadas de acordo com os métodos analíticos oficiais da AOAC (2010).

O teor de umidade foi determinado pelo método 925,09 a 105°C até peso constante. Para determinação do teor de proteína, foi utilizada a metodologia padronizada por Kjeldhal (método 2001,11), que se baseia na determinação do teor de nitrogênio total da amostra, que é convertido em proteína bruta por um fator de conversão de 5,75 no caso de leguminosas. O extrato etéreo foi determinado pelo método de Soxhlet (método 945,38), e o teor de cinzas foi por incineração a 550 °C (método 923,03). A fibra alimentar total foi obtida a partir da soma das frações solúvel e insolúvel da fibra, por método enzimático-gravimétrico (método 991.43). Enquanto o teor de carboidrato total foi obtido por diferença, subtraindo-se da massa total (100%) os valores obtidos de umidade, proteínas, extrato etéreo, cinzas e fibra alimentar total.

#### 4.10. Índice de absorção e solubilidade em água

Os índices de absorção em água (IAA) e solubilidade em água (ISA) foram determinados conforme metodologia de Pichmony et al. (2021) com modificações.

Em um tubo falcon previamente pesado foi adicionado  $1 \pm 0.0005$  g de amostra e 5 mL de água destilada (25°C), homogeneizou-se por 20 s em vórtex e em seguida adicionou-se outros 5 mL de água destilada para lavar qualquer partícula aderida à parede do tubo. As misturas foram deixadas em repouso durante 30 min sob temperatura ambiente, e posteriormente foram centrifugadas a 9000 rpm a 25°C durante 15 min em centrífuga Universal 320R (Hettich, Tuttingen, Alemanha). O líquido sobrenadante foi cuidadosamente vertido em prato de evaporação previamente pesado, o qual foi secado em estufa com circulação de ar 105°C por 4 h. Em seguida o material foi resfriado em dessecador e pesado em balança analítica, obtendo o peso de sólidos solúveis totais presentes no sobrenadante. O decantado armazenado no tubo, foi

pesado. As análises de IAA e ISA foram realizadas em quadruplicada, calculadas através das equações (6) e (7).

$$IAA \left( \frac{g}{g} \right) = \frac{\text{peso do precipitado (retido no tubo falcon)}}{\text{peso seco original da amostra}} \quad (6)$$

$$ISA(\%) = \left( \frac{\text{peso dos sólidos solúveis do sobrenadante}}{\text{peso seco original da amostra}} \right) \times 100 \quad (7)$$

#### 4.11. Digestão *in vitro* de proteínas

As amostras foram digeridas de acordo com protocolo harmonizado de digestão *in vitro* da INFOGEST (BRODKORB et al., 2019) composta pela fase oral, gástrica e intestinal.

A fase oral se iniciou com 1g de amostra pesada em tubo falcon, diluída e homogeneizada por 4 mL de fluido salivar simulado, 475 µL de água ultrapura, 25µL de CaCl<sub>2</sub>, e 500 µL de solução de amilase (concentração final de amilase 75 U/mL de digestão oral), seguida de incubação em banho maria a 37°C por 2 min com agitação de 100 rpm. Encerrando a atividade enzimática com banho de gelo. Em seguida o bolus foi diluído em 8,5 mL de fluido gástrico e 5 µL de CaCl<sub>2</sub>, ajustando o pH à 3 com HCl, adicionado em seguida 500 µL da solução de pepsina (2000 U/mL de digestão), homogeneizando e incubando em banho maria a 37°C por 2 h com agitação de 100 rpm. Cessando a atividade enzimática em banho de gelo.

A fase intestinal foi realizada misturando o ponto final da fase gástrica com o mesmo volume de fluido intestinal, acrescido de 40 µL de CaCl<sub>2</sub>, com ajuste de pH até 7 com NaOH, adicionando na sequência 5 mL de solução de pancreatina (100 U atividade de tripsina/mL da mistura final) e 2,5 mL de solução de bile (10 mM na mistura final), repetindo a homogeneização e a incubação nas condições da fase gástrica. Por fim, a atividade enzimática foi cessada por banho de gelo e os digeridos foram centrifugados a 6000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi coletado e armazenados a -20°C até as análises de interesse. Os valores de digestibilidade foram calculados através da equação (8).

$$\text{Digestibilidade (\%)} = \left( \frac{PS}{Pt} \right) \times 100 \quad (8)$$

Onde *PS* e *Pt* representam o teor de proteína no sobrenadante e o teor de proteína total, respectivamente. Ambos foram calculados de acordo com Kjeldhal (método 2001,11 – AOAC 2000).

#### **4.11.1. Amostras não digeridas**

Para termos de comparação às amostras digeridas, 1g das amostras selecionadas (item 4.8) foram diluídas em água destilada (35 mL), em volume semelhante ao volume de fluidos totais acrescido durante o processo da digestão. Além disso, elas também foram centrifugadas, com o sobrenadante coletado e armazenado de acordo com as condições relatadas no item 4.11 até as análises de interesse.

#### **4.11.2 Influência dos fluidos gastrointestinais sobre as proteínas**

Afim de verificar o quanto os fluidos gastrointestinais favoreceram a digestão das proteínas, o processo da digestão foi repetido (item 4.11) sem a adição de enzimas, utilizando 1g das amostras selecionadas (item 4.8), diluindo-as em volumes exatos aos fluidos gastrointestinais utilizados (fluido salivar, fluido gástrico, fluido intestinal), mais os volumes de água e CaCl<sub>2</sub> aplicados. Os volumes da acidificação e da basicidade de ajuste de pH das fases gástrica e intestinal foram substituídos por água ultrapura, assim como os volumes das soluções enzimáticas. No final do processo, as amostras simuladas foram centrifugadas, com o sobrenadante coletado e armazenado de acordo com as condições relatadas no item 4.11.

#### **4.11.3. Proteínas solúveis (PS) e aminoácidos aromáticos (AA)**

Proteínas solúveis e aminoácidos aromáticos foram quantificados nos sobrenadantes das amostras digeridas (item 4.11), não digeridas (item 4.11.1) e simuladas (item 4.11.2), com intuito de avaliar o nível de hidrólise das proteínas durante a digestão enzimática e a bioacessibilidade dos aminoácidos aromáticos.

As proteínas solúveis foram quantificadas de acordo com Bradford (1976) se aplicando a peptídeos e proteínas maiores que 3 kDa, com a análise colorimétrica realizada em espectrofotômetro (Analytikjena, Specord 210) a 595nm.

Os aminoácidos aromáticos foram quantificados de acordo com Goodwin e Morton (1946). Uma curva padrão foi gerada a partir de soluções com concentrações conhecidas de tirosina: 33,2 µg/ml; 66,4 µg/ml; 132,8 µg/ml; 199,2 µg/ml; 265,6 µg/ml. A leitura da absorbância da curva foi feita à 280 nm em espectrofotômetro modelo AJX-3002PC (Micronal®) e o equipamento foi zerado com branco da amostra (solução de TCA 10%). As amostras foram preparadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v), com uma razão 1:1, em triplicata e

armazenados sobre refrigeração a 4°C em *over night*. Posteriormente foram centrifugadas a 6000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada (4°C), o sobrenadante foi coletado e lido em espectrofotômetro nas mesmas condições estabelecidas para a leitura da curva.

#### **4.12. Eletroforese de proteínas**

Os sobrenadantes das amostras digeridas (item 4.11) e não digeridas (item 4.11.1) foram suspensas em tampão de amostra e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com o método de Laemmli (1970). Os géis de empilhamento e corrida foram preparados usando 8% e 12% (c/v) de soluções de acrilamida, respectivamente. A corrida eletroforética foi realizada sob uma tensão de 100 V durante as 8 h de corrida. Os padrões de peso molecular da Bio Rad foram executados em paralelo, sendo eles (em kDa): fosforilase B 104,86; albumina de soro bovino 82,35; ovoalbumina 47,49; anidrase carbônica 33,62; inibidor de tripsina de soja 27,12 e lisozima 17,54. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R250 por 12 h.

#### **4.13. Análise estatística**

Os tratamentos obtidos mediante os diversos processos (aquoso, extrusão e extrusão reativa) foram arrançados num delineamento inteiramente ao acaso. As médias das respostas (alcalóides totais, composição química, ISA, IAA, grau de digestibilidade, proteínas solúveis, aminoácidos aromáticos) foram analisadas estatisticamente ( $\alpha = 5\%$ ) por análise de variância (ANOVA) de uma via e as diferenças significativas entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 5.1. Energia mecânica específica (EME)

O controle dos parâmetros de operação, foi de grande relevância para a estabilidade da vazão mássica e o torque, com os quais a EME gerada durante a extrusão de cada ensaio foi calculada e apresenta-se na Tabela 8.

A EME avalia o grau de estresse mecânico aplicado à farinha em processo, e influencia na degradação de biopolímeros de alto peso molecular, como proteínas e fibras presentes no tremoço. Metabólitos secundários como compostos bioativos e alcalóides quinolizidínicos estão ligados à estas macromoléculas, as quais são cisalhadas mecanicamente durante o processo por extrusão. A combinação deste efeito com as demais variáveis de extrusão (temperatura e pressão da massa fundida, tempo de residência), podem modificar compostos bioativos (ROMERO RODRÍGUEZ et al., 2021; VARGAS-SOLÓRZANO et al., 2014) e possivelmente degradar alcalóides quinolizidínicos presentes no grão de tremoço.

A EME variou entre 49,33 a 192,70 kJ/kg. As variáveis de estudo ( $X_1$  e  $X_2$ ) impactaram na oscilação da EME obtida durante a extrusão. O aumento da umidade e do ácido cítrico diminuíram a EME gerada, a qual pode estar associada a degradação molecular causada pela adição do ácido cítrico, diminuindo a viscosidade da massa fundida, e fluidificando também com o aumento da adição de água. Vargas-Solórzano et al. (2014) observaram que determinados materiais extrudados em baixa umidade aumentaram a EME.

Além disso, a extrusão provoca modificação nas propriedades da fibra, em que Zhong et al. (2019) ao estudarem o comportamento das fibras de tremoço azul, verificaram que a extrusão aumentou a solubilidade da fibra associando a redução da fibra dietética insolúvel com a redução da EME.

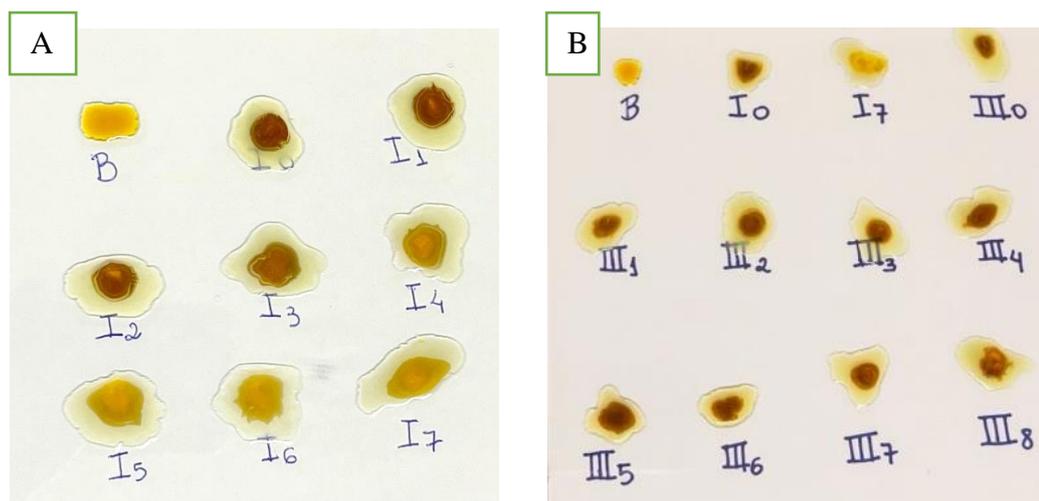
**Tabela 8.** Torque, vazão e energia mecânica específica (EME) obtidas através do processo por extrusão de tremoço branco.

Código Amostra	Ordem da Extrusão	$X_1$ (%)	$X_2$ (%)	Torque (N.m)	Vazão mássica (kg/h)	EME (kJ/kg)
III0	9°	8,29	-	10,433	3,063	192,696
III1	3°	15	1	3,657	2,420	85,650
III2	1°	25	1	3,415	2,950	65,446
III3	5°	15	3	3,365	2,563	74,267
III4	7°	25	3	2,902	3,053	53,775
III5	2°	20	2	2,602	2,983	49,328
III6	4°	20	2	2,900	3,042	53,900
III7	6°	20	2	3,651	3,079	67,090
III8	8°	20	2	3,286	3,051	60,974

$X_1$ : umidade de alimentação;  $X_2$ : inclusão de ácido cítrico;

## 5.2. Análise qualitativa por Wagner

Através do método colorimétrico por Wagner, observou-se visualmente diferentes colorações do reagente ao ser aplicado sobre as amostras do processo I e III, constatando alcalóides positivos para amostras avaliadas (Figura 6).



**Figura 6.** Análise qualitativa de alcalóides realizada nas amostras do processo aquoso (A) e dos processos por extrusão (B).

**Tabela 9.** Resultados da análise qualitativa de alcalóides do processo I e III pela intensidade da coloração ao aplicar o reagente de Wagner

Processo I		Processo III	
Amostras	Intensidade da Cor	Amostras	Intensidade da Cor
I0	++++	III0	++++
I1	++++	III1	++++
I2	++++	III2	++++
I3	+++	III3	++++
I4	++	III4	++++
I5	+	III5	++++
I6	+	III6	++++
I7	+	III7	++++
-	-	III8	++++

Intensidade da cor: marrom escuro (++++), marrom intermediário (+++), marrom claro (++) , amarelo turvo (+).

No processo I, as amostras apresentaram diferenças na pigmentação da reação indicadora de forma gradativa, reduzindo a reação conforme os avanços das etapas de lavagem, as quais estão demonstradas na Figura 6A e Tabela 9. As amostras I0, I1, I2 apresentaram alta reação, com a pigmentação intensa da coloração marrom escuro, indicando alto teor de alcalóides, enquanto a amostra I4 apresentou uma coloração mais branda (marrom claro), indicando teor de alcalóides reduzido em comparação as amostras antecedentes. As amostras I5, I6 e I7,

apresentaram uma leve coloração (amarelo turvo), quase não havendo reação entre a solução indicadora e as amostras, podendo ser relacionado a um baixo teor de alcalóides, ou até ausência dos mesmos.

Já no processo III, todas as amostras extrudadas apresentaram alta reação, manifestando coloração marrom escuro para todas as amostras avaliadas, indicando que as condições do processo por extrusão foram incapazes de reduzir o teor de alcalóides em tremoço branco, apresentando coloração semelhante a reação ocorrida no tremoço *in natura* (I0), conforme demonstrado na Figura 6B e Tabela 9.

De acordo com Cortés-Avendaño et al. (2020), o processo aquoso é um processo eficiente, capaz de reduzir elevados teores de alcalóides tóxicos para quantidades mínimas seguras permitidas ao consumo humano e animal ( $\leq 0,02$  g /100 g b.s).

Já Wilczura et al., (2018) relacionou o método colorimétrico por Wagner com a quantificação de alcalóides pela cromatografia, constatando que as sementes de tremoços branco apresentaram quatro tons diferentes (amarelo, amarelo escuro, marrom e marrom escuro) a reação de Wagner. Na qual a menor reação indicada pela coloração amarela, correspondeu em sua maioria a uma faixa de 0,01 – 0,07 g /100 g b.s. de alcalóides no grão, enquanto a reação mais forte foi associada a coloração marrom escuro, correspondendo de 1,02 – 1,77 g /100 g b.s.

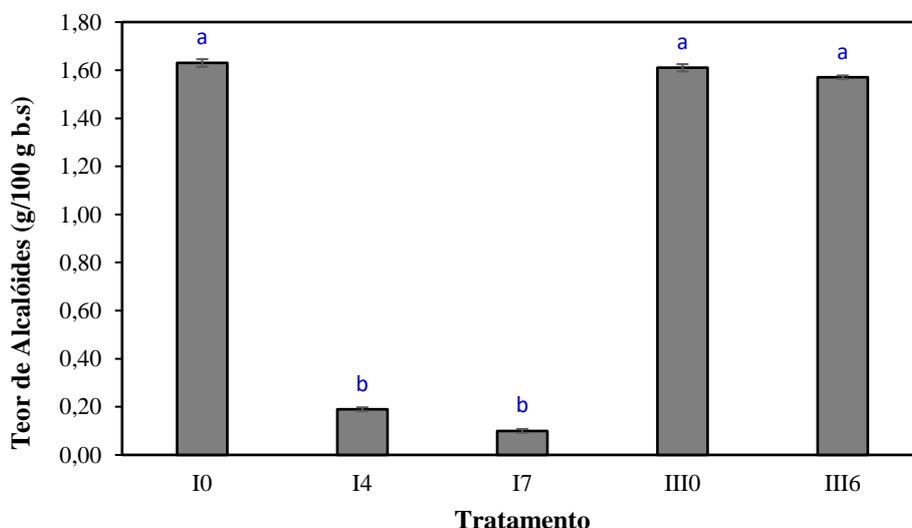
Assim, o método colorimétrico por Wagner não é um método que revela um baixo teor de alcalóides desejável e seguro para o consumo, mas através dele se pode selecionar as amostras que apresentaram maior diferença visual na coloração do reagente, indicando uma variação significativa no teor de alcalóides presentes.

As amostras I0, I4 e I7 foram as selecionadas do processo I, já no processo III, selecionou-se a amostra controle (III0) e uma amostra do ponto central (III6) para avaliarem o impacto do tratamento por extrusão em relação aos alcalóides presentes, uma vez que não foi identificado uma diferença visual de cor entre os tratamentos (III) realizados.

### **5.3. Quantificação de alcalóides por titulação colorimétrica**

O teor de alcalóides nas amostras selecionadas (item 5.2) foram apresentados na Figura 7. A amostra I7 apresentou menor conteúdo de alcalóides (0,1 g /100 g b.s) entre todas as outras avaliadas, diferindo-se estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) da I0, III0 e III6. Enquanto as amostras III0 e III6 mostraram que o tratamento por extrusão termoplástica e reativa foram incapazes de reduzir os alcalóides presentes no grão, não diferindo estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) da amostra *in natura* (I0: 1,63 g /100 g b.s).

Apesar da redução drástica observada pelo processo aquoso (I7), os teores quantificados ultrapassaram o limite máximo permitido para o consumo ( $\leq 0,02\%$ ), isso também pode estar associado a limitação do método de quantificação utilizado, que resulta em variações analíticas, e não identifica se os alcalóides que permaneceram na farinha são tóxicos ou não. Além disso, a quantificação dos alcalóides é tipicamente ignorada por muitos autores e consumidores, que se expõe ao risco de intoxicação, considerando de forma empírica (testes sensoriais) à suficiente remoção do alcalóides, através da presença ou ausência do sabor amargo no grão.



**Figura 7.** Teor de alcalóides totais em amostras de tremço branco *in natura* (I0), tratadas por processo aquoso (I4, I7), extrusão termoplástica (III0) e extrusão reativa (ácido cítrico 2%) (III6). Médias com letras sobrescritas diferentes, diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Outros autores ao aplicarem o tratamento aquoso e quantificarem os alcalóides por titulação, observaram uma redução (2,03%  $\rightarrow$  0,1%) de alcalóides em tremço branco (ESTIVI et al., 2022) e em tremço andino (3,5%  $\rightarrow$  0,3%) (VILLACRÉS; ÁLVAREZ; ROSELL, 2020). Por outro lado, a quantificação e identificação de alcalóides por cromatografia gasosa associada a um detector de massa, indicou reduções mais drásticas (de 6 – 4% para 0,003 – 0,001%) de alcalóides nas amostras desamargadas de tremço andino, apresentando conteúdos mínimos e seguros de Lupanina (0,0012%) e Esparteína (0,0014%), que são os alcalóides tóxicos majoritários do grão (CORTÉS-AVENDAÑO et al., 2020).

A eficiência do processo aquoso na redução dos alcalóides, deve-se à solubilização em água, degradação térmica e permeabilidade da parede celular, facilitando a extração dos alcalóides no grão (CORTÉS-AVENDAÑO et al., 2020; VILLACRÉS; ÁLVAREZ; ROSELL,

2020). Além disso, a diminuição dos alcalóides, depende da estrutura e composição do grão, bem como ao nível de processo que a semente é submetida. A cobertura das sementes de tremoço evita a difusão da água ao nível do hilo e da fissura hilar, que dão acesso direto para entrada de água no grão, bem como possuem substâncias hidrofóbicas como cera, polissacarídeos de lignina, fenóis, pectina, entre outros, que dificultam a permeabilidade da água sobre o grão (MIANO; GARCÍA; AUGUSTO, 2015). Esperava-se que a extrusão reativa se apresentasse de modo positivo à diminuição de alcalóides, uma vez que autores (CRISTIAN et al., 2010; ESTIVI et al., 2022a) ao avaliarem o ácido cítrico sobre o efeito da redução de amargor em sementes de *Lupinus*, constataram que os tratamentos utilizando o ácido cítrico possuíam efeitos mais forte de redução do que a água pura. Além disso, já foi observado que um leve excesso de íons de hidrogênio (pH 6,2) foi suficiente para hidrolisar a ligação C–N da  $\delta$ -lactama, convertendo parte da lupanina em ácido lupânico (ESTIVI et al., 2022a), cujo destino destes compostos não foram esclarecidos durante o processo ocorrido.

#### **5.4 Amostras selecionadas**

De acordo com os resultados obtidos (item 5.2 e 5.3), as amostras I0, I7, III0 e III6 foram selecionadas para serem avaliadas em relação a sua composição química, índices de absorção e solubilidade em água, digestibilidade e eletroforese de proteínas, proteínas solúveis, aminoácidos essenciais e análise estatística.

#### **5.5 Composição Química**

Os resultados das análises de composição química, estão apresentados na Tabela 10. Observou-se que os diferentes tratamentos provocaram diferentes alterações química na composição das farinhas de tremoço branco.

A amostra desamargada (I7) apresentou um aumento significativo nos teores de proteínas, fibras, e extrato etéreo em relação aos teores quantificados na amostra *in natura* (I0), fazendo-se acreditar que esse aumento é por concentração, uma vez que as lavagens sucessivas do processo aquoso eliminam moléculas hidrossolúveis como minerais, alcalóides, açúcares, flavonoides, entre outras, gerando uma lixiviação no grão, reduzindo o teor de cinzas e aumentando a concentração das proteínas, fibras e extrato etéreo avaliados. Efeitos semelhantes a estes foram observados em diferentes espécies de tremoços tratados por processos aquosos (CÓRDOVA - RAMOS et al., 2020; DUST et al., 2004; ERBAS, 2010).

**Tabela 10.** Composição química em farinhas de tremoços branco (*Lupinus albus*) por diferentes tratamentos.

Componentes (%)	Tratamentos			
	I0	I7	III0	III6
Proteínas	34,13 ± 0,13 <sup>b</sup>	39,29 ± 0,18 <sup>a</sup>	34,13 ± 0,60 <sup>b</sup>	33,56 ± 0,09 <sup>b</sup>
Cinzas	2,62 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,58 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,47 ± 0,07 <sup>a</sup>
Extrato etéreo	9,90 ± 0,00 <sup>b</sup>	12,77 ± 0,07 <sup>a</sup>	9,81 ± 0,09 <sup>b</sup>	9,48 ± 0,02 <sup>c</sup>
Fibra Alimentar	38,44 ± 0,01 <sup>b</sup>	46,91 ± 0,14 <sup>a</sup>	35,97 ± 0,02 <sup>c</sup>	9,47 ± 0,01 <sup>d</sup>
Fibra Solúvel	3,18 ± 0,00 <sup>c</sup>	4,13 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,43 ± 0,00 <sup>b</sup>	2,59 ± 0,00 <sup>d</sup>
Fibra Insolúvel	35,26 ± 0,00 <sup>b</sup>	42,79 ± 0,14 <sup>a</sup>	32,54 ± 0,00 <sup>c</sup>	6,88 ± 0,01 <sup>d</sup>
Carboidratos	14,91 ± 0,28 <sup>c</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>d</sup>	17,50 ± 0,65 <sup>b</sup>	45,01 ± 0,01 <sup>a</sup>

Tremoço branco *in natura* (I0), desamargado (I7), extrudado (III0), extrudado com adição de ácido cítrico 2% (III6). Expresso como média ± desvio padrão de duas repetições por tratamento. Os valores estão em base seca. Médias com letras sobrescritas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), comparando o efeito dos tratamentos sobre as propriedades química do tremoço.

Monteiro et al., 2014 ao avaliarem outros tipos de tremoços brancos relataram teores de proteína (36,30%), cinzas (2,84%) e extrato etéreo (8,37%) próximo aos teores quantificados neste estudo. Em que ambos são condizentes com Prusinski (2017) ao afirmar que o teor médio de proteína em sementes de tremoço branco varia de 32,9% até aproximadamente 38% , e o extrato etéreo varia de 8% a 11,5%.

Os teores de fibra alimentar total (FDT), solúvel (FDS) e insolúvel (FDI), variaram bastante entre as amostras. As amostras I0 e III0, se apresentaram mais próximas, mostrando que o tratamento por extrusão na amostra III0 reduziu 2,72% de FDI, e aumentou 0,25% de FDS. Enquanto o tratamento por extrusão com adição de ácido cítrico (III6) apresentou uma redução drástica de 28,38% (35,26 → 6,88%) na FDI, e 0,59% (3,18 → 2,59%) na FDS. Explica-se pelo fato que a extrusão pode modificar significativamente a estrutura molecular das fibras, aumentando sua solubilização através do rompimento de ligações provocados pela fricção do cisalhamento e da temperatura de aquecimento.

A redistribuição de FDI para FDS, tem sido observada com frequência nos tratamentos realizados por extrusão, a exemplo disso foi observado nos estudos avaliados em tremoço azul (ZHONG et al., 2019), sementes de soja (DUST et al., 2004), farelos de trigo (YAN; YE; CHEN, 2015), cascas de sementes de ervilha e resíduos de soja (CHEN et al., 2014; JING; CHI, 2013).

De acordo com Menis-Henrique et al., (2020), o processo de extrusão pode provocar modificações na estrutura macromolecular da fibra, acarretando mudanças no teor total das FDS e FDI, de modo que a combinação do cisalhamento, alta pressão e temperaturas da extrusão

podem quebrar as macromoléculas de cadeias longas, formando moléculas menores e mais solúveis. Além disso, o rompimento da macromolécula pode transformar as fibras em fibra solúvel de baixo peso molecular, não recuperada pela precipitação do álcool, bem como transformar os amidos resistentes considerados como fibra, em amidos digeríveis (ROBIN; SCHUCHMANN; PALZER, 2012).

A adição do ácido cítrico e o teor de umidade foi o que diferenciou os processos de III0 (umidade 8,29%, sem acidificação) e III6 (umidade 20%, ácido cítrico 2%). A modificação drástica do teor de fibras pode ser atribuída ao feito combinado de umidade e ácido cítrico. É provável que neste cenário reativo, as fibras que se encontraram complexadas com proteínas, lipídeos e carboidratos, foram hidrolisadas de forma a não serem mais quantificadas como fibras, adquirindo menor peso molecular e aumentando por diferença os teores de carboidratos na III6, que se diferiram ( $p \leq 0,05$ ) dos teores de carboidratos e fibras da III0.

Efeitos da extrusão reativa sobre a estrutura da fibra alimentar de leguminosas ainda são limitados, mas ao hidrolisar e avaliar as propriedades da fibra alimentar de torta de coco desengordurada e tratada com 0,1% de ácido sulfúrico (60°C por 30 min), observou-se que o tratamento ácido levou a redução de 17,17% de FDS e 14,49% de FDI (ZHENG; LI, 2018). Enquanto a fibra de milho após ser hidrolisada com 0,5% de ácido sulfúrico (120°C), apresentou uma tendência crescente na formação de açúcares monoméricos, reduzindo os teores de fibras e aumentando à concentração de carboidratos (5,4 – 57,2%) (NOUREDDINI; BYUN, 2010).

Por outro lado, o processo aquoso mostrou-se diferente em relação ao conteúdo de carboidratos aumentados nas amostras III0 e III6, apresentando zero teor de carboidratos na amostra I7. As concentrações de carboidratos nas amostras desamargadas (I7) podem estar associadas as moléculas hidrossolúveis que foram lixiviadas, reduzindo-se ao ponto de se anular, uma vez que os teores de carboidratos são obtidos pela diferença dos demais componentes, que consequentemente aumentaram seus teores em relação a amostra I0. Também foi observado que a amostra I0 apresentou 14,91% de carboidratos, valor exato a diferença excedente (14,91%) entre os demais compostos avaliados (proteínas, fibras, extrato etéreo e cinzas) das amostras I0 e I7. Resultados semelhantes foram observados em outros tipos de tremoço (CÓRDOVA-RAMOS et al., 2020; ERBAS, 2010). Também relataram que o processo aquoso foi capaz de remover completamente todos os açúcares que poderiam estar envolvidos em reações de degradação, como Maillard (CÓRDOVA-RAMOS et al., 2020).

Apesar dos diversos efeitos observados pelos tratamentos aplicados, à composição proteica em todas as amostras variaram acima de 33%, sendo superior aos teores proteicos de

fava (MATTILA et al., 2018), ervilha (QI et al., 2021), grão de bico e feijão (FARIDY et al., 2020), assemelhando o da amostra LV com os teores proteicos de soja (DAY; CAKEBREAD; LOVEDAY, 2022; FARIDY et al., 2020). Os teores de FDT com exceção da amostra por REX se apresentaram superiores aos teores relatados para soja (REDONDO-CUENCA et al., 2007), com as frações de FDS e FDI superiores aos encontrados em fava (MATTILA et al., 2018).

### **5.5. Índice de absorção (IAA) e solubilidade (ISA) em água**

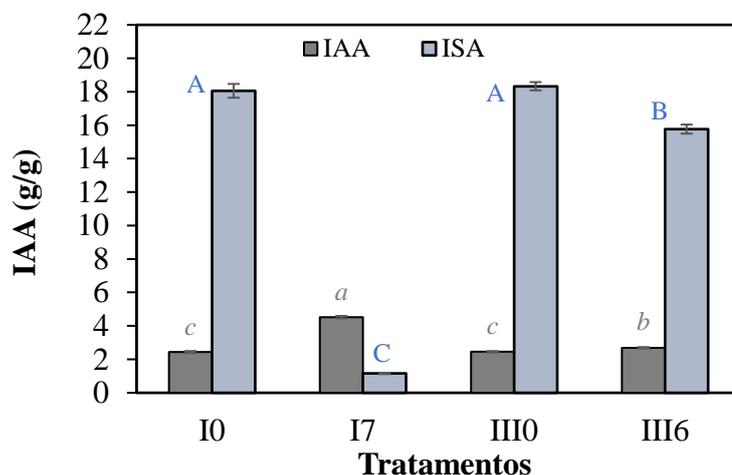
As propriedades de hidratação desempenham um papel importante nas interações proteína-água e carboidrato-água. As principais propriedades funcionais tecnológicas dos extrudados quando dispersos em excesso de água, são a absorção de água e a solubilidade em água. O índice de absorção em água (IAA) é uma medida do grau de modificação do amido, desnaturação das proteínas e formação de complexos macromoleculares (DALBHAGAT; MISHRA, 2019). O índice de solubilidade em água (ISA) reflete a quantidade de moléculas solúveis liberadas das estruturas granulares em excesso de água (ALAM et al., 2019; DALBHAGAT; MISHRA, 2019).

Como pode ser observado na Figura 8, a amostra I7 apresentou o maior IAA e o menor ISA entre as amostras avaliadas. Como dito anteriormente, durante as etapas do processo aquoso muitas moléculas hidrossolúveis são perdidas nas lavagens, que por consequência gerou um ISA tão baixo, na qual a lixiviação eliminou quase todos os componentes solúveis do grão.

O IAA está associado ao maior número de grupos hidrofílicos presentes nas proteínas, fibras solúveis e carboidratos. I7 apresentou altos teores de proteína e fibra solúvel, que correlaciona com alto IAA.

Os níveis de absorção e solubilidade em água não apresentaram diferenças significativas entre as amostras I0 e III0. Isto possivelmente ocorreu pelo efeito lubrificante dos lipídeos presentes na farinha de tremoço. Teores de lipídeos acima de 5% nos materiais de alimentação a serem extrudados ajudam escorregar as partículas e baixam a viscosidade do material fundido no extrusor. Em consequência, pouca ou nenhuma mudança possa ter acontecido nos grupos funcionais hidrofílicos dos biopolímeros. Já as amostras extrudadas (III0 e III6) diferiram significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ). A diferença pode estar associada ao maior teor de carboidratos em III6 (derivados de ácido cítrico com grupos carboxílicos ativos) que se correlaciona com alto IAA. Em adição, o processo de extrusão reativa possivelmente promoveu reações de esterificação dos açúcares, aminoácidos livres e outras substâncias de baixo peso molecular, tornando-as insolúveis em água, o que se correlaciona com baixo ISA. Foi reportado

que o ácido cítrico pode provocar reação de esterificação com os grupos hidroxila presentes nos polímeros do amido, tornando o mesmo em amido resistente menos solúvel em água (YE et al., 2019).



**Figura 8.** Índice de absorção de água (IAA) e Índice de solubilidade em água (ISA) em amostras de tremço branco *in natura* (I0), desamargado (I7), extrudado (III0), extrudado com adição de ácido (III6).

De acordo com estudos realizados por DU et al. (2014) em diversos tipos de leguminosas (lentilha, grão de bico e 9 tipos de feijão), o IAA variou de 4,09 g/g a 6,13 g/g, sendo o maior valor obtido na farinha de grão de bico e o menor valor na farinha de feijão-fradinho. O ISA variou de 19,44 g/100 a 29,14 g/100 g, sendo o maior valor obtido na farinha de feijão-fava e o menor valor na farinha de feijão pinto.

É importante considerar que os valores de IAA e ISA vão depender da composição química de cada amostra, bem como o nível de processo que ela será submetida. O processo de extrusão pode afetar a conformação das proteínas, de modo que o calor provoca a desnaturação e agregação das mesmas, e o cisalhamento mecânico causa a dissociação e a despolimerização das proteínas (GALDEANO, 2022; SOLÓRZANO, 2013). Estas transformações podem diminuir ou aumentar a absorção de água, através do grau de modificação na superfície proteica e da disponibilidade de grupos polares. Proteínas de estrutura muito compacta podem ser desassociadas, tendo sua superfície modificada, tornando ativas as ligações peptídicas e as cadeias laterais polares, melhorando suas propriedades de hidratação.

Portanto o IAA está relacionado com a hidrofiliabilidade e a capacidade de gelificação das moléculas de amido e proteínas, expressando a quantidade máxima de água absorvível após

serem imergidas em água, não dependendo exclusivamente do inchamento de amidos (ALAM et al., 2019; DU et al., 2014).

Já o ISA demonstra o nível de moléculas disponíveis de baixo peso molecular que podem ser facilmente lixiviadas por tratamentos aquosos (DALBHAGAT; MISHRA, 2019), e é comumente relacionado a degradação molecular (ALAM et al., 2019). Pode ser afetado pelos complexos formados de amilose-lipídio e proteína-amido em processo de aquecimento, ligando o que poderia estar disponível e diminuindo o que seria solubilizado (DU et al., 2014).

### **5.6. Digestibilidade de proteínas *in vitro***

A digestibilidade *in vitro* de proteínas é capaz de estimar a digestibilidade de proteínas no trato gastrointestinal humano, através da ação de enzimas proteolíticas que degradam alimentos, e da simulação das condições fisiológicas humanas (BOHN et al., 2018; HUR et al., 2011).

Os Protocolos de digestão *in vitro* são tão eficazes quanto aos modelos *in vivos*, e apresentam vantagens em relação aos *in vivos*, uma vez que são altamente reprodutivos, de fácil amostragem, com menor custo e maior agilidade, além de terem maior aplicabilidade sem a necessidade de avaliações éticas (BOHN et al., 2018; PIRES et al., 2006; SANTOS-HERNÁNDEZ et al., 2020).

A digestibilidade de proteínas vegetais normalmente é menor que a digestibilidade de proteínas animais, relacionando-se ao fato da presença de fibras estruturais e de compostos antinutricionais presentes nos vegetais que dificultam a digestão. Entretanto, procedimentos tecnológicos tem sido associados aos tratamentos de amostras vegetais, aumentando a sua digestibilidade, e obtendo produtos com elevado teor proteico e alta qualidade nutricional (SANTOS-HERNÁNDEZ et al., 2020; TOMÉ, 2013).

As amostras de tremoço branco apresentaram boa digestibilidade em geral (Tabela 11). O tratamento aquoso e por extrusão aplicados nas amostras I7 e III0 não diferiram estatisticamente entre si. Já a amostra III6 apresentou 79,21% de digestibilidade, diferindo significativamente de todas as amostras avaliadas, indicando digestibilidade negativa quando comparada a I0.

**Tabela 11.** Grau de digestibilidade *in vitro* de proteínas em tremoço branco *in natura* (I0), desamargado (I7), extrudado (III0), extrudado com adição de ácido cítrico (III6).

Tratamento	I0	I7	III0	III6
Digestibilidade (%)	90,53 ± 2,24 <sup>b</sup>	96,62 ± 1,41 <sup>a</sup>	93,31 ± 0,60 <sup>ab</sup>	79,21 ± 1,26 <sup>c</sup>

Expresso como média ± desvio padrão de três repetições por tratamento. Médias com letras sobrescritas diferentes, diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Os tratamentos de cocção, imersão e lavagens do processo aquoso, favoreceram a melhora da digestibilidade de proteínas encontrada na amostra I7. Como já relatado, o processo aquoso provoca uma lixiviação no grão, reduzindo os compostos antinutricionais, e aumentando a concentração de proteínas no grão deixando-as mais livres e de fácil digestão. Outras espécies de tremoço e leguminosas, obtiveram sua digestibilidade de proteínas melhorada após realizarem etapas de imersão e cocção, associando o tratamento a redução de ácido fítico, alcalóides,  $\alpha$ -amilase, taninos, inibidores de tripsina, entre outros que poderiam se complexar a proteína, dificultando sua digestão (EL-HADY e HABIBA, 2003; MOHAMMED et al., 2017).

Já a extrusão reativa, adicionado de ácido cítrico (III6) provocou uma diminuição na digestibilidade de proteínas. Essa combinação é responsável por modificar as moléculas de proteína, na qual o ácido cítrico pode provocar sua insolubilidade, desnaturação proteica e inativar ações enzimáticas (QUIROGA, 2014; XIA et al., 2016; YE et al., 2019). Enquanto processo por extrusão é conhecido por melhorar a qualidade nutricional das proteínas, através da redução ou inativação de compostos antinutricionais, eliminando oligossacarídeos indesejáveis, entre outros efeitos positivos associados aos materiais vegetais extrudados (GALDEANO, 2022; NIKMARAM et al., 2017; QI et al., 2021).

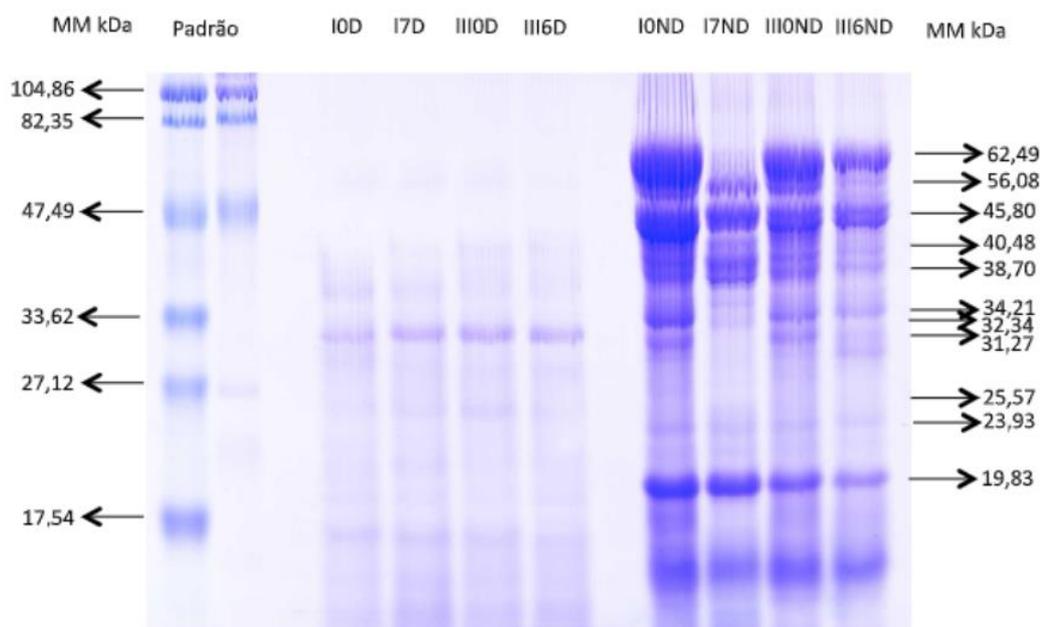
Córdova-Ramos et al. (2020) verificou a digestibilidade de proteínas em farinha de tremoço andino, na qual a farinha desamargada (processo aquoso) apresentou 63,7% de digestibilidade, e ao extrudarem a amostra já desamargada observaram um aumento de 4,4% na digestão proteica. Já Palanisamy et al. (2019) ao extrudarem uma mistura de concentrado e isolado de tremoço (50:50), apresentaram 80,9-85,9% de digestibilidade de proteínas, enquanto a mistura da matéria prima (crua) possuía 78,2% de digestibilidade proteica. Também foi observado que tremoços germinados possuíam maior digestibilidade proteica (87,4%) que os não germinados (85,89%) (VILLACRÉS et al., 2015).

Além disso, outros tipos de tremoço branco apresentaram digestibilidade proteica (90,89%) semelhante a amostra *in natura*, na qual os autores enfatizaram que a digestibilidade de tremoço branco é maior que de leguminosas como a soja (71,76%) e o feijão (83%), e semelhante a de cereais, como arroz (92,12%) e aveia (87,84%) (MONTEIRO et al., 2014).

### 5.6.1. Eletroforese de proteínas digeridas e não digeridas

Uma maneira de verificar o comportamento das proteínas após a digestão *in vitro* é comparar por SDS-PAGE as frações proteicas das amostras digeridas e não digeridas. A Figura 9 ilustra o comportamento das frações, confirmando a degradação proteica realizada pelas enzimas digestivas, de modo que a maioria das bandas (62,49 – 19,83 kDa) de proteínas não foram identificadas nas amostras digeridas.

Autores afirmam (ARNOLDI et al., 2015; MANE et al., 2018) que as proteínas do tremoço branco são compostas por 90% de globulinas e 10% de albumina. As frações mais abundantes são as  $\alpha$ - (leguminas ou globulina 11S) e  $\beta$ - (vicilinas ou globulina ácida 7S) conglutinas, enquanto a  $\gamma$ - (globulina 7S básica) e  $\delta$ - (albumina rica em enxofre 2S) conglutina se apresentam em menores quantidades (FOLEY et al., 2015; GUZMÁN et al., 2021).



**Figura 9.** Eletroforese SDS-PAGE de tremoço branco *in natura* (I0), desamargado (I7), extrudado (III0), extrudado com adição de ácido cítrico 2% (III6), digeridos (D) e não digeridos (ND).

Todos os tratamentos digeridos (I0D, I7D, III0D, III6D) apresentaram uma banda de proteína de aproximadamente 32 kDa, que de acordo com a literatura corresponde a  $\gamma$ -conglutina (BURGOS-DÍAZ et al., 2016). Este comportamento já foi observado por outros autores, os quais indicaram que ela não é uma proteína de armazenamento como as outras, apresentando comportamento incomum em relação as demais conglutinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ ) ao serem testadas por várias enzimas proteolíticas em digestão *in vitro*, e também na germinação (ARNOLDI et al., 2015;

DURANTI et al., 2008; FOLEY et al., 2015). Dado que esta proteína mantém sua atividade proteica nativa, acredita-se que a fração  $\gamma$  encontra-se na zona central dos glóbulos proteicos de conglutina, tornando-se mais difícil de ser digerida.

Outros estudos indicaram que  $\gamma$ -conglutina encontrada no tremoço é benéfica à saúde, por reduzir níveis de glicose, possuindo efeitos semelhantes à insulina no corpo humano, evitando picos glicêmicos e tratando doenças como o diabetes (ARNOLDI et al., 2015; GUZMÁN et al., 2021; SANDOVAL-MUÑÍZ et al., 2018).

As bandas proteicas identificadas nas amostras não digeridas, correspondem as conglutinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . De acordo com Burgos-Díaz et al. (2016), as frações de  $\beta$ -conglutina se concentram aproximadamente entre 63,57 – 45,95 kDa, já as  $\alpha$ -conglutinas estão mais distribuídas entre 55,4 – 36,5 kDa, possuindo também uma banda de menor concentração em torno de 17,7 kDa.

As  $\delta$ -conglutinas são frações de menor peso molecular, as quais são mais difíceis de serem identificadas em concentrações de SDS-PAGE menor que 15% (BURGOS-DÍAZ et al., 2016). Além disso, a sua identificação depende do estágio de maturação do grão, sendo mais acentuadas após completa maturidade do grão (FOLEY et al., 2015). Burgos-Díaz et al. (2016) ao tentar identificar esta fração, aplicaram a proteína isolada do tremoço em SDS-PAGE a 15%, identificando uma banda proteica em torno 13 kDa, associando a soma das subunidades da  $\delta$ -conglutina, baseando na sequência de seus aminoácidos (13,5kDa).

Santos-Hernández et al. (2020) ao aplicarem o mesmo protocolo de digestão *in vitro* (Infogest) utilizado neste estudo, e avaliarem o perfil proteico de isolados de lentilha, ervilha e ervilha de jardim por SDS-PAGE, identificaram  $\alpha$  e  $\beta$  conglutina em ambas leguminas, se assemelhando na fase intestinal com a degradação proteica observada na digestão dos tremoços.

### **5.6.1. Proteínas solúveis (PS) e Aminoácidos aromáticos (AA)**

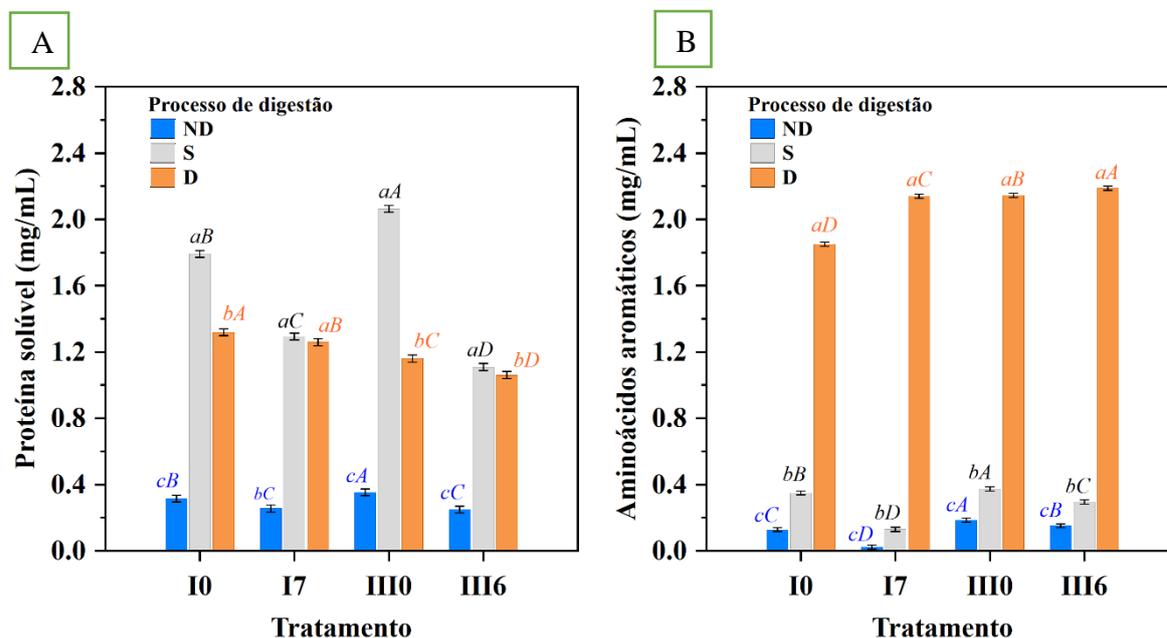
Com interesse de avaliar o comportamento das proteínas ao longo da digestão, foi realizado análises de proteínas solúveis e de aminoácidos aromáticos nas amostras digerida (D, item 4.11), não digeridas (ND, item 4.11) e simuladas (S, item 4.11.2).

Os teores de proteínas solúveis (PS, Figura 10A) e aminoácidos aromáticos (AA, Figura 10B) foram baixos nas amostras ND (< 0.5 mg/mL), estando de acordo com a natureza hidrofóbica das estruturas proteicas de leguminosas, e a baixa quantidade de aminoácidos livres nos grãos integrais. O comportamento hidrofóbico auxilia a estabilidade de proteínas em sua forma nativa, inviabilizando sua solubilidade e formando complexos agregados de proteínas. O

processo por III0–ND gerou maior teores de PS e AA em relação aos tratamentos aplicados nas amostras ND. Sabe-se que a extrusão por meio do cisalhamento e da temperatura de aquecimento, provoca modificações nas estruturas proteicas, rompendo estruturas intactas que pode ter favorecido a solubilização das proteínas e disponibilizado peptídeos e aminoácidos para digestão. Resultados semelhantes foram observados em amostras extrudadas de ervilha (QI et al., 2021), solubilizando proteínas e disponibilizando peptídeos e aminoácidos para digestão

Os processos I7-ND e III6-ND apresentaram teores similares de PS ( $P \leq 0,05$ ), enquanto os aminoácidos livres da amostra I7-ND foram quase tudo eliminado no decorrer do processo aquoso, sendo lixiviado o baixo teor de AA presentes na amostra I0 – ND ( $P \leq 0,05$ ).

Para o caso das amostras S (digestão simulada sem adição de enzimas), foi observado que simulação com os fluidos gástricos aumentou a solubilidade das proteínas, na qual o teor de PS variou entre 1 a 1,5 mg/mL, sendo maior para amostra I0-S e menor para III6-S, confirmando que a combinação do ácido cítrico com a extrusão provocou de fato uma insolubilização de proteínas. O teor de AA nas amostras S foi ainda baixo ( $< 0,05$  mg/mL), sendo maior para III0-S e menor para I7-S.



**Figura 10.** (A) Proteínas solúveis e (B) Aminoácidos aromáticos, em amostras de tremço digerido (D), não digerido (ND) e simulado com fluidos gastrointestinais (S). Médias com letras minúsculas diferentes dentro de um tratamento, ou médias com letras maiúsculas diferentes dentro de um tipo de processo digestivo, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

A adição de enzimas digestivas no processo de digestão (D) reduziu os teores de PS quando comparados com as amostras S, na qual a I7 foi a única que não diferiu significativamente ( $P \leq 0,05$ ). Por outro lado, ao adicionar as enzimas digestivas os teores de AA aumentaram para

todas as amostras D, comparando com os processos ND ou S, mostrando que os tratamentos realizados (aquoso, extrusão, REX), viabilizaram uma maior liberação de AA (de 2 a 2,5 mg/mL) na digestão (D), indicando alta bioacessibilidade à digestão *in vitro* das proteínas de tremçoço branco.

As proteínas vegetais em sua maioria são insolúveis, por possuírem estruturas tridimensionais bem definidas, que gera compactação das proteínas sobre o efeito hidrofóbico das mesmas (DAY; CAKEBREAD; LOVEDAY, 2022; QI et al., 2021). O processo da simulação (S) facilitou a compreensão de como ocorre a digestão das proteínas vegetais, uma vez que a princípio elas estão bastante complexadas, mas em contato com fluidos gastrointestinais suas estruturas se abrem, aumentando a afinidade das proteínas pela água, tornando-as mais susceptíveis e acessíveis a digestão enzimática. Quando se adiciona enzimas digestivas, as proteínas são hidrolisadas em peptídeos e aminoácidos individuais, ficando bioacessíveis para serem absorvidos (DAY; CAKEBREAD; LOVEDAY, 2022).

## 6 CONCLUSÃO

A análise qualitativa avaliada com o reagente Wagner permitiu selecionar de maneira rápida e eficiente os tratamentos que sofreram maior impacto sobre os conteúdos de alcalóides presentes. A farinha produzida pelo processo aquoso apresentou propriedades nutricionais mais atrativas, com altos teores de proteína, extrato etéreo e fibras, baixos teores de alcalóides, alta digestibilidade proteica e sem predominância de carboidratos digeríveis. A extrusão termoplástica apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação a composição química dos grãos amargos, para os teores de fibras e carboidratos. Enquanto a extrusão reativa, se apresentou negativa em relação a todas as amostras avaliadas, diminuindo a digestibilidade proteica e os teores de fibras, com aumento elevado nos teores de carboidratos. Os alcalóides nas amostras extrudadas com ou sem adição de ácido cítrico (2%), não apresentaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) aos teores encontrados nas amostras amargas, sugerindo-se à quantificação por tecnologias de cromatografia acoplada a um detector de massa, que possa identificar e quantificar alcalóides presentes em amostras extrudadas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL-HADY, E. .; HABIBA, R. . Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 3, p. 285–293, 1 maio 2003.
- ABURTO, J. et al. Synthesis, characterization, and biodegradability of fatty-acid esters of amylose and starch. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 74, n. 6, p. 1440–1451, 7 nov. 1999.
- AFONSO, J. P. M. **Recuperação de proteínas e alcaloides dos meios de adoçamento de *Lupinus albus***. [s.l.] Universidade Nova de Lisboa, 2020.
- AGUILAR-ACOSTA, L. et al. Effect of Ultrasound Application on Protein Yield and Fate of Alkaloids during Lupin Alkaline Extraction Process. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 292, 13 fev. 2020.
- ALAM, M. R. et al. Effect of hot melt extrusion on physical and functional properties of insect based extruded products. **Journal of Food Engineering**, v. 259, p. 44–51, 1 out. 2019.
- ALAM, M. S. et al. Extrusion and Extruded Products: Changes in Quality Attributes as Affected by Extrusion Process Parameters: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 3, p. 445–473, 17 fev. 2016.
- AOAC. **Official Methods of Analysis(18th ed.)**. Gaithersburg: AOAC International., 2010.
- ARNOLDI, A. et al. The health benefits of sweet lupin seed flours and isolated proteins. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 550–563, out. 2015.
- ARORA, B. et al. Reactive extrusion: A review of the physicochemical changes in food systems. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 64, n. June, p. 102429, ago. 2020.
- ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. **Apostila do curso anual em processo de extrusão de alimentos: aspectos tecnológicos para o desenvolvimento e produção de alimentos para consumo humano e animal**. Ed., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, out, 2022.
- ASCHERI, J. LUIS R. **Perguntas e respostas sobre Extrusão Termoplástica de alimentos**. Uma abordagem simplificada. Ed. Atena, Ponta Grossa-PR, (e-book), 2022. <https://doi.org/10.22533/at.ed.240221301>.
- AUSTRALIAN GOVERNMENT. The biology of *Lupinus L.* (lupin or lupine). Abril, p. 66, 2013.
- BARTKIENE, E. et al. Influence of the addition of lupin sourdough with different lactobacilli on dough properties and bread quality. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 12, p. 2613–2620, 2013.
- BERRIOS, J. D. J.; ASCHERI, J. L. R.; LOSSO, J. N. Extrusion Processing of Dry Beans and Pulses. In: **Dry Beans and Pulses Production, Processing and Nutrition**. Wiley, 2012. p. 185–203.
- BOHN, T. et al. Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 13, p. 2239–2261, 2 set. 2018.

- BOSCHIN, G. et al. The fatty acid composition of the oil from *Lupinus albus* cv. Luxe as affected by environmental and agricultural factors. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 5–6, p. 769–776, 31 jul. 2007.
- BOSCHIN, G.; RESTA, D. **Natural Products**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- BOUKID, F.; PASQUALONE, A. Lupine (*Lupinus* spp.) proteins: characteristics, safety and food applications. **European Food Research and Technology**, v. 248, n. 2, p. 345–356, 13 fev. 2022.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRODKORB, A. et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 18 abr. 2019.
- BURGOS-DÍAZ, C. et al. Emulsifying and Foaming Properties of Different Protein Fractions Obtained from a Novel Lupin Variety Alu Prot -CGNA ® ( *Lupinus luteus* ). **Journal of Food Science**, v. 81, n. 7, p. C1699–C1706, jul. 2016.
- CAETANO, G. P. **Convivência de tremoço com corda-de-viola e mucuna- preta**. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, 2021.
- CARVAJAL-LARENAS, F. E. et al. *Lupinus mutabilis* : Composition, Uses, Toxicology, and Debittering. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 9, p. 1454–1487, 3 jul. 2016.
- CASTILHO, F.; FONTANARI, G. G.; BATISTUTI, J. P. Avaliação de algumas propriedades funcionais das farinhas de tremoço doce (*Lupinus albus*) e feijão guandu (*Cajanus cajan* (L) Millsp) e sua utilização na produção de fiambre. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 68–75, 26 fev. 2010.
- CHEN, Y. et al. Novel blasting extrusion processing improved the physicochemical properties of soluble dietary fiber from soybean residue and in vivo evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 120, n. 1, p. 1–8, 1 jan. 2014.
- CHI, H. et al. Effect of acetylation on the properties of corn starch. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 923–928, fev. 2008.
- CÓRDOVA-RAMOS, J. S. et al. Andean lupin ( *Lupinus mutabilis* Sweet): Processing effects on chemical composition, heat damage, and in vitro protein digestibility. **Cereal Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 827–835, 17 jul. 2020.
- CORTÉS-AVENDAÑO, P. et al. Profile and Content of Residual Alkaloids in Ten Ecotypes of *Lupinus mutabilis* Sweet after Aqueous Debittering Process. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 75, n. 2, p. 184–191, 3 jun. 2020.
- CREMONEZ, P. A. et al. Tremoço : Manejo e Aplicações. **Acta Iguazu**, n. January, p. 98–108, 2013.
- CRISTIAN, J.-M. et al. Effect of Aqueous, Acid, and Alkaline Thermal Treatments on Antinutritional Factors Content and Protein Quality in *Lupinus campestris* Seed Flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1741–1745, 10 fev. 2010.

- CURIEL, J. A. et al. Exploitation of the nutritional and functional characteristics of traditional Italian legumes: The potential of sourdough fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 196, p. 51–61, 2015.
- DALBHAGAT, C. G.; MISHRA, H. N. Effects of extrusion process conditions on system parameters; physicochemical properties and cooking characteristics of extruded fortified rice kernels. **Journal of Cereal Science**, v. 89, p. 102782, 1 set. 2019.
- DAY, L.; CAKEBREAD, J. A.; LOVEDAY, S. M. Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 428–442, 1 jan. 2022.
- DU, S. et al. Physicochemical and functional properties of whole legume flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 308–313, 1 jan. 2014.
- DURANTI, M. et al. The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 12, p. 624–633, dez. 2008.
- DUST, J. M. et al. Extrusion Conditions Affect Chemical Composition and in Vitro Digestion of Select Food Ingredients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2989–2996, 1 maio 2004.
- E. VILLACRÉS , V. ALLAUCA , E. PERALTA , G. INSUASTI , J. ÁLVAREZ, M. Q. Germination, an Effective Process to Increase the Nutritional Value and Reduce Non-Nutritive Factors of Lupine Grain (*Lupinus mutabilis* Sweet). **International Journal of Food Science and Nutrition Engineering**, v. 5, n. 4, p. 163–168, 2015.
- ERBAS, M. The Effects Of Different Debittering Methods On The Production Of Lupin Bean Snack From Bitter *Lupinus albus* L. Seeds. **Journal of Food Quality**, v. 33, n. 6, p. 742–757, dez. 2010.
- ERBAŞ, M.; CERTEL, M.; USLU, M. K. Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). **Food Chemistry**, v. 89, n. 3, p. 341–345, 1 fev. 2005.
- ESTIVI, L. et al. Alkaloid content and taste profile assessed by electronic tongue of *Lupinus albus* seeds debittered by different methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 114, n. July, p. 104810, dez. 2022a.
- ESTIVI, L. et al. Alkaloid content and taste profile assessed by electronic tongue of *Lupinus albus* seeds debittered by different methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 114, p. 104810, 1 dez. 2022b.
- FAN, J.; MITCHELL, J. R.; BLANSHARD, J. M. V. The effect of sugars on the extrusion of maize grits: I. The role of the glass transition in determining product density and shape. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 55–65, fev. 1996.
- FAO. Food and Agriculture Organization US Food and Drug Administration. 2020.
- FARIDY, J.-C. M. et al. Biological Activities of Chickpea in Human Health (*Cicer arietinum* L.). A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 75, n. 2, p. 142–153, 1 jun. 2020.
- FOLEY, R. C. et al. Analysis of conglutin seed storage proteins across lupin species using transcriptomic, protein and comparative genomic approaches. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 106, 19 dez. 2015.

- FRICK, K. M. et al. Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis in Lupins and Prospects for Grain Quality Improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. JANUARY, p. 1–12, 31 jan. 2017.
- FRITSCH, C.; VOGEL, R. F.; TOELSTED, S. Fermentation performance of lactic acid bacteria in different lupin substrates-influence and degradation ability of antinutritives and secondary plant metabolites. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 4, p. 1075–1088, out. 2015.
- GALDEANO, M. C. **Tecnologias de Texturização de Proteínas Vegetais**. Disponível em: <[https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1141928/tecnologias-de-texturizacao-de-proteinas-vegetais#:~:text=Autoria%3AGALDEANO%2CM.C.,produtos convencionais de origem animal.>](https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1141928/tecnologias-de-texturizacao-de-proteinas-vegetais#:~:text=Autoria%3AGALDEANO%2CM.C.,produtos%20convencionais%20de%20origem%20animal.>).
- GARCIA, P. S. et al. Improving action of citric acid as compatibiliser in starch/polyester blown films. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 305–312, jan. 2014.
- GHOSHAL, G.; BASU, S.; SHIVHARE, U. S. Solid state fermentation in food processing. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, n. 3, 2012.
- GLADSTONES, J. S. Lupin as a crop plants. **Field Crop**, v.23, p. 123-148, 1970.
- GOODWIN, T. W.; MORTON, R. A. The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. **Biochemical Journal**, v. 40, n. 5–6, p. 628–632, 1 jan. 1946.
- GULISANO, A. et al. Genetics and Breeding of *Lupinus mutabilis*: An Emerging Protein Crop. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. October, p. 1–13, 2019.
- GUTIÉRREZ, T. J.; PAULA GUARÁS, M.; ALVAREZ, V. A. **Biopackaging**. CRC Press, 2017.
- GUY, R. Extrusion cooking: Technologies and application. **Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.**, 2002.
- GUZMÁN, T. J. et al. Effect of the acute and chronic administration of *Lupinus albus*  $\beta$ -conglutinin on glycaemia, circulating cholesterol, and genes potentially involved. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, n. November 2020, p. 110969, jan. 2021.
- HAMA, J. R. et al. Indole and quinolizidine alkaloids from blue lupin leach to agricultural drainage water. **Science of The Total Environment**, v. 834, n. April, p. 155283, ago. 2022.
- HUR, S. J. et al. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1–12, 1 mar. 2011.
- HUYGHE, C. Field Crops Research White lupin (*Lupinus albus* L.). **Field Crops Research**, v. 53, p. 147–160, 1997.
- INEN. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 390: 2004. Leguminosas. Grano desamargado de chocho. Requisitos. **Leguminosas. Grano desamargado de chocho. Requisitos. Quinto, Ecuador**, p. 1–12, 2005.
- JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C. et al. Microstructural changes in *Lupinus campestris* seed in response to three thermal debittering treatments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 14, p. 2399–2404, 2009.
- JING, Y.; CHI, Y.-J. Effects of twin-screw extrusion on soluble dietary fibre and physicochemical properties of soybean residue. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 884–889, 1 jun. 2013.

KARAMAĆ, M. et al. Phenolic contents and antioxidant capacities of wild and cultivated white lupin (*Lupinus albus* L.) seeds. **Food Chemistry**, v. 258, n. October 2017, p. 1–7, 2018.

KOHAJDOVÁ, Z.; KAROVIČOVÁ, J.; MAGALA, M. Effect of lentil and bean flours on rheological and baking properties of wheat dough. **Chemical Papers**, v. 67, n. 4, p. 398–407, 2013.

KROC, M. et al. Quantitative and qualitative analysis of alkaloids composition in the seeds of a white lupin (*Lupinus albus* L.) collection. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 64, n. 8, p. 1853–1860, 2017.

KURLOVICH, B. . **Lupins (Geography, classification, genetic resources and breeding)**. OY Interna ed. St. Petersburg. St. Petersburg, 2002.

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

LAMRABET, M. et al. Phylogenetic and symbiotic diversity of *Lupinus albus* and *L. angustifolius* microsymbionts in the Maamora forest, Morocco. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 126338, jul. 2022.

MAGALHÃES, S. C. Q. et al. Alkaloids in the valorization of European *Lupinus* spp. seeds crop. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 286–295, 1 jan. 2017.

MANE, S. P. et al. Lupin seed  $\gamma$ -conglutin: Extraction and purification methods - A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 73, p. 1–11, mar. 2018.

MARTINS, A. B.; SANTANA, R. M. C. Effect of carboxylic acids as compatibilizer agent on mechanical properties of thermoplastic starch and polypropylene blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 135, p. 79–85, 2016.

MATTILA, P. et al. Nutritional Value of Commercial Protein-Rich Plant Products. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 108–115, 1 jun. 2018.

MENIS-HENRIQUE, M. E. C. et al. Cereal fiber: extrusion modifications for food industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 33, p. 141–148, 1 jun. 2020.

MIANO, A. C.; GARCÍA, J. A.; AUGUSTO, P. E. D. Correlation between morphology, hydration kinetics and mathematical models on Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) grains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 290–298, 1 maio 2015.

MILOTSKYI, R. et al. Chemical Modification of Plasticized Lignins Using Reactive Extrusion. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 633, 18 set. 2019.

MOHAMMED, M. A. et al. Effect of Processing Methods on Alkaloids, Phytate, Phenolics, Antioxidants Activity and Minerals of Newly Developed Lupin (*Lupinus albus* L.) Cultivar. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, p. e12960, fev. 2017.

MOLINA, J. P. [UNESP]. Fracionamento da proteína e estudo termoanalítico das leguminosas: grão de bico (*Cicer arietinum*), variedade Cícero e tremçoço branco (*Lupinus albus* L.). **Aleph**, p. 62 f., 2010.

MONTEIRO, M. R. P. et al. Evaluation of the chemical composition, protein quality and digestibility of lupin (*Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius*). **O Mundo da Saúde**, v. 38, n. 3, p. 251–259, 30 set. 2014.

MONTEIRO, M. R. P.; ALVES, F. D.; SILVA, M. R. Evaluation of technological properties of

lupine flour (*Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius*). **Scientific Electronic Archives**, v. 13, n. 5, p. 46, 2020.

NIKMARAM, N. et al. Production of high quality expanded corn extrudates containing sesame seed using response surface methodology. **Quality Assurance and Safety of Crops and Foods**, v. 7, n. 5, p. 713–720, 2015.

NIKMARAM, N. et al. Effect of extrusion on the anti-nutritional factors of food products: An overview. **Food Control**, v. 79, p. 62–73, 2017.

NOUREDDINI, H.; BYUN, J. Dilute-acid pretreatment of distillers' grains and corn fiber. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 1060–1067, fev. 2010.

OLIVATO, J. B. et al. Compatibilisation of starch/poly(butylene adipate co-terephthalate) blends in blown films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 9, p. 1934–1939, 2011.

OLIVEIRA, C. T. **Determinação do perfil lipídico e obtenção de extrusados de grãos e farinhas de tremoço branco ( *lupinus albus* ) obtenção de extrusados de grãos e farinhas de tremoço branco ( *lupinus albus* )**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

OLIVEIRA, C. T. et al. Scientific Electronic Archives Characterization of the biochemical and lipid profiles of white lupine ( *Lupinus albus* ) grain and its derivatives. v. 11, n. Id, p. 67–74, 2018.

ORTIZ-CRUZ, R. A. et al. Effect of Extrusion Processing Conditions on the Phenolic Compound Content and Antioxidant Capacity of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) Bran. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 75, n. 2, p. 252–257, 2020.

PALANISAMY, M. et al. High moisture extrusion of lupin protein: influence of extrusion parameters on extruder responses and product properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 5, p. 2175–2185, 30 mar. 2019.

PANDIYAN, K. et al. Technological interventions for utilization of crop residues and weedy biomass for second generation bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 132, p. 723–741, 1 mar. 2019.

PICHMONY, E. K. et al. Exploration of physicochemical properties and molecular interactions between cellulose and high-amylose cornstarch during extrusion processing. **Current Research in Food Science**, v. 4, n. February, p. 588–597, 2021.

PIRES, C. V. et al. QUALIDADE NUTRICIONAL E ESCORE QUÍMICO DE AMINOÁCIDOS Pires. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 1, p. 179–187, 2006.

PLUSTEA, L. et al. Lupin (*Lupinus* spp.)-Fortified Bread: A Sustainable, Nutritionally, Functionally, and Technologically Valuable Solution for Bakery. **Foods**, v. 11, n. 14, p. 2067, 12 jul. 2022.

PRUSINSKI, J. White lupin (*Lupinus albus* L.) - Nutritional and health values in human nutrition - A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 35, n. 2, p. 95–105, 2017.

PRUSIŃSKI, J. Łubin Biały (*Lupinus Albus* L.) – Historia Udomowienia I Postępu Biologicznego. **Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych**, v. 580, n. 580, p. 105–119, 2015.

QI, M. et al. Impact of Extrusion Temperature on In Vitro Digestibility and Pasting Properties of

- Pea Flour. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 76, n. 1, p. 26–30, 28 mar. 2021.
- QUIROGA, A. L. B. **Dossiê Proteínas FOOD INGREDIENTS BRASIL**. Disponível em: <[https://revista-fi.com/upload\\_arquivos/201606/2016060036244001467048775.pdf](https://revista-fi.com/upload_arquivos/201606/2016060036244001467048775.pdf)>.
- REDIN, M. et al. Plantas de cobertura de solo e agricultura sustentável: espécies, matéria seca e ciclagem de carbono e nitrogênio. In: TIECHER, T. (Ed.). . **Manejo e Conservação do solo e da água em pequenas propriedades rurais no sul do Brasil: práticas alternativas de manejo visando a conservação do solo e da água**. UFRS ed. Porto Alegre, p. 186, 2016.
- REDONDO-CUENCA, A. et al. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1216–1222, 1 jan. 2007.
- RIGOLIN, T. R. **Modificação Química De Poli(Ácido Láctico) Com Anidrido Maleico Por Processamento Reativo**. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CENTRO, 2014.
- ROBIN, F.; SCHUCHMANN, H. P.; PALZER, S. Dietary fiber in extruded cereals: Limitations and opportunities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 28, n. 1, p. 23–32, 1 nov. 2012.
- ROMERO RODRÍGUEZ, J. A. et al. Physical Characterization of Maize Grits Expanded Snacks and Changes in the Carotenoid Profile. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 76, n. 1, p. 68–75, 2021.
- RUIZ-LÓPEZ, M. A. et al. Nutritional and bioactive compounds in mexican lupin beans species: A mini-review. **Nutrients**, v. 11, n. 8, 2019.
- RYBIN, W. et al. Variability of fat content and fatty acids profiles in seeds of a Polish white lupin (*Lupinus albus* L.) collection. **Genet Resour Crop Evol**, v. 65, p. 417–431, 2018.
- SAHARAN, P. et al. Bio-enrichment of phenolic, flavonoids content and antioxidant activity of commonly used pulses by solid-state fermentation. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 14, n. 3, p. 1497–1510, 2020.
- SANDOVAL-MUÑÍZ, R. DE J. et al. Lupin gamma conglutin protein: effect on Slc2a2, Gck and Pdx-1 gene expression and GLUT2 levels in diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 6, p. 716–723, 1 nov. 2018.
- SANTOS-HERNÁNDEZ, M. et al. Compared digestibility of plant protein isolates by using the INFOGEST digestion protocol. **Food research international (Ottawa, Ont.)**, v. 137, n. August, p. 109708, nov. 2020.
- SCHINDLER, S. et al. Lactic fermentation to improve the aroma of protein extracts of sweet lupin (*Lupinus angustifolius*). **Food Chemistry**, v. 128, n. 2, p. 330–337, 2011.
- SCHRENK, D. et al. Scientific opinion on the risks for animal and human health related to the presence of quinolizidine alkaloids in feed and food, in particular in lupins and lupin-derived products. **EFSA Journal**, v. 17, n. 11, nov. 2019.
- SHOGREN, R. L. Rapid preparation of starch esters by high temperature/pressure reaction. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 3, p. 319–326, 2003.
- SMITH, O. B. **Extrusion cooking**. In New Pro ed. Academic Press. New York.: Technology, Part B, v. 2, 1976.
- SOARES JÚNIOR, M. S. et al. Desenvolvimento de salgadinhos extrusados a partir de fragmentos de arroz e de feijão. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 191, 31 mar. 2011.

- SOLÓRZANO, J. W. V. **Obtenção e caracterização de farinha extrudada de diferentes genótipos de sorgo para o desenvolvimento de biscoitos doces**. UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO, 2013.
- ŚWIĘCICKI, W.; KROC, M.; KAMEL, K. Lupins. In: De Ron AM. In: LEGUMES., G. (Ed.). . **Handbook of plant breeding**. New York: Springer, v. 10, p. 179–218, 2015.
- TOLEDO, V. C. S. et al. Extrusion cooking of gluten-free whole grain flour blends. **Journal of Food Process Engineering**, v. 43, n. 2, p. 1–9, 2020.
- TOMÉ, D. Digestibility issues of vegetable versus animal proteins: Protein and amino acid requirements-functional aspects. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 272–274, 2013.
- TOUNSI-HAMMAMI, S. et al. Genetic diversity of rhizobia associated with root nodules of white lupin (*Lupinus albus* L.) in Tunisian calcareous soils. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 448–456, jul. 2019.
- VAN DE NOORT, M. Lupin: An Important Protein and Nutrient Source. In: **Sustainable Protein Sources**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. p. 165–183.
- VARGAS-SOLÓRZANO, J. W. et al. Physicochemical properties of expanded extrudates from colored sorghum genotypes. **Food Research International**, v. 55, p. 37–44, 2014.
- VILLACRÉS, E. et al. Effect of debittering and solid-state fermentation processes on the nutritional content of lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 6, p. 2589–2598, 2020.
- VILLACRÉS, E.; ÁLVAREZ, J.; ROSELL, C. Effects of two debittering processes on the alkaloid content and quality characteristics of lupin ( *Lupinus mutabilis* Sweet). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 5, p. 2166–2175, 30 mar. 2020.
- VILLARINO, C. B. J. et al. Nutritional, Health, and Technological Functionality of Lupin Flour Addition to Bread and Other Baked Products: Benefits and Challenges. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 5, p. 835–857, 3 abr. 2016.
- VON BAER, D.; REIMERDES, E. H.; FELDHEIM, W. Methoden zur Bestimmung der Chinolizidinalkaloide in *Lupinus mutabilis* - I. Schnellmethoden. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 169, n. 1, p. 27–31, 1979.
- WANG, S. H. et al. EFEITOS DOS PARÂMETROS DE EXTRUSÃO NA ABSORÇÃO DE ÁGUA E ABSORÇÃO DE GORDURA DE FARINHAS EXTRUSADAS DE TRIGO E SOJA. **Alim. Nutr**, v. 20, n. July 2015, p. 641–647, 2009.
- WILCZURA, P. et al. COLORIMETRIC VS. CHROMATOGRAPHIC ANALYSES OF ALKALOIDS IN LUPIN SEEDS. **Plant Breeding and Seed Science**, v. 78, p. 63–67, 2018.
- XIA, H.; LI, Y.; GAO, Q. Preparation and properties of RS4 citrate sweet potato starch by heat-moisture treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 172–178, 1 abr. 2016.
- YAN, X.; YE, R.; CHEN, Y. Blasting extrusion processing: The increase of soluble dietary fiber content and extraction of soluble-fiber polysaccharides from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 180, p. 106–115, 1 ago. 2015.
- YAVER, E.; BILGIÇLI, N. Ultrasound-treated lupin (*Lupinus albus* L.) flour: Protein- and fiber-rich ingredient to improve physical and textural quality of bread with a reduced glycemic index. **LWT**, v. 148, p. 111767, 1 ago. 2021.

YE, J. et al. Synthesis and characterization of citric acid esterified rice starch by reactive extrusion: A new method of producing resistant starch. **Food Hydrocolloids**, v. 92, n. February, p. 135–142, 2019.

ZHENG, Y.; LI, Y. Physicochemical and functional properties of coconut ( *Cocos nucifera* L) cake dietary fibres: Effects of cellulase hydrolysis, acid treatment and particle size distribution. **Food Chemistry**, v. 257, p. 135–142, 15 ago. 2018.

ZHONG, L. et al. Extrusion cooking increases soluble dietary fibre of lupin seed coat. **LWT**, v. 99, p. 547–554, 1 jan. 2019.