



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

KÁTIA DANIELLE ARAÚJO LOURENÇO VIANA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E EFEITO DA GALACTOMANANA DE
SEMENTES DE *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit NO CONTROLE DA
OBESIDADE**

SÃO LUIS – MA
JUNHO-2017

KÁTIA DANIELLE ARAÚJO LOURENÇO VIANA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E EFEITO DA GALACTOMANANA DE
SEMENTES DE *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit NO CONTROLE DA
OBESIDADE**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO como requisito para obtenção do título de Doutor(a) em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha
Borges

Co-orientadora: Profa. Dra. Ivone Garros Rosa

Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais

SÃO LUÍS, MA

JUNHO - 2017

LOURENÇO VIANA, Kátia Danielle Araújo

Caracterização físico-química e efeito da galactomanana de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit no controle da obesidade /Kátia Danielle Araújo Lourenço Viana –São Luís, MA . 2017.

151f.

Orientador(a): Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges

Co-orientador(a): Profa. Dra. Ivone Garros Rosa

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia - Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, 2016.

1. Galactomanana. 2. Obesidade. 3. *Leucaena leucocephala*.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Fundação Instituída nos Termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 - São Luís - Maranhão

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Coordenação Geral - Universidade Federal Rural de Pernambuco
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos – CEP: 52171-900 Recife-PE
Telefone (81) 3320-6050, 3320-6051 E-mail: renorbio@prppg.ufrpe.br
Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

FOLHA APROVAÇÃO DEFESA DE TESE

ALUNO: Kátia Danielle Araújo Lourenço Viana

TÍTULO DO PROJETO: “CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E EFEITO DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit NO CONTROLE DA OBESIDADE”.

PROFESSORA ORIENTADORA: Marilene Oliveira da Rocha Borges

BANCA EXAMINADORA:

CONCEITO

ASSINATURA

Prof^ª. Dr^ª. Marilene Oliveira da Rocha Borges – UFMA
(Presidente)

Prof^ª. Dr^ª. Denise Fernandes Coutinho Moraes– UFMA
(Titular)

Prof. Dr. Arlan da Silva Freitas– IFMA
(Titular)

Prof. Dr. Germana Freire Rocha Caldas- UFMA
(Titular)

Prof^ª. Dr^ª. Ana Karina Teixeira da Cunha– UFMA
(Titular)

DATA DA APROVAÇÃO: 16 de junho de 2017

HORÁRIO: Às 08:00h.

LOCAL: Prédio de Pós-Graduação do CCBS-UFMA.

*Dedico este trabalho aos meus familiares, em
especial ao meu esposo, filho e pais que
sempre estiveram ao meu lado.*

*“Em todas estas coisas, porém,
somos mais que vencedores”
Rm 8:37*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua infinita Graça e Amor. Por me fazer entender que, por minhas próprias forças, nada posso fazer! Senhor eu dependo de Ti.

Ao meu esposo Edrise Viana, por seu amor e cuidado sempre! Por se mostrar tão perto, mesmo estando longe, e só nós entendemos como isso é possível.

Ao meu filho Daniel, minha motivação diária para caminhar, minha alegria, meu companheiro, que mesmo tão pequeno entendeu os desafios dessa jornada e esperou ansioso por chegarmos até aqui.

Aos meus pais Jair Lourenço e Marineide Lourenço que sempre acreditaram mais em mim do que eu mesma, pelas palavras de incentivo, pelas orações, pela confiança em todos os momentos da minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges por aceitar o desafio de junto comigo concluir o doutorado, pela orientação, incentivo e confiança. Essa jornada me fez admirá-la ainda mais.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Ivone Garros Rosa por ensinar novos caminhos na pesquisa da área de nutrição, pela sua amizade, pelas orientações para a pesquisa e para vida.

Aos meus grandes companheiros nessa jornada, Daniele Cassias, Eurípedes Oliveira e Thiago Palhares, pelo apoio incondicional na concretização desse sonho. Esse foi só um motivo para que nos tornássemos amigos para toda a vida.

Aos nossos alunos do grupo BIOGOMAS em especial as alunas Ana Patrícia, Pollyana Luiza, Erika Meire e a nutricionista Thanara que estiveram sempre tão presentes no desenvolvimento desta pesquisa. A vocês todo o meu carinho e admiração.

Aos amigos que sempre estiveram torcendo e orando Marleane Moreira, Ana Karyne, Janete Alencar, Deysianne Chagas, Silvia Tereza, Soraia Arruda, Jorge Sadick, Jorselle Louzeiro, Lilyan Joyce, Caio Pavão, Gilberth Nunes e Luma Bulhão.

Aos amigos do PG Márcia, Amadeu, Natanael, Yanne, Vinícius, Marília, Amanda e Renato, que tanto têm sido exemplos pra mim no caminhar com Deus.

A todos os que compõem o Laboratório de Pesquisa e Pós-graduação em Farmacologia, professores, técnicos e alunos, que tanto me ensinaram nessa caminhada em busca de resultados, meus sinceros agradecimentos.

As Instituições parceiras, Universidade Federal do Paraná (UFPR) e Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), por nos receber e transmitir conhecimento através da busca de resultados.

A Universidade Federal do Maranhão por toda estrutura física, equipamentos e apoio técnico.

Ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1	Principais rotas para a regulação da alimentação e balanço energético.....	28
Figura 2	Seguimento representativo de uma cadeia de galactomanana de espécie vegetal.....	33
Figura 3	Composição, distribuição e sequência da distribuição das unidades de D-galactose das galactomananas.....	34
Figura 4	Imagem da espécie <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.....	36

CAPÍTULO I

Figura 1	Scanning Electron Microscopy (SEM): Galactomannan from <i>L. leucocephala</i> (Lam.) de Wit (a), guar gum (b).....	53
Figura 2	FTIR spectrum of galactomannans of <i>L. leucocephala</i> and guar gum	54
Figura 3	HPSEC-MALLS / RI elution profile of <i>L. leucocephala</i> -GL (a) and guar gum (b) galactomannan samples. LS: Light Spread Detector. RI: Refractive Index Detector	56
Figura 4	Flow curve performed in CR mode of 0.01-100 s ⁻¹ , at 25 °C. GL:galactomannan extracted from <i>L. leucocephala</i> (Lam.) de Wit. GG: commercial galactomannan guar gum.....	57
Figura 5	Viscosity curve obtained from the flow curve. GL: galactomannan extracted from <i>L. leucocephala</i> . GG: commercial galactomannan guar gum.....	58

CAPÍTULO II

Figura 1 Esvazimento Gástrico (a) e Trânsito Intestinal (b) dos grupos experimentais. CONT: grupo controle, ATROP: grupo atropina, GG: grupos tratados com gel de goma guar a 5%, GL: grupo tratado com gel de galactomanana de *L. leucocephala* a 5%. *significância estatística em relação ao grupo controle (CONT) 79

LISTA DE QUADROS E TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Quadro 1	Valores de referência para o diagnóstico de obesidade central e risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares segundo CC, RCE, IC.....	26
Tabela 1	Diferentes tratamentos dietéticos para a perda de peso.....	30
Tabela 2	Razão manose:galactose de galactomananas de diferentes espécies vegetais	33

CAPÍTULO I

Tabela 1	Physical characterization of seeds of <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	50
Tabela 2	Centesimal composition of the seeds of <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.....	50
Tabela 3	Yield and water retention capacity (WHC) and oil (OHC) of the <i>L. leucocephala</i> (Lam.) de Wit galactomannan and guar gum.....	52
Tabela 4	Monosaccharide composition of galactomannans of <i>L. leucocephala</i> and guar gum.....	55
Tabela 5	Distribution of the galactomannan molar mass of <i>L. leucocephala</i> (Lam.) de Wit and guar gum.....	57
Tabela 6	Rheological characteristics of the galactomannan of <i>L. leucocephala</i> (Lam.) de Wit and guar gum.....	59

CAPÍTULO II

Tabela 1	Composição nutricional das dietas Padrão e Hiperlipídica.....	71
-----------------	---	-----------

Tabela 2	Evolução de peso corporal, consumo alimentar e ingestão energética diária de ratos <i>Wistar</i> dos grupos CNO (controle não-obeso), COB (controle obeso), GG (tratado com gel de goma guar a 5%) e GL (tratado com gel de galactomanans de <i>L. leucocephala</i> a 5%).....	75
Tabela 3	Peso relativo (g tecido/100 g de peso corporal) dos tecidos adiposos brancos retroperitoneal, gonadal, visceral e adiposidade abdominal (%) de ratos <i>Wistar</i> dos grupos CNO (controle não-obeso), COB (controle obeso), GG (tratado com gel de goma guar a 5%) e GL (tratado com gel de galactomanans de <i>L. leucocephala</i> a 5%).....	76
Tabela 4	Parâmetros bioquímicos séricos de ratos <i>Wistar</i> dos grupos CNO (controle não-obeso), COB (controle obeso), GG (tratado com gel de goma guar a 5%) e GL (tratado com gel de galactomanans de <i>L. leucocephala</i> a 5%).....	77
Tabela 5	Valores de triglicerídios, colesterol e gordura total do tecido hepático de ratos <i>Wistar</i> dos grupos CNO (controle não-obeso), COB (controle obeso), GG (tratado com gel de goma guar a 5%) e GL (tratado com gel de galactomanans de <i>L. leucocephala</i> a 5%).....	78

CAPÍTULO III

Tabela 1	Formulação para hambúrguer vegetal.....	91
Tabela 2	Composição centesimal do hambúrguer vegetal à base de PTS e castanha de caju.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
Ara	Arabinose
ATROP	Atropina
Cal	Caloria
CC	Circunferência da cintura
CCK	Colecistoquinina
CONT	Controle
DCNT	Doenças crônicas não-transmissíveis
EDS	Energy Dispersive X- rays
FDs	Fibras Dietéticas
FTIR	Infrared spectroscopy
g	Grama
Gal	Galactose
GC-SM	Gas chromatography acoplada a mass spectrometer
GLP-1	Peptídeo semelhante à glucagon-1
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
IC	Índice de conicidade
IMC	Índice de Massa Corporal
Man	Manose
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
OHC	Oil Holding Capacity
Pa.s	Pascal
POF	Pesquisa de orçamentos familiares
PTS	Proteína Texturizada de Soja
PYY	Peptídeo YY
RCE	Relação cintura-estatura
SEM	Scanning Electron Microscopy

TG	Triglicerídeos
TMB	Taxa Metabólica Basal
VLCD	Very Low Calorie Diets
WHC	Water Holding Capacity

RESUMO

As galactomananas são fibras dietéticas do tipo solúveis que podem influenciar mecanismos que envolvem o controle do apetite e conseqüente ganho de peso. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit está entre as espécies de leguminosa fonte de galactomananas. Este estudo teve como objetivo caracterizar a galactomanana de *Leucaena leucocephala* segundo parâmetros físico-químicos e estruturais e avaliar o seu efeito no controle da obesidade em ensaios pré-clínicos em ratos. A galactomanana foi obtida a partir da retirada manual do endosperma, dissolução em água, filtração e precipitação em etanol. O rendimento da galactomanana foi de 8,8% e as capacidades de retenção de água (7,08 g H₂O/g polissacarídeo) e óleo (0,8 g óleo/g polissacarídeo) mostraram-se semelhantes à goma guar (Sigma[®]), utilizada como padrão analítico. A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou um polímero com intenso grau de porosidade na superfície, tendo os elementos oxigênio (54,9%), carbono (38,3%) e nitrogênio (6,8%) como principais na constituição da matéria seca de acordo com a análise de energia dispersiva de raios-X (EDS). A composição monossacarídica apresentou a manose (59,44%) e a galactose (39,60%) como componentes majoritários e razão Man:Gal de 1,5. A análise por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) sugere uma estrutura cristalina essencialmente formada por anéis piranosídicos de resíduos de galactosil e manosil representados por estiramentos vibracionais de grupos funcionais como C-O, C-C-O, C-OH, C-H e OH. A amostra mostrou-se homogênea com elevada massa molar e as propriedades reológicas revelaram que, em solução aquosa a 5%, a galactomanana se comportou com fluido não-newtoniano e pseudoplástico. Para avaliar o efeito da galactomanana de *L. leucocephala* na obesidade, ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), fêmeas, com 60 dias de idade receberam dieta hiperlipídica durante 18 semanas e foram posteriormente distribuídos aleatoriamente em: grupo GL (n = 5), tratado com gel a 5% de galactomanana de *L. leucocephala*; GG (n = 5), tratado com gel a 5% de goma guar (Sigma[®]) e o grupo COB (n = 5), recebeu água destilada (0,1 mL/100 g). O grupo controle não-obeso (CNO, n = 5) recebeu dieta padrão para ratos (Nuvilab[®]). Os tratamentos foram realizados diariamente, por gavagem, por um período de 18 semanas. As variáveis analisadas foram: evolução da massa corporal, ingestão alimentar e calórica, níveis plasmáticos de colesterol total, HDL-c, triglicerídeos e glicemia de jejum, marcadores hepáticos (colesterol total, triglicerídios e gordura total) e gordura corporal (retroperitonal, gonadal, visceral e adiposidade abdominal). Para a avaliação do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal foram utilizados 24 animais divididos em 4 grupos (6 animais/grupo): controle (CONT), atropina (ATP), goma guar (GG) e galactomanana de *L. leucocephala* (GL). O tratamento a longo prazo com o gel a 5% de galactomanana de *L. leucocephala*, em comparação ao grupo controle-obeso (COB), exerceu efeito protetor na evolução do peso corporal (7,57% vs 11,5%), reduziu significativamente o consumo alimentar diário (7,63 g vs 11,79 g), os depósitos de gordura gonadal e visceral (2,20% vs 3,54% e 1,20% vs 2,16%, respectivamente). Os resultados obtidos indicam que a galactomanana das sementes de *L. leucocephala* pode ser considerada um importante adjuvante no uso de galactomananas em processos biotecnológicos e industriais bem como na terapêutica da obesidade e suas complicações.

Palavras-Chave: Polissacarídeos, Obesidade, *Leucaena leucocephala*

ABSTRACT

Galactomannans are dietary fibers of the soluble type that can influence mechanisms that involve the control of appetite and consequent weight gain. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit is among the species of leguminous source of galactomannans. This study aimed to characterize *Leucaena leucocephala* galactomannan according to physical-chemical and structural parameters and evaluate its effect on the control of obesity in pre-clinical tests in rats. Galactomannan was obtained from manual withdrawal of the endosperm, dissolution in water, filtration and precipitation in ethanol. The yield of galactomannan was 8.8% and the water retention (7.08 g H₂O/g polysaccharide) and oil (0.8 g oil/g polysaccharide) were similar to guar gum (Sigma[®]), used as an analytical standard. The scanning electron microscopy (SEM) revealed a polymer with an intense degree of surface porosity. The elements oxygen (54.9%), carbon (38.3%) and nitrogen (6.8%) dry matter composition according to the X-ray dispersive energy analysis (EDS). The monosaccharide composition presented mannose (59.44%) and galactose (39.60%) as major components and Man: Gal ratio of 1.5. Infrared spectroscopy (FTIR) analysis suggests a crystalline structure essentially formed by pyranoside rings of galactosyl residues and manipulations represented by vibratory stretches of functional groups such as C-O, C-C-O, C-OH, C-H and OH. The sample showed to be homogeneous with high molar mass and as rheological properties revealed that, in 5% aqueous solution, the galactomannan behaved with non-Newtonian and pseudoplastic fluid. To evaluate the effect of *L. leucocephala* galactomannan on obesity, 60-day-old female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) received a hyperlipid diet for 18 weeks and were then randomly assigned to: GL group (n = 5), treated With 5% Gel of *L. leucocephala* galactomannan; GG (n = 5), treated with 5% guar gum gel (Sigma[®]) and COB group (n = 5), dropping distilled water (0.1 ml / 100 g). The non-obese control group (CNO, n = 5) received standard diet for rats (Nuvilab[®]). Treatments were performed daily by gavage for a period of 18 weeks. The variables analyzed were body mass, food and caloric intake, plasma levels of total cholesterol, HDL-c, triglycerides and fasting glycemia, hepatic markers (total cholesterol, triglycerides and total fat) and body fat (retroperitoneal, gonadal, visceral and abdominal adiposity). For the evaluation of gastric emptying and intestinal transit, 24 animals were divided into 4 groups (6 animals / group): control (CONT), atropine (ATP), guar gum (GG) and galactomannan of *L. leucocephala* (GL). Long-term treatment with the 5% galactomannan gel of *L. leucocephala*, compared to the control-obese group (COB), exerted a protective effect on the evolution of body weight (7.57% vs 11.5%) and reduced (7.63 g vs g), gonadal and visceral fat deposits (2.20% vs 3.54% and 1.20% vs 2.16%, respectively). The results indicate that the galactomannan of the seeds of *L. leucocephala* can be considered an important adjuvant in the use of galactomannans in biotechnological and industrial processes as well as in the therapy of obesity and its complications.

Keywords: Polysaccharides, Obesity, *Leucaena leucocephala*

SUMARIO

		Pág.
	APRESENTAÇÃO	19
1.	INTRODUÇÃO	21
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1	A obesidade como um problema de saúde pública.....	25
2.2	Mecanismos neuroendócrinos no controle da homeostase energética.....	27
2.3	Fatores dietéticos associados à obesidade.....	29
2.4.	Galactomananas.....	32
2.5	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.....	35
3.	OBJETIVOS	39
4	CAPÍTULO I	
	Artigo 1 - “Physicochemical and structural characterization of galactomannan seeds of <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit”	42
5	CAPITULO II	
	Artigo 2 - “Efeito da galactomanana de sementes de <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit no controle da obesidade em ratos”.....	65
6	CAPITULO III	
	Patente Depositada - “Produto alimentício à base de proteína vegetal e castanha de caju”	88
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
	REFERÊNCIAS	99
	ANEXOS	106

Apresentação

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho se propõe a avaliar a galactomanana obtida de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, segundo parâmetros físicos-químicos, estruturais e funcionais para o controle da obesidade.

No capítulo I encontram-se os dados da avaliação físico-química e parâmetros estruturais da galactomanana de *L. leucocephala*, em formato de artigo científico, que foi submetido ao periódico “*Food Hydrocolloids*” tendo como título: **Physicochemical and structural characterization of galactomannan seeds of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit**”

O capítulo II apresenta os resultados da avaliação funcional da galactomanana de *L. leucocephala* no controle da obesidade em ratos, em formato de artigo científico a ser submetido ao periódico “*Physiology & Behavior*”, tendo como título: **“Efeito da galactomanana de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit no controle da obesidade em ratos”**.

No capítulo III encontra-se a patente depositada intitulada: **“Produto alimentício à base de proteína vegetal e castanha de caju”**.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A obesidade representa um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade, sendo considerada importante fator de risco para diversas doenças crônicas não-transmissíveis, com destaque para a hipertensão arterial, diabetes mellitus tipos 2, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (LOURENÇO, RUBIATTI, 2016; MACHADO, RODRIGUES, VIANA, SAMPAIO, 2012; PITANGA, LESSA, 2007). Essa patologia é resultante de um desequilíbrio energético, em que há um consumo excessivo de energia e pouca liberação das calorias ingeridas, sendo caracterizada pelo aumento de gordura corporal que pode ser prejudicial à saúde (WHO, 2013).

A projeção é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões, obesos (BRASIL, 2014). O número de crianças com sobrepeso e obesidade no mundo pode chegar a 75 milhões, caso não seja feita nenhuma intervenção (BRASIL, 2014). No Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009, configurou a obesidade como uma epidemia crescente, afetando 14,8% dos indivíduos adultos (BRASIL, 2010) e a pesquisa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), apresentou prevalência de 17,0% de adultos obesos em um conjunto cidades brasileiras (BRASIL, 2015).

A obesidade engloba um grupo heterogêneo de condições, com múltiplas causas que, em última análise, resultam no fenótipo de obesidade (FRANCISCHI et al., 2000). Fatores genéticos, metabólicos, hormonais, ambientais, comportamentais e culturais podem estar envolvidos na gênese da obesidade, no entanto, estudos reforçam a forte influência da dieta (MILAGRO et al., 2016; MALTA et al., 2015; MALIK, SHULZE, HU, 2006; LOTTENBERG, 2006) e do sedentarismo na prevalência da obesidade em diferentes grupos populacionais (MATSUDO et al., 2016).

Ao focalizar a obesidade pelos aspectos vinculados aos hábitos alimentares, o processo de industrialização dos alimentos tem sido apontado como um dos principais responsáveis pelo crescimento energético da dieta na maioria das populações do Ocidente (MONTEIRO et al., 2000). Análises empreendidas com base em dados de pesquisas indicam que este quadro, configura-se em razão do elevado consumo de carne vermelha e carne processada (FARDET,

BOIRIE, 2014), bebidas açucaradas (MALIK, SCHULZE, HU, 2006) e declínio do consumo de leguminosas, hortaliças e frutas (BATISTA FILHO et al., 2008).

As fibras dietéticas são importantes componentes nutricionais aliados ao controle do peso corporal (FRANCISCHI et al., 2000). Os principais mecanismos de ação envolvidos no seu efeito funcional está a redução da ingestão energética, o aumento no tempo de esvaziamento gástrico e da sensação de saciedade, a redução na digestibilidade, diminuição na secreção da insulina, aumento na excreção fecal e secreção de peptídeos anorexígenos (SOLAS et al., 2016).

Dentre esses compostos alimentares encontrados na natureza conhecidos como fibras, encontram-se as gomas. A utilização de gomas de sementes tem trazido muitos benefícios à saúde como afirma Rasoamanana et al., (2013). A indústria de alimentos também tem feito bom uso desses componentes, melhorando as propriedades de seus produtos principalmente pelo seu poder espessante, estabilizante e geleificante que estas gomas apresentam (PRAJAPATI et al., 2013).

Galactomananas são gomas obtidas principalmente do endosperma de sementes de plantas e se constituem de um esqueleto formado por unidades repetidas de β -D-manose (Man), ligadas entre si por pontes de oxigênio do tipo 1 $\rightarrow$ 4 e unidades α -D-galactose (Gal) ligadas à cadeia principal por ligações de oxigênio do tipo 1 $\rightarrow$ 6 (LIYANAGE, ABIDI, AULD, MOUSSA, 2015; AZERO; ANDRADE, 1999).

Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit apresenta galactomanana em sua composição (NWOKOCHA; WILLIAMS, 2012). Pertence à família das leguminosas Fabaceae e subfamília Mimosoidaeae, e trata-se de uma espécie nativa das Américas com ampla disseminação na África (NWOKOCHA, WILLIAMS, 2012; SHELTON; BREWBACKER, 1998). Suas sementes apresentam-se como importante fonte de polissacarídeos hidrossolúveis e os relatórios de pesquisa mostram que estas contêm de 20 a 25% de galactomanana localizadas principalmente em seu endosperma. Estudos têm avaliado o efeito da galactomanana desta espécie vegetal no mecanismo de sustentação e liberação de fármacos (DEODHAR et al, 1998; PENDYALA, 2010). No entanto, pesquisas sobre a sua utilização na produção de alimentos e como componente funcional ainda são inconsistentes.

A produção de galactomananas constitui-se uma atividade lucrativa em todo o mundo em razão de seus aspectos físico-químicos e funcionais. Novas fontes deste biopolímero são pesquisadas na perspectiva de estabelecer fontes renováveis de galactomananas, com sua caracterização bem definida, para aplicações biotecnológicas e sua utilização no âmbito da saúde. Este estudo se propôs caracterizar a galactomanana obtida de sementes de *L. leucocephala* segundo parâmetros físico-químicos e estruturais, além de avaliar o seu efeito na prevenção da obesidade em ensaios pré-clínicos e sua aplicação na elaboração de produtos alimentícios.

Referencial Teórico

2. Referencial Teórico

2.1 A obesidade como problema de saúde pública

As tendências de transição nutricional em diferentes países do mundo convergem para uma dieta conhecida como “dieta ocidental”, caracterizada por ser rica em gorduras (particularmente as de origem animal), açúcares e alimentos refinados, e pobres em carboidratos complexos e fibras (MONTEIRO et al., 1995). Mudanças no padrão dietético associadas ao declínio progressivo da atividade física dos indivíduos, bem como mudanças demográficas, socioeconômicas e epidemiológicas ao longo do tempo estão refletindo na diminuição progressiva da desnutrição e no aumento da obesidade (FRANCISCHI et al., 2000; MONTEIRO et al., 1995).

A obesidade configura-se então como problema nutricional, de magnitude mundial e não se trata apenas de uma desordem singular e sim um grupo heterogêneo de condições, com múltiplas causas que, em última análise, resultam no fenótipo de obesidade (LOURENÇO; RUBIATTI, 2016; FRANCISCHI, et al., 2000). De acordo com *World Health Organization* (WHO), a obesidade pode ser definida como um desequilíbrio energético, em que há consumo excessivo de energia e pouca liberação das calorias ingeridas, devido ao sedentarismo, sendo descrita pelo aumento de gordura corporal, que pode ser prejudicial à saúde (WHO, 2013).

É considerada fator de risco responsável pelo aumento da morbidade e mortalidade por doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) a exemplo da hipertensão, doença cardiovascular, diabetes e câncer (mama, endométrio, cólon e próstata), constituindo-se um desafio mundial controlar sua progressão (MALIK et al., 2006; MORRILL et al., 2002).

O inquérito telefônico que avaliou fatores de risco e proteção para doenças crônicas (Vigitel) constatou uma prevalência de 17,0% de adultos obesos em um conjunto cidades brasileiras (BRASIL, 2015) e apresentou uma projeção para 2025 com mais de 700 milhões de indivíduos adultos com diagnóstico de obesidade. O número de crianças com excesso de peso no mundo pode chegar a 75 milhões, caso não seja feita nenhuma intervenção (BRASIL, 2014). Além disso, Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008–2009 constatou tendência de aumento na prevalência da obesidade na população adulta de 20 a 75 anos (BRASIL, 2010).

O indicador antropométrico mais amplamente utilizado para o diagnóstico nutricional da obesidade é o índice de massa corporal (IMC), calculado pela razão entre peso (kg) e altura (m)² (MALTA et al., 2016; MACHADO; RODRIGUES; VIANA; SAMPAIO, 2012). De acordo com a WHO (1998), indivíduos são considerados obesos quando apresentam IMC $\geq 30,0$ kg/m². Além do IMC, outros indicadores antropométricos têm sido recomendados como parte da rotina do atendimento clínico e das estratégias de saúde pública para o diagnóstico desta patologia, a exemplo dos indicadores de obesidade central como a circunferência da cintura (CC), a relação cintura/estatura (RCE) e o índice de conicidade (IC) (FLEGAL; GRAUBARD, 2009; TAYLOR et al., 2010) (Quadro 1).

Quadro 1 – Valores de referência para diagnóstico de obesidade central e risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares segundo CC, RCE e IC.

Parâmetros	Sexo	
	Masculino	Feminino
CC (cm) ¹	≥ 94	≥ 80
RCE ²	$\geq 0,52$	$\geq 0,53$
IC ²	$\geq 1,25$	$\geq 1,18$

¹ WHO (1998); ² PITANGA; LESSA (2005). CC – circunferência da cintura. RCE – relação cintura/estatura. IC: Índice de Conicidade.

Apesar de uma dieta inadequada, rica em açúcares e gorduras e o sedentarismo serem considerados as principais causas da obesidade, outros fatores como a genética, o fator social, o ambiental, o metabólico e o estado comportamental, podem exacerbar o desenvolvimento desta patologia (NOVAIS; LEITE, 2011; KOLOTKIN et al., 2001; FRANCISCHI et al., 2000).

Determinantes sociais como a baixa escolaridade, menor renda, união conjugal (casados e viúvos) e envelhecimento, podem ser preponderantes na gênese da obesidade (MALTA et al., 2016; GRUNDY, 1998). Além disso, certo número de desordens endócrinas como hipotireoidismo, problemas no hipotálamo, hipogonadismo em homens e ovariectomia em mulheres, alterações no metabolismo de corticoesteróides, síndrome do ovário policístico e problemas psicológicos como, por exemplo, estresse, ansiedade e depressão também podem estar associados ao ganho de peso, pois influenciam principalmente o comportamento alimentar (JEBB, 1997; STUNKARD; WADDEN, 1992).

Em se tratando dos fatores genéticos, embora existam evidências sugerindo a forte influência no desenvolvimento da obesidade, seus mecanismos ainda não foram bem esclarecidos. Segundo Grundy (1998), o componente genético pode atuar no controle do apetite, bem como sobre o gasto energético, em especial sobre a Taxa Metabólica Basal (TMB). Contudo, poucos indícios apontam que algumas populações sejam mais suscetíveis à obesidade por motivos genéticos, o que reforça a forte influência da dieta e da atividade física na prevalência da obesidade em diferentes grupos populacionais (WHO, 1990).

O uso de modelos animais em escala experimental tem contribuído para encontrar os principais mecanismos que envolvem a gênese da obesidade ou possíveis fatores protetores. No entanto, o modelo experimental deve ser mais o próximo possível do desenvolvimento da obesidade em humanos, ou seja, a indução dessa condição via consumo de alimentos altamente palatáveis e com alto valor energético, parece ser o mais apropriado (ROSINI; SILVA; MORAES, 2012).

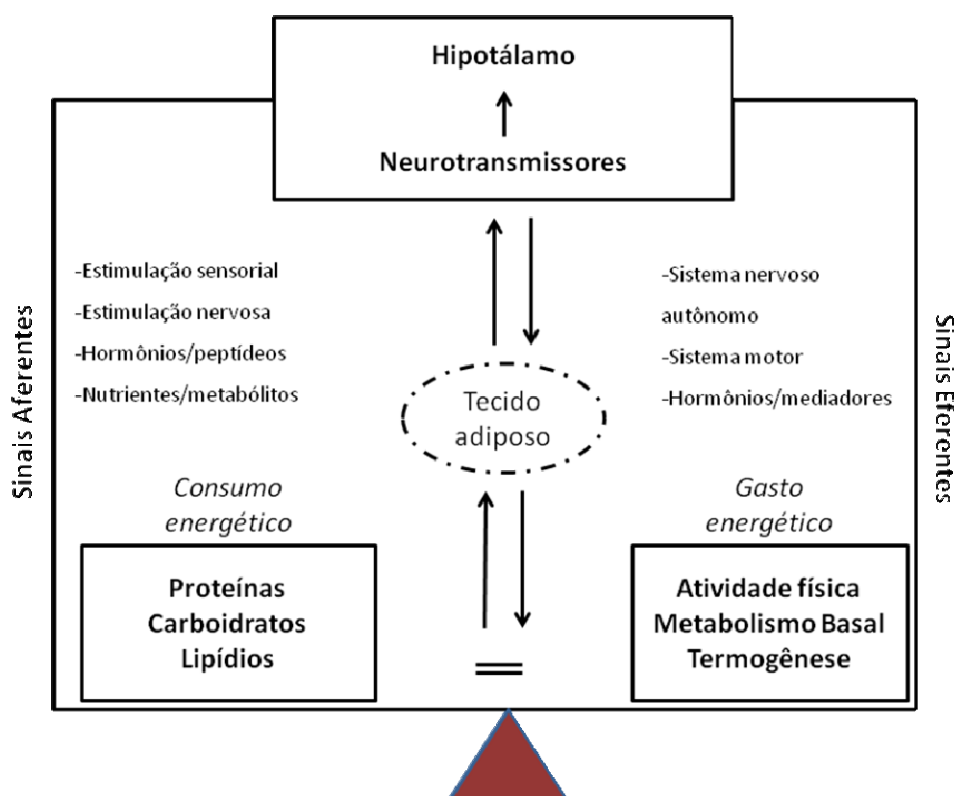
2.2 Mecanismos neuroendócrinos no controle da homeostase energética

Várias hipóteses e teorias têm sido propostas para explicar a homeostase energética e a regulação do peso, dentre elas: sinalização de aminoácidos; controles lipostático, glicostático, glicogenostático para alimentação; saciedade; fracionamento de nutrientes; participação do sistema neuroendócrino; fatores mediados que ligam o cérebro ao tecido adiposo, microbiota intestinal, fatores comportamentais, ambientais e variantes genéticas (SOLAS, et al., 2016; GREENWAY, 2015; MILAGRO et al., 2013; MARTINEZ, 2000). A ingestão de alimentos, especificamente, provoca além de estímulos neuro-sensoriais como a distensão mecânica gastrointestinal, a modulação fisiológica com sinalização que regulam o apetite e a saciedade através de sistemas específicos, incluindo diferentes monoaminas, neuropeptídeos, citocinas, aminoácidos, glicose e hormônios (SOLAS et al., 2016). A resposta integrada à oferta de alimentos é controlada pelos sistemas nervoso e endócrino, além de fenômenos enzimáticos como mostra a Figura 1.

Os neuropeptídeos anorexígenos e orexígenos compõem apenas uma parcela dessa complexa regulação que integra um conjunto de sinais neuroendócrinos sensíveis ao estado metabólico e à ingestão calórica, permeando sensações de fome, apetite, saciedade e gasto

energético. Fazem parte desses sinais neuroendócrinos: os gastrointestinais como grelina, colecistoquinina (CCK), peptídeo semelhante à glucagon 1 (GLP-1), peptídeo YY (PYY), os adipocitários como a leptina, os neuromoduladores da fome e do apetite e outras substâncias como a insulina (LEITE; BRANDÃO-NETO, 2009).

Figura 1 – Principais rotas para a regulação da alimentação e balanço energético



Fonte: Adaptado de SOLAS et al., 2016

Diversos compostos bioativos têm sido identificados com atividade antiobesidade. Saponinas, fibras e outros polissacarídeos resistentes à digestão, derivados do terpeno, polifenóis e proteínas, presentes em vegetais, estão sendo investigados por promoverem diminuição na ingestão de alimentos e aumento da saciedade (SOLAS et al., 2016). Presentes nas plantas, esses compostos bioativos podem estar envolvidos em mecanismos como: restrição de apetite, aumento da saciedade ou diminuição da ingestão calórica; ativação da lipólise, oxidação da gordura e termogênese; declínio da biossíntese da gordura endógena;

diversos processos que envolvem adipogênese, inflamação e alterações associadas à obesidade (SOLAS et al., 2016).

Alguns fármacos também têm sido utilizados para o controle da obesidade. Cetilistat, Dapagliflozina, Empagliflozin e Dirlotapide aparecem como compostos em potencial no tratamento de obesidade, tendo com o principal mecanismo, a redução do consumo energético (ZINMAN et al., 2015). Além disso, o uso de adoçante artificial, como substituto de açúcares, também pode ser útil na redução da ingestão calórica, embora também tenha sido associado ao ganho de peso e a intolerância à glicose, alterando microbiota intestinal (SUEZ et al., 2014).

2.3 Fatores Dietéticos associados à Obesidade

Tendo em vista que os fatores dietéticos podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade, muitos tratamentos envolvem a restrição da ingestão energética total com objetivo de promover o balanço energético negativo, ou seja, condição no qual o gasto energético supera o consumo de energia (HILL et al., 1993).

Estratégias nutricionais inovadoras para perda de peso estão sendo investigadas, não só para reduzir a adiposidade como também para garantir a manutenção, a longo prazo, de um peso saudável, para preservar massa magra e tratar características adversas associadas tais como, resistência à insulina, hipertensão e dislipidemias (SOLAS, et al., 2016; ABETE et al., 2010). O uso das *Very Low Calorie Diets* (VLCD) tem sido comumente utilizado nessa perspectiva, com consumo energético representado em quantidades inferiores a 800 kcal/dia e ainda restrições moderadas com consumo de 1200 Kcal/dia ou mais (COWBURN et al., 1997).

Embora os princípios subjacentes sejam simples, a aplicação das VLCDs enfrenta dificuldades significativas ao aconselhar um regime de baixa caloria para pessoas obesas. Além da dificuldade de adesão e manutenção do peso perdido, tais protocolos podem ainda resultar em perdas severas de água, eletrólitos, minerais, glicogênio e outros tecidos isentos de gordura (LOTTENBERG, 2006; FRANCISCHI et al., 2000).

De acordo com o relatório descrito pelo comitê científico da *Stony Brook University-SBU* (2013), as funções individuais de cada nutriente também devem ser consideradas. Dietas com baixo teor de carboidratos em curto prazo, são mais eficazes na perda de peso quando comparadas às dietas com baixo teor lipídico, no entanto, a longo prazo, não há diferenças sobre a perda de peso quando consideradas orientações com enfoques específicos para o baixo consumo de carboidratos e lipídeos, dietas ricas em proteínas, dietas de baixo índice glicêmico e aquelas que apresentam elevada porcentagem de gordura monoinsaturada (SBU, 2013).

Ensaio de intervenção randomizados e meta-análises foram desenvolvidos com o intuito de confirmar tais afirmações que ainda se apresentam pouco elucidadas na literatura, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Diferentes tratamentos dietéticos para perda de peso.

Revisões sistemáticas e Meta-Análises				Ensaio Randomizados
Intervenção Dietética	Características	Duração do Tratamento	Perda de peso Esperada	Resultados obtidos
Dietas Hipocalóricas (VLCD)	<400 kcal/dia	2-8 semanas	1,2 – 2,0 kg/semana	Em 8 semanas - dieta hipocalórica (800-1000 kcal/dia) resultou numa média de perda de peso em 10,9 ±3,1 kg.
Restrição calórica	<1200 kcal/dia	8 semanas – 12 meses	0,5-1,5 kg/semana	Em 8 semanas , dieta hipocalórica (-30%) induziu uma redução de peso de 5,5 ± 2,5% .
Hiperprotéica/ Baixo teor de Carboidratos	Restrição calórica	4-12 semanas	0,5-1,0 kg/semana	Em 8 semanas de intervenção (-30% de energia e oferta protéica de 30%) induziu a redução do peso corporal em 7,09 ±0,82 kg.
Hiperlipídica/ Baixo teor de Carboidratos	Restrição calórica	3-6 meses	0,2-0,4 kg/semana	Após 12 semanas em dieta hipocalórica (déficit de energia de 500 kcal) com elevado teor lipídico e baixo teor de carboidratos, um redução de 7,1% do peso foi observada.
Hipolipídica/ Baixo teor de Carboidratos	Restrição calórica	6-10 semanas	0,5-1,0 kg/semana	10 semanas de intervenção envolvendo uma dieta hipocalórica (- 600 kcal/dia) e hipolipídica (20-25%) apresentou uma média de perda de peso de 6,0kg .
Hipolipídica/ Elevado teor de Carboidratos	<i>Ad libitum</i>	3-6 meses	0,2-0,3 kg/semana	Diminuição do peso corporal com dieta hipolipídica e elevado teor de carboidratos simples e dieta hipolipídica e elevado teor de carboidratos

				complexos. Após 6 semanas, redução de 0,9 e 1,8 kg, respectivamente.
Hiperlipídica/ Baixo teor de Carboidratos	<i>Ad libitum</i>	3-12 meses	0,3 – 0,4 kg/semana	Em 12 meses , uma redução de 4,7 kg foi observada.

Fonte: Adaptado de SOLAS et al., (2016).

Dietas hipercalóricas e/ou hiperlipídicas têm sido muito utilizadas como um modelo de indução de obesidade em animais de laboratório (NASCIMENTO et al., 2008; ZAMBON et al., 2009; SILVA et al., 2010). Este modelo, em particular, é extremamente útil nas pesquisas com obesidade em ensaios pré-clínicos devido a sua grande semelhança com a gênese e com as respostas metabólicas decorrentes da obesidade em humanos, ou seja, a obesidade como consequência da influência de fatores ambientais, como por exemplo, o consumo em excesso de alimentos altamente calóricos e o sedentarismo (TSCHOP; HEIMAN, 2001).

Entre grupos de alimentos e bebidas, o elevado consumo de carne vermelha e carne processada, bem como bebidas açucaradas, podem estar associados aos efeitos deletérios do sobrepeso/obesidade. Em contrapartida, outros alimentos como chá, vinho, leite, frutas, vegetais, cereais integrais, sementes e castanhas, podem apresentar efeito protetor (FARDET; BOIRIE, 2014; MALIK; SCHULZE; HU, 2006).

As fibras dietéticas (FDs) representam importantes componentes nutricionais no controle da obesidade. Dentre os principais mecanismos de ação estão: redução da ingestão energética, aumento no tempo de esvaziamento gástrico, aumento da sensação de saciedade, redução na digestibilidade, diminuição na secreção da insulina, aumento na excreção fecal e secreção de peptídeos anorexígenos (SOLAS, et al., 2016; FRANCISCHI et al., 2000). De acordo com a *American Dietetic Association* (ADA), a recomendação diária de FDs para indivíduos adultos é de 14g/1000 kcal (ADA, 2002), enquanto que a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) estabelece uma recomendação diária de 20 a 35g (SBD, 2009).

As diferentes FDs são definidas pela sua solubilidade, fermentabilidade e viscosidade (RASOAMANANA et al., 2013). Rao (2016) afirma que a viscosidade das fibras pode ser considerada um importante fator no controle do apetite, ou seja, fibras solúveis são capazes de

promover atrasos do esvaziamento gástrico e/ou motilidade do cólon quanto mais elevada sua viscosidade. Tal propriedade se justifica pela redução do fluxo pilórico e o aumento da retenção do conteúdo gástrico.

A fermentabilidade também se assume como uma propriedade das fibras no controle do apetite. A fermentação das fibras está associada à produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente butiratos e propionatos no cólon, o que parece justificar este fenômeno, pois estes são conhecidos por estimular a liberação de hormônios intestinais, que influenciam não só a motilidade do cólon, como também a percepção do apetite (CARLSON et al., 2015; NOACK; TIMM; HOSPATTANKAR, 2013; VELAZQUEZ; DAVIS; MARETT, 2000).

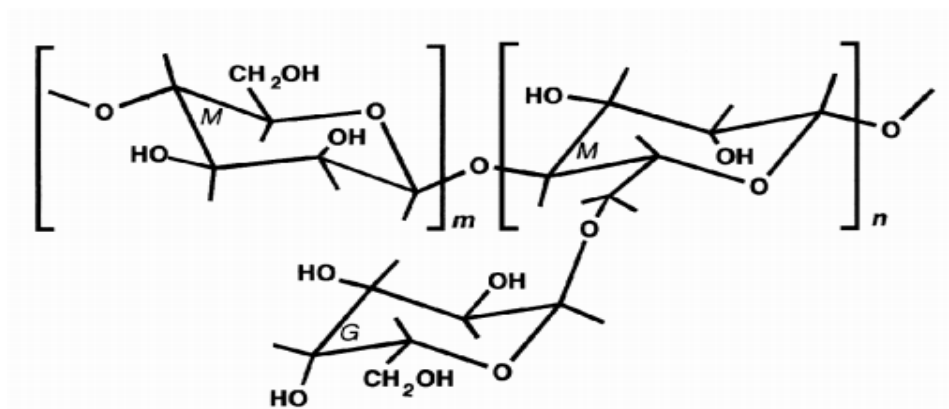
2.4 Galactomananas

Galactomanana são FDs do tipo solúveis, viscosas e altamente fermentáveis (RASOAMANANA et al, 2013). Assim como outros polissacarídeos, as galactomananas, também conhecidas como gomas, encontram-se na estrutura da parede celular de vegetais e são extraídas do endosperma de sementes, principalmente de certas leguminosas (BUSH et al., 2015; LIYANAGE, et al., 2015; BENTO, et al., 2013; NWOKOCHA, WILLIAMS, 2012; CERQUEIRA et al., 2009), embora a literatura também apresente os microrganismos, em particular as leveduras e outros fungos, como fonte desses biopolímeros (PRAJAPATI et al., 2013).

Constituem-se de um esqueleto formado por resíduos de β -D-manose (Man) e α -D-galactose (Gal) (LIYANAGE, 2015; AZERO; ANDRADE, 1999) (Figura 2). A proporção dos resíduos de manose:galactose pode variar entre espécies, podendo assim serem classificadas em dois grupos: os de elevada e baixa concentração de galactose (CRISÓSTOMO, 2009).

Fatores como variações climáticas, o grau de maturação das sementes, o local de cultivo, formas de extração e purificação deste polissacarídeo e a ação enzimática de gactosil e manosiltransferases, podem ser determinantes na proporção entre os resíduos de manose:galactose, bem como ser capaz de justificar as diferenças nas diversas fontes apresentadas na literatura (BOCCHINFUSO et al., 2010; CERQUEIRA et al., 2009; CUNHA et al, 2007; EDWARDS et al., 1992).

Figura 2 – Seguimento representativo de uma cadeia de galactomanana: manose (M), galactose (G)



Fonte: VENDRUSCOLO, 2005

A razão manose:galactose é responsável pelas propriedades físico-químicas deste biopolímero como: grau de solubilidade, interação com moléculas de celulose na parede celular, bem como interações com outros polímeros e pode variar entre espécies tipicamente entre 1,1 e 5,0 (CRISÓSTOMO, 2008; SRIVASTAVA & KAPOOR, 2005).

Tabela 2 – Razão manose:galactose de galactomananas de diferentes espécies vegetais

Espécie	Man:Gal	Referência
<i>Dimorphandra gardineriana</i>	1,8	Cunha et al., 2009
<i>Adenanthera pavonina</i>	1,8	Cerqueira et al., 2009
	1,5-1,7	Bento et al., 2013
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	2,8	Cerqueira et al., 2009
	3,6	Buriti et al., 2014
<i>Prosopis ruscifolia</i>	1,6	Bush et al., 2015
<i>Cassia grandis</i>	2,4	Albuquerque et al., 2014
<i>Senna spectabilis</i>	3,3	Fernandes et al., 2004
<i>Leucaena leucocephala</i>	1,6	Bento et al., 2013

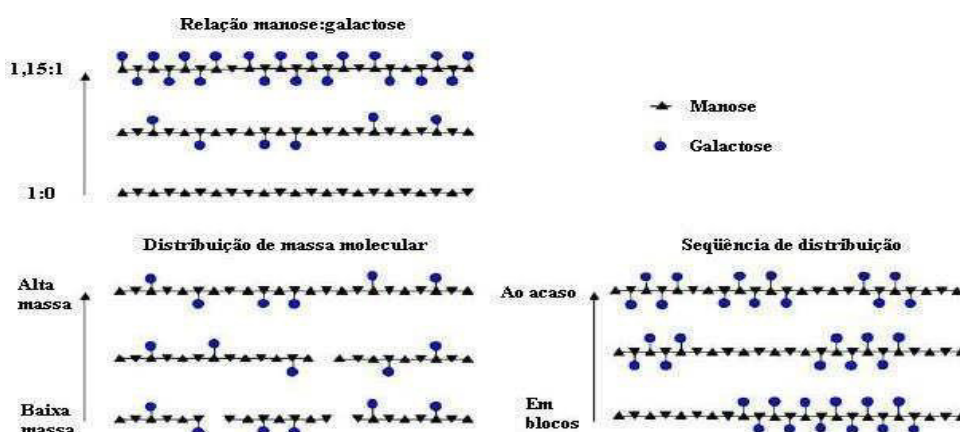
Fonte: Elaborada pelo autor

A melhor solubilidade é encontrada em galactomanana com razão Man:Gal 1,1, apresentando elevada substituição de galactose e uma maior solubilidade em água fria. Em galactomananas cuja razão Man:Gal está acima de 1,4, a solubilidade é facilitada pelo aumento da temperatura. Apesar de galactomananas com elevado teor de resíduos de Gal na sua estrutura serem facilmente solúveis em água, estas apresentam baixa tendência para formar géis e uma relativa possibilidade de interação com outros polissacarídeos (PRAJAPATI et al., 2013; CERQUEIRA et al., 2009; SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).

Apesar da razão Man:Gal refletir na solubilidade das galactomananas, esta não representa o único fator a influenciar as propriedades funcionais desses polímeros, a massa molar e a distribuição sequencial dos resíduos galactopiranosil ao longo da cadeia principal, são também importantes (AZERO; ANDRADE, 1999). A Figura 3 apresenta de maneira esquemática, a seqüência de distribuição das unidades de D-galactose ao longo da cadeia de manose, a influência que o tamanho da cadeia causa na massa molecular do polímero e a seqüência de distribuição das unidades de galactose ao longo da cadeia de manose.

Segundo Panegassi (2000), tais polissacarídeos são fontes de estudos, seja do ponto de vista biológico ou comercial, pois são capazes de produzir soluções aquosas de viscosidade elevada, o que as torna comercialmente úteis, principalmente como espessantes de sistemas aquosos.

Figura 3 – Composição, distribuição e seqüência da distribuição das unidades de D-galactose das galactomananas



Fonte: POLLARD; FISCHER (2006) In: SALVALLAGIO (2010)

Propriedades como a capacidade de formar gel, controlar a atividade de água de um sistema, estabilizar soluções e dispersões aquosas e interação com outras moléculas, fazem das galactomananas biopolímeros amplamente empregados nas indústrias farmacêuticas, têxtil, cosmética, de papel e alimentícia (DOUIARE; NORTON, 2013; SILVEIRA; BRESOLIN, 2011; FERNANDES 2004; SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005; NAKASHIMA; SERRA, 2004). Na área da saúde, sua utilização tem sido associada ao controle do peso e efeito hipolipidêmico em ensaios clínicos, tendo seus efeitos associados à redução das calorias ingeridas e consumo alimentar (RAMULU, GIRIDHARAN, UDAYASEKHARARAO, 2011; MATHERN et al., 2009; HANNAN et al., 2007).

As principais galactomananas utilizadas comercialmente em alimentos e produtos não alimentícios são goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus* (L.)Taub.), goma tara (*Caesalpinia spinosa* (MOLINA) Kuntze), alfarroba (*Ceratonia siliqua* L.) (Cerqueira et al., 2009) e fenogrego (*Trigonella foenum graecum* L.) (PRAJAPATI et al., 2013). No entanto, novas fontes deste biopolímero são exigidas em todo mundo, o que justifica a busca constante de fontes renováveis de galactomananas com sua caracterização bem definida para futuras aplicações biotecnológicas, a exemplo dos estudos com galactomananas de sementes de *Dimorphandra gardineriana* (CUNHA et al., 2009), *Prosopis rusciflora* Griseb. (BUSCH, et al., 2015), *Caesalpinia pulcherrima* L. Sw. (BURITI et al., 2014; CERQUEIRA et al., 2009) *Adenanthera pavonina* L., *Gleditsia triacanthos* L. , *Sophora japônica* L. (CERQUEIRA et al., 2009), *Cassia grandis* (ALBUQUERQUE et al., 2014; SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005) e *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (NWOKOCHA; WILLIAMS, 2012; VERMA; RAZDAN, 2002)

2.5 *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit (leucaena) é uma árvore de médio porte que pertence à família Fabaceae e subfamília Mimosoidaeae. Está entre as espécies de leguminosas de rápido crescimento, fixadoras de nitrogênio, que têm despontado como alternativa promissora para a recuperação da cobertura vegetal e reabilitação de áreas devastadas (COSTA; DURIGAN, 2010). A planta cresce até uma altura média de 20 m e

possui vagens planas que podem conter de 20-30 sementes, com tamanho de aproximadamente 0,7 cm ao longo do seu eixo principal (Figura 4).

Figura 4: Imagem de partes da espécie *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit



Fonte: Elaborada pelo autor

Trata-se de uma espécie nativa da América, com ampla disseminação na África e agora tem se naturalizado em muitas localidades tropicais e sub-tropicais, a exemplo do Brasil (FERREIRA et al., 2016. NEHID et al., 2014; NWOKOCHA; WILLIAMS, 2012).

Tem sido utilizada freqüentemente em sistemas de reflorestamento e forragem para ruminante pelo seu elevado teor protéico (VIJAY, GUPTA, MISHRA, 2016; GIANG; WANAPAT, PHESATCHA; KANG, 2016). No entanto, estudos apontam ainda aplicações da leucaena na indústria farmacêutica como agentes emulsificantes e de suspensão, além de atividade anti-inflamatória, hipoglicemiante e aglutinante (PRAJAPATI et al., 2013; SYAMSUDIN et al., 2010; SOUSA et al., 2005; DEODHAR; PARADKAR; PUROHIT, 1998).

Na alimentação humana, leucaena é consumida na América Central, Indonésia e Tailândia principalmente na sua forma processada. As sementes são fermentadas e consumidas como brotos (DE ALMEIDA et al., 2015; MEENA DEVI; ARIHARAN; NAGENDRA PRASAD, 2013).

Além de servir como alimento, suas sementes apresentam-se como fonte em potencial de galactomananas, em quantidade que varia de 20 a 25%. localizados principalmente no endosperma (SORIANO et al., 2011). Variações no rendimento do endosperma em relação ao peso total das sementes podem estar associadas a fatores climáticos (SORIANO et al., 2011) e a composição da galactomanana obtida por isolamento desta fração pode refletir o grau de maturação das sementes, o local do cultivo e as diferenças no processo de extração e purificação (SORIANO et al., 2011; CERQUEIRA et al., 2009). Nesse sentido, razão Man:Gal para *L. leucocephala* de 1,6:1 foi apresentada por Bento et al., (2013) e Lombardi (2003) e para a espécie *L. galauca*, Srivastava e Kapoor (2005) encontraram uma razão de 1,33:1.

Considerando a ampla aplicação das galactomananas na indústria e os seus efeitos já estabelecidos na medicina, além da disponibilidade da espécie de *Leucaena leucephala* na região do Nordeste, especificamente na região do Maranhão, este estudo teve por finalidade, caracterizar a galactomanana obtida de sementes de *L. leucocephala* segundo parâmetros físico-químicos, além de avaliar seus efeitos no controle da obesidade em ensaios pré-clínicos, bem como sua aplicação na elaboração de produtos alimentícios.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar a galactomanana de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit obtida por extração manual do endosperma e avaliar seu efeito no controle da obesidade em ensaios pré-clínicos em ratos, bem como sua aplicação na elaboração de um produto alimentício.

Específicos

CAPITULO I

- Caracterizar as sementes *Leucaena leucocephala* segundo parâmetros físico-químicos;
- Analisar as características físico-químicas e propriedades reológicas da galactomanana de sementes de *L. leucocephala*.
- Apresentar aspectos microestruturais da superfície da galactomanana de *L. leucocephala*.

CAPITULO II

- Avaliar o efeito da dieta hipercalórica no modelo de indução da obesidade;
- Avaliar os efeitos da galactomanana de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit no controle de parâmetros clínicos da obesidade em ensaios pré-clínicos *in vivo*;
- Elucidar possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-obesogênica.

CAPÍTULO III

- Elaborar um produto alimentício análogo à carne, tendo o gel da galactomanana de *Leucaena leucocephala* como ingrediente na formulação.

Capítulo I

4 CAPÍTULO I

Artigo submetido ao periódico “*Food Hydrocolloids*”

Fator de Impacto 3.85

Qualis – A2 (Biotecnologia 2015)

“Physicochemical and structural characterization of galactomannan seeds of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit”

Physicochemical and structural characterization of galactomannan seeds of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Kátia Danielle Araújo Lourenço Viana^a, Danielle Gomes Cassias Rodrigues^b, Thiago Palhares Farias^c, Eurípedes Gomes Oliveira^d, Joana Léa Meira Silveira^e, Shayla Fernanda Barbieri^f, Adeilton Pereira Maciel^g, Ivone Garros Rosa^h, Marilene Oliveira da Rocha Borges^{i*}

^{a*} *Physiological Sciences Department, Federal University of Maranhão, CEP 65080-040, São Luís - MA, Brazil. E-mail: katnutri@hotmail.com*

^b *Physiological Sciences Department, Federal University of Maranhão, CEP 65080-040, São Luís - MA, Brazil. E-mail: danicassias@yahoo.com.br*

^c *Department of Production, Federal Institute of Education, Science and Technology of Maranhão, São Luís/Maracanã, CEP 65095460, São Luís - MA, Brazil. E-mail: thiagopalhares@ifma.edu.br*

^d *Pathology Department, Federal University of Maranhão, UFMA, CEP 65080-040, São Luís - MA, Brazil. E-mail: egomesoliveira@hotmail.com*

^e *Biochemistry and Molecular Biology Department, Federal University of Paraná, CEP 81.531-980, Curitiba-PR, Brazil. E-mail: jlms12@yahoo.com*

^f *Biochemistry and Molecular Biology Department, Federal University of Paraná, CEP 81.531-980, Curitiba-PR, Brazil. E-mail: shayla_fe@yahoo.com.br*

^g *Chemistry Department, Federal University of Maranhão, CEP 65080-040, São Luís MA, Brazil. E-mail: apm.ufma@gmail.com*

^h *Pathology Department, Federal University of Maranhão, CEP 65080-040, São Luís - MA, Brazil. E-mail: ivonegarros@yahoo.com.br*

^{i*} *Physiological Sciences Department, Federal University of Maranhão, CEP 65080-040, São Luís - MA, Brazil. E-mail: morborges@yahoo.com.br (corresponding author).*

1 Highlights

- 2 * For the first time, the galactomannan structure of *L. leucocephala* was presented by
- 3 Scanning Electron Microscopy
- 4 * *L. leucocephala* presented galactomannan with Man: Gal ratio of 1.5.
- 5 * *L. leucocephala* galatomannan showed to be homogeneous with high molar mass
- 6 * *L. leucocephala* galactomannan demonstrated physical-chemical and structural
- 7 characteristics similar to guar gum

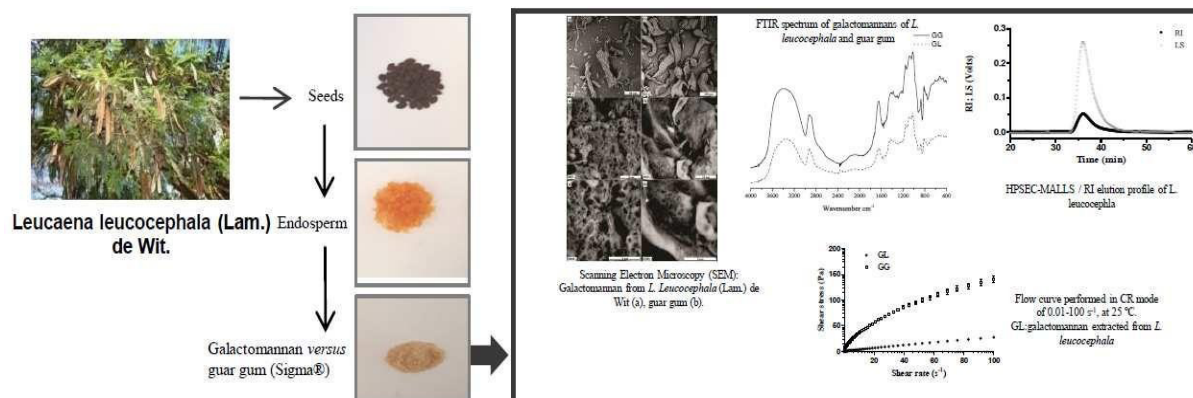
9 Abstract

10 The objective of this research was to characterize the galactomannan obtained from *Leucaena*
 11 *leucocephala* (Lam.) de Wit seeds according to physical-chemical and structural parameters.
 12 Galactomannan was obtained from the endosperm of mature seeds, dissolving in water,
 13 filtration and precipitation in ethanol. The yield of galactomannan was 8.8% relative to the
 14 weight of the seed. The water holding capacities (70.8 g H₂O/g polysaccharide) and oil (0.8 g
 15 oil/g polysaccharide) were similar to guar gum (standard). Scanning electron microscopy
 16 (SEM) revealed a polymer with an intense degree of surface porosity, with the elements:
 17 oxygen (54.9%), carbon (38.3%) and nitrogen (6.8%) as dry matter composition by energy
 18 dispersive X-rays analysis (EDS). The monosaccharide composition presented mannose
 19 (59.44%) and galactose (39.60%) as major components and Man:Gal ratio of 1.5. Fourier
 20 transform infra-red spectroscopy analysis suggests, from the spectra obtained, a crystalline
 21 structure essentially formed by pyranoside rings of galactosyl and mannosyl residues. The *L.*
 22 *leucocephala* (GL) galatomannan was homogeneous with a high molar mass (M_w) (8.51x10⁵
 23 g mol⁻¹). The apparent viscosity of GL in 5% aqueous solution was lower than guar gum
 24 (standard), however, the fluid presented a non-Newtonian and pseudoplastic behavior, similar
 25 to that presented by the standard guar gum. GL has physical and chemical characteristics
 26 similar to guar gum (standard), which makes this polymer an important adjuvant in the use of
 27 galactomannans in biotechnological and industrial processes.

29 **Key words:** Polysaccharides, Gum, Galactomannans, *Leucaena leucocephala*

30

31 Graphical Abstract



33 1 Introduction

Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit (Leucaena) belongs to the legume family Fabaceae and subfamily Mimosoidaeae. Characterized as a medium-sized, fast-growing tree with fruits that present as typical pods, with about 20-30 seeds of approximately 0.7 cm long along its main axis (Meena Devi, Ariharan & Nagendra Prasad, 2013; Nwokocha & Williams, 2012). It is a native species of America, with widespread distribution in Africa, although its cultivation has become common in many parts of the world and its sub-spontaneous dissemination in some regions of Brazil (Costa & Durigan, 2010).

Although it is frequently used in reforestation systems (Vijay, Gupta, & Mishra, 2016; Gupta, & Mishra, 2016) and as feed for ruminants due to their high protein content (Giang et al., 2016), their seeds are sources of water soluble polysaccharides, among them galactomannans (Bento et al., 2013).

Galactomannans are polysaccharides found in nature and are present in the plant seed endosperm ((Busch, Kolender, Santagapita, & Buera, 2015; Albuquerque et al., 2014; Prajapati, Jani, Moradiya, Randeria, et al., 2013) mainly legume seeds (Liyanage, Abidi, Auld & Moussa, 2015; Bento, et al., 2013). Chemically they are polysaccharides with a typical structure consisting of a main chain with β -D-mannose residues bound by 1 $\rightarrow$ 4 oxygen bridges, with α -D-galactose residues bound to the main chain by type 1 $\rightarrow$ 6 oxygen bonds (Salvalaggio, Freitas, Franquetto, Koop, & Silveira, 2015; Freitas, Franquetto, Koop, & Silveira, 2015; Liyanage et al., 2015).

These polymers extracted from different species may have functional properties that are related to structural characteristics, molar mass, mannose:galactose ratio (Ali Razavi, Alghooneh, Behrouzian, & Cui, 2016) and their variations influence solubility, thermal stability and rheological properties of gum (Liyanage et al., 2015)

Properties such as the ability to gel, control the water activity of a system, stabilize aqueous solutions and dispersions, and interact with other molecules make the biopolymers galactomannans widely used in pharmaceutical industries (Thombare, Jha, Mishra, & Siddiqui, 2016; de Almeida et al., 2015; Srivastava & Kapoor, 2005), textile, paper (Mudgil, Barak, & Khatkar, 2014) and food (Thombare et al., 2016). In health, its use has been associated with weight control and hypolipidemic effect in clinical trials (Ramulu, Giridharan & Udayasekhararao, 2011; Hannan et al., 2007), with the main mechanisms of action being the reduction of ingested calories and food consumption (Mathern, Raatz, Thomas, & Slavin, 2009).

The main galactomannans used commercially in food and non-food products are guar gum (*Cyamopsis tetragonolobus* L. (Taub.), tara gum (*Caesalpinia spinosa* (MOLINA) Kuntze) and carob (*Ceratonia siliqua* L.) (Cerqueira et al., 2009). However, studies with galactomannans of legume seeds such as *Dimorphandra gardineriana* (Cunha et al., 2009), *Prosopis rusciflora* Griseb. (Cerqueira et al., 2009), *Adenanthera pavonina* L., *Gleditsia triacanthos* L., *Sophora japonica* (Cerqueira et al., 2009), *Caesalpinia pulcherrima* L. Sw., *Cassia grandis* (Albuquerque et al., 2014) and *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit (Nwokocha & Williams, 2012; Verma & Razdan, 2002) point to the need for renewable sources of this polymer and its potential in the development of materials for food and non-food industries (Prajapati et al., 2013).

In this study, galactomannan extracted from seeds of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit obtained in the northern region of the state of Maranhão-Brazil, was characterized according to physical-chemical and structural parameters.

82 2 Materials and Methods

83 2.1 Seed collection and characterization

84 *L. leucocephala* seeds were collected from individuals of the species found in the
85 University City of the Federal University of Maranhão, São Luis - MA, from august to
86 december in the years 2014 and 2015. The seeds were removed from the pods and stocked at
87 room temperature until use.

88 Moisture content and total ash of the seeds were determined in addition to the nitrogen
89 contents by the micro-Kjeldahl method, using the conversion factor of 5.87 and lipids by the
90 Soxhlet method. Total carbohydrates were determined by a difference of 100% in relation to
91 the other fractions. Total sugars in glucose have also been determined (Instituto Adolfo Lutz,
92 2008).

93 For the physical characterization of the seeds, aspects such as length, width, thickness
94 and weight (in 10 sub-samples of 100 seeds) were observed, using Mitutoyo® manual caliper
95 and analytical balance.

96 Seed endosperm was separated according to protocol reported by Cunha et al.,
97 (2009), with modifications. Briefly, *L. leucocephala* seeds (50 g) were heat treated in water at
98 100 °C for 20 minutes, then hydrated in distilled water for 24 hours at 12 ° C and the
99 endosperm removed manually, separating it from the other parts of the seed

100

101 2.2 Isolation of galactomannan

102 The obtained endosperm was suspended in water at the ratio of 1:26 (m/v) and
103 homogenized in industrial blender for ten minutes until a viscous solution was formed, which
104 was filtered through a nylon cloth. The polysaccharide was obtained by precipitation in 92.8%
105 (v/v) ethanol in a 2:1 ratio and then washed with acetone p.a. to remove excess water. The
106 solid obtained was dried by hot (~ 60 ° C) and pulverized to a powder.

107

108

109

110

2.3 Characterization of Galactomannan

2.3.1 Water Holding Capacity (WHC) and Oil Holding Capacity (OHC)

The water holding capacity of the galactomannan studied was determined by dissolving 10 mg of the sample in 1.5 mL of distilled water according to the previously described methodology by Jeddou et al., (2016). The tube was preweighed and the total weight measured. WHC was calculated using the formula: $\text{WHC (g H}_2\text{O/g polysaccharide) = [(hydrated residue-dry residue)/dry residue]}$.

The oil holding capacity (OHC) was determined after the complete homogenization of 0.5 g of sample in 3 mL of corn oil, this suspension being allowed to stand for 30 minutes. After centrifugation at 3000 rpm for 25 min, the supernatant was measured and the percentage of fat absorbed was expressed as the amount of retained corn oil per g sample. Guar gum (Sigma®) was used as the analytical standard.

2.3.2 Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy Dispersive X-rays Analysis (EDS)

For SEM analyze, the polysaccharides were observed in a Phenom World scanning electron microscope, model Pro-X. Were analysed the surfaces of the galactomannan studied and the standard polysaccharide guar gum (Sigma®).

2.3.3 Infra-red spectroscopy analysis (FTIR)

The functional groups were analyzed by Fourier Transform infra-red (FTIR) spectroscopy using the Prestige-21 - Shimadzu® IR equipment, with a spectral range of 4000-400 cm^{-1} and a resolution of 4 cm^{-1} , using the method of tableting with KBr (potassium bromide).

2.3.4 Monosaccharide composition analysis

The monosaccharide composition of the polymers was determined by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS) after total acid hydrolysis (2M TFA at 100 ° C for 8 h), reduction with sodium borohydride (NaBH_4) and acetylation with acetic anhydride pyridine (1:1 v/v , 1 ml) at 100 ° C for 30 minutes. A Varian® gas chromatograph model 2000R, DB-225 capillary column (30 m x 0.25 mm internal diameter) and helium gas were used as the flow gas of 2 mL/min. The chromatograph was maintained at 50 ° C during the injection for 1 minute and programmed for temperature increase at 40 ° C/min to 220 ° C and kept constant. Monomers were identified by their retention times compared to standards.

2.3.5 Analysis of Homogeneity and Molar Mass (M_w)

The homogeneity and the weight-average molar mass (M_w) of the galactomannan samples were analyzed by HPSEC-MALLS /RI - Multidetector coupled steric exclusion chromatography: multi-angle laser scattering (DSP-F, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) and refractive index (Waters 2410, Milford, MA, USA). For the analysis, 1 mg of sample was solubilized in sodium nitrite (NaNO_2) 0.1 mol L⁻¹ containing sodium azide (NaN_3) 0.2 g L⁻¹. After, the samples were filtered through a cellulose acetate membrane with a pore size of 0.22 µm. Then, the samples were injected into a Waters high pressure steric exclusion chromatograph (HPSEC) with set of 200, 500, 250 and 120 series connected ultrahydrogen gel permeation columns with exclusion limits of 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 and 5×10^3 g mol⁻¹, respectively. Data analysis was done using ASTRA software, version 4.70.07 (Wyatt Technology - WYATT, 1993).

2.3.6 Characterization of rheological properties

The rheological behavior of the galactomannan samples was analyzed using a HAAKE MARS II rheometer (Thermo Scientific) equipped with Peltier system and thermo-circulating bath (DC5-HAAKE K15) for temperature control. For the analysis, the plate measuring system with the C60 / 2° TiL sensor was used. Samples remained standing for 5 minutes prior

to initiation of measurements. The analyzes were performed in duplicate and the software used to evaluate the data obtained was HAAKERheo Win Software (version 4.30.0030). The galactomannan samples (GL and GG) were evaluated for their flow behavior and viscosity in continuous shear, both at 5% concentration. The determinations were performed at shear rates ranging from 0.01s^{-1} to 100s^{-1} at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the range of 300 s.

Statistical analysis was carried out using the GraphPad Prism version 7.0 software. Data were presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) and groups were compared using t-Student test, considering $p<0.05$ as statistical significance.

3. Results and Discussion

3.1 Characterization of *L. leucocephala* seeds

The seeds of *L. leucocephala* presented morphological characteristics with small variation in length and width (Table 1). The mean weight ($0.06 \pm 0.01\text{ g}$) was similar to that found by Nwokocha & Williams (2012) for the same plant species (0.04 g). The endosperm represented 26.1% of the total weight of the seed. The yield of the endosperm was higher than those found in the present study, and it was presented in studies using other leguminous species such as *P. rusciflora* (45%), *A. pavonina* (43.73%), *C. pulcherrima* (45.27%) (Cerqueira et al, 2009) and *C. tetragonolobus* (40%) (Sharma, Dhuldhoya, & Merchant, 2006), Dhuldhoya, & Merchant, 2006). For *L. leucocephala*, Nwokocha & Williams (2012) also found higher endosperm yield values than those presented in this study (51.1-56.5%).

Considering that the main function of the endosperm is associated with energy reserves, the low yield of this fraction in this study may be represented by the dry period in which the seeds were collected, with part of their reserves depleted by climatic factors. Soriano et al., (2011) state that changes in energy reserves as well as their composition in the seeds, may reflect the temporal variation mainly in periods of low precipitation.

Table 1

Physical characterization of seeds of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

	Mean $\pm$ SD
Length (mm)	8.30 $\pm$ 0.57
Width (mm)	5.49 $\pm$ 0.38
Thickness (mm)	1.79 $\pm$ 0.21
Weight (g)	0.06 $\pm$ 0.01
Endosperm (%)	26.1 $\pm$ 2.4

Total carbohydrates (54.83%) and crude protein (31.82%) were found as major nutritional components in the analysis of the centesimal composition of the seeds of the studied plant species (Table 2). Similarly, Meena Devi et al., (2013) showed crude protein content (46%) and total carbohydrates (45%) with higher percentages in *L. leucocephala* seed composition, in relation to the other fractions.

Table 2

Centesimal composition of the seeds of *Leucaena leucocephala* (Lam.) of Wit

Parameters	Mean $\pm$ SD
Moisture (%)	7.18 $\pm$ 0.08
Ashes (%)	3.68 $\pm$ 0.11
Crude protein (%)	31.82 $\pm$ 1.65
Total Lipids (%)	2.50 $\pm$ 0.61
Total Carbohydrates (%)	54.83 $\pm$ 2.18
Total Sugars in Glucose (%)	19.03 $\pm$ 0.17

3.2 Characterization of the Galactomannan of *L. leucocephala* (Lam.) of Wit

The results showed that the galactomannan of *L. leucocephala* (GL) presented a yield of 8.8% (Table 3), similar to that found by Nwokocha & Williams (2012) for the same plant species (9%). According to Buckeridge (2010), the average yield of galactomannan obtained from seeds of more than 30 Brazilian species is 30%, different from the results obtained in this research. Cerqueira et al. (2009) used the high temperature of the extraction process to explain the low yield of *S. japonica* galactomannan (3.33%) compared to other

species (*G. triacanthos*, *A. pavonina*, *C. pulcherrima*). In addition to the temperature, the water was also used in the first stages of the polysaccharide extraction process in this research, being later neglected, which may have influenced the low yield found for GL, given that this biopolymer assumes water soluble characteristics.

The water holding capacity (WHC) of the GL (70.82 g H₂O/g polysaccharide) showed similar behavior to that shown by guar gum (65.78 g H₂O/g polysaccharide) (Table 2). The lower WHC was submitted to *G. triacanthos* seedlings galactomannan by Sciarini, Maldonado, Ribotta, Pérez, & León, (2009) extracted by different methodologies, not exceeding 15,20g H₂O/g sample and by Chang, Cui, Roberts, Ng (2011), when studying fenugreek gum (2.7 g H₂O / g sample).

The temperature can be considered a determinant factor in the WHC of the galactomannans as stated by Mudgil et al., (2014) when studying the water retention capacity of guar gum. According to Sciarini et al. (2009), drastic conditions used to obtain hydrocolloids, such as high temperatures, can cause the chain to unfold, reducing the degree of chain-chain interaction, thus facilitating the interaction of water with the polysaccharide. However, prolonged heat may promote deleterious effects on this property (Mudgil et al., 2014).

The presence of small pores in the polymer structure and the chemical composition characterized by a high number of hydroxyl groups in the chain may also be considered determinants in WHC (Kaith, Sharma & Kalia, 2015; Mudgil et al., 2014). Thus, high temperatures, although for a short period of time, the presence of free spaces in the porous structure observed in scanning electron microscopy (SEM) (Figure 1) and the presence of hydroxyl groups (-OH) represented by the vibrational stretches in the FTIR spectrum (Figure 2), may be associated with elevated GL WRC in this study..

Table 3

Yield and water holding capacity (WHC) and oil (OHC) of the *L. leucocephala* (Lam.) de Wit galactomannan and guar gum

Parameters	GL	GG
Yield (%)	8,8 ($\pm 1,6$)	--
WHC (g H ₂ O/g de polissacaride)	70,82 ($\pm 3,75$) ^a	65,78($\pm 7,56$) ^a
OHC (g Óleo/g de polissacaride)	0,8 ($\pm 0,05$) ^a	0,5 ($\pm 0,00$) ^a

GL: galactomannan from *L. leucocephala*, GG: guar gum. ^a statistical similarity between the samples ($p > 0.05$).

The oil holding capacity (OHC) of GL was similar to GG (Table 2). Chemically, oils and fats have a hydrophilic (polar) moiety that can even act with hydroxyl groups present in the polysaccharide mesh, however, the long hydrophobic (apolar) chain of fatty acids acts as a physical barrier as Shad, Nawaz, Hussain & Yousuf (2011), which may justify low OHC values presented by GL and GG. Variations found in different polymers may be associated to the methods of obtaining the same and/or different plant species studied.

3.2.1 Scanning Electron Microscopy (SEM)

The SEM images showed irregular surface for both GL and GG, although this was morphologically more compact (Figure 1.b). The structure of the evaluated polysaccharide (GL) was more porous (Figure 1a), when compared to the more dense structure of the standard gum (GG). Porous structures containing functional groups are responsible not only for increasing the contact surface of the water with the polysaccharide but are also considered regions of interaction for external stimuli (Kaith, Sharma, & Kalia, 2015).

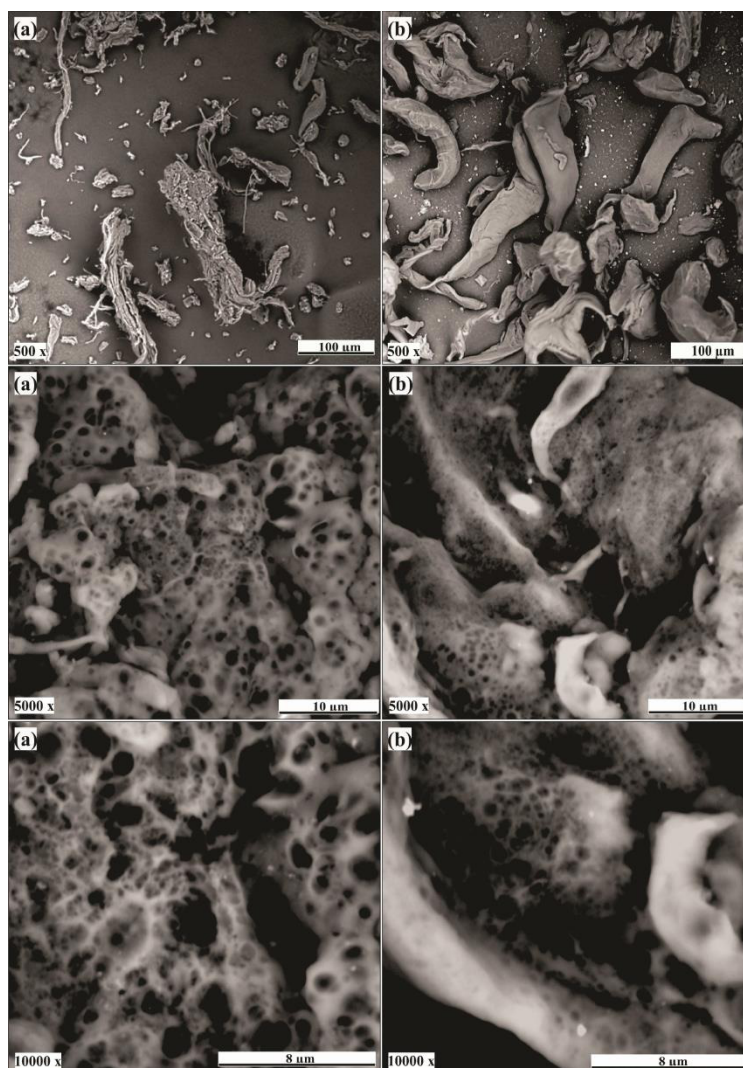


Figure 1 - Scanning Electron Microscopy (SEM): Galactomannan from *L. Leucocephala* (Lam.) de Wit (a), guar gum (b).

3.2.3 Infra-red spectroscopy analysis (FTIR)

In the FTIR analysis, both GL and GG presented spectra with typical galactomannan characteristics (Figure 2). Similar results were reported in the studies of Buriti et al. (2016) and Liyanage et al., (2015) for guar gum. The spectra showed bands with peaks at 1150 cm^{-1} , 815 cm^{-1} and 869 cm^{-1} , which may represent modes of vibrational C-O flexion present in the pyranoside ring.

Shobha, Vishukumar, Tharanathan, Koka, & Gaonkar, (2005) state that bands in the spectral region between 1200 and 800 cm^{-1} are commonly attributed to tightly bound C-C-O, C-OH and C-O-C groups. When evaluating FTIR absorption spectra in the *Cassia grandis* galactomannan study, Albuquerque et al. (2014) associated bands with peaks at 874 cm^{-1} and 814 cm^{-1} at the presence of α -bonds of D-galactopyranose units and β -bonds of D-mannopyranose units, a spectral region similar to that presented in this research.

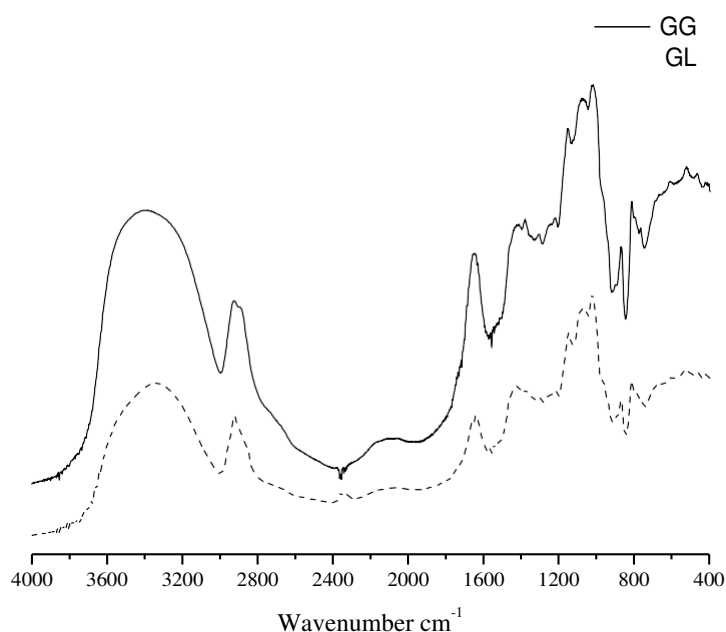


Figure 2 - FTIR spectrum of galactomannans of *L. leucocephala* (Lam.) of Wit and guar gum.

It was also found that bands with peaks at 3400 and 3339 cm^{-1} for GG and GL respectively, indicating the vibration of -OH clusters (Liu, Gu, Ofosu & Yu, 2016; Jeddou et al., 2016; Buriti et al., 2014) and 2923 cm^{-1} , which may represent stretching of the C-H group (Cerqueira et al., 2011; Shobha et al., 2005).

3.2.4 Monosaccharide Composition Analyses

The monosaccharide composition determined by GC-MS confirmed that mannose (Man) and galactose (Gal) were monosaccharides present in greater amounts in both GL and GG (Table 5). In the evaluated samples, traces of arabinose (Ara) and xylose (Xyl) were only

identified in guar gum. According to this analysis, the Man:Gal ratio between the two polymers evaluated were similar (Table 5).

Table 4

Monosaccharide composition of galactomannans of *L. leucocephala* (Lam.) de Wit and guar gum.

	Monosaccharide Composition (%)				
	Man	Gal	Ara	Xyl	Man:Gal
GL	59.44	39.60	0.97	-	1.5:1
GG	59.78	39.38	2.31	1.53	1.5:1

GL (galactomannan from *L. leucocephala*, GG (guar gum), Man (mannose), Gal (galactose) Ara(arabinose), Xyl (xylose).

The Man:Gal ratio varies considerably depending on the source of the galactomannan and can typically occur between 1.0-5.0 (Prajapati et al., 2013; Srivastava & Kapoor, 2005). Man: Gal ratio for *L. leucocephala* of 1.6:1 was presented by Bento et al., (2013) and Lombardi (2003). For the species *L. galauca*, Srivastava & Kapoor (2005), found a ratio of 1.33:1. The degree of seed maturation, cultivation site, differences in the extraction and purification process and biosynthesis of the primary galactomannan may not be the only factors to determine the Man:Gal ratio and to justify the differences found in the various sources of galactomannans described in the literature. These changes have also been attributed to the combination of enzymatic activities of galactosyl and mannosyltransferase (Cerqueira et al., 2009; Edwards, Scott, Gidley & Reid, 1992).

Monosaccharides such as Ara and Xyl found in this study were also found in non-traditional sources of galactomannans, such as *A. pavonina* (Ara-4,2% and Xyl-1,2%), *Caesalpinia pulcherrima* (Ara- and Xyl-1.2%) (Cerqueira et al, 2009) and guar gum (Ara- 1.8 to 4.4% and Xyl- 0-0.9%) (Cunha, Vieira, Arriaga, Paula & Feitosa, 2009). The presence of these components can be attributed to a more complex composition of the polysaccharide (Cerqueira et al, 2009) and/or interferents from the polymer step (Dakia, Blecker, Robert, Wathelet & Paquot, 2008).

3.2.5 Homogeneity and Molar Mass

According to the elution profile shown in Figure 3, the GL (a) and GG (b) samples were homogeneous, with a well defined peak in approximately 36 minutes, characteristic for polysaccharides, indicated by light scattering detectors and refractive index (IR). The light scattering detector at the 90 ° angle (LS) showed the presence of a group of molecules with a high molar mass at an elution time of approximately 38 min, consistent with the peak obtained by the IR detector. A peak in approximately 70 minutes, detected by IR, appears to reflect the presence of interfering samples or contaminants present in the solvent in the elution profile of GL (a) and GG (b) samples.

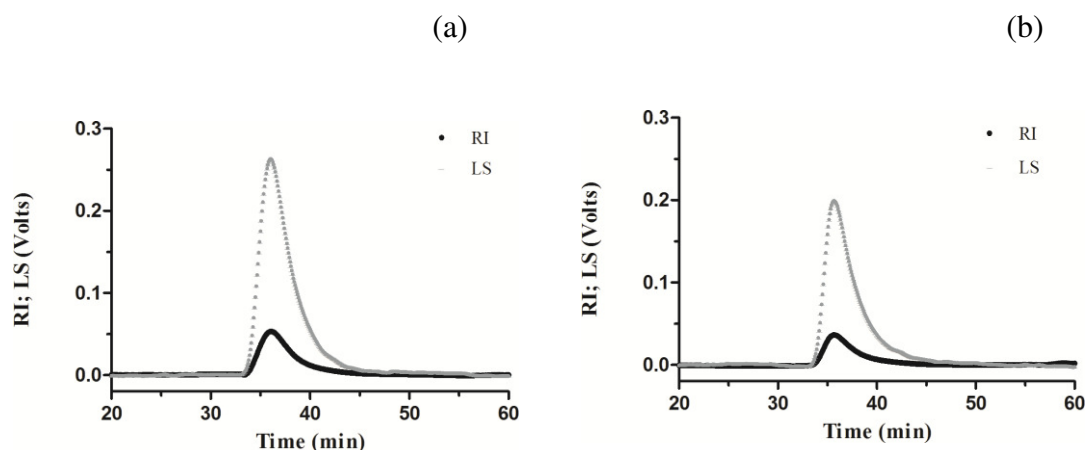


Figure 3: HPSEC-MALLS/RI elution profile of *L. leucocephala* (Lam.) de Wit. GL (a) and guar gum (b) galactomannan samples. Light Spread Detector (LS). Refractive Index Detector (RI).

The molar mass (M_w) obtained by HPSEC-MALLS/RI for GL and GG was approximately 8.51×10^5 and $10.2 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, respectively (Table 5). When evaluating molecular characteristics of *L. leucocephala* galactomannan, Nwokocha & Williams, (2012) found lower M_w ($5.44 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$). The polydispersity index (M_w/M_n) of GL was 1.09 (Table 5). Jeddou et al., (2016) state that $M_w/M_n > 1$, can demonstrate that the dispersion of the polysaccharide was not homogeneous however, in this research, the result presented by GL was similar to that presented by standard GG (1.12) and lower than those found by Nwokocha & Williams, (2012) for polysaccharide of *L. leucocephala* (1,83), de Souza, Lucyszyn, Ferraz, & Sierakowski, (2010), when evaluating polydispersity of *Caesalpinia*

ferrea var. *ferrea* (1,55) and Joshi & Kapoor, (2003), when studying *Cassia grandis* species (1,35).

Table 5

Distribution of the galactomannan molar mass of *L. leucocephala* (Lam.) of Wit (GL) and guar gum (GG)

	M_w (g mol⁻¹)	M_n (g mol⁻¹)	M_w/M_n
GL	8.51x10 ⁵	6.50x10 ⁵	1.09
GG	10.2x10 ⁵	7.94x10 ⁵	1.12

GL - Galactomannan of *L. leucocephala*. GG - guar gum

3.2.6 Rheological Properties

According to the flow and viscosity curves, the GL sample and the GG standard gum showed a non-Newtonian and pseudoplastic behavior, demonstrated by the non-proportional increase of the shear stress as a function of the shear rate (Figure 4) and by the decrease in the apparent viscosity of the galactomannan samples as a function of the shear rate (Figures 5). non-Newtonian and pseudoplastic behavior was also observed in other studies with *L. leucocephala* galactomannan (Verma & Razdan, 2002) and *Cassia grandis* (Albuquerque et al., 2014).

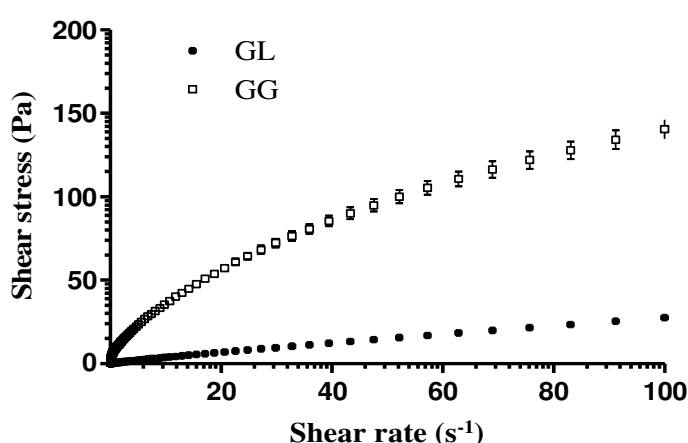


Figure 4: Flow curve performed in CR mode of 0.01-100 s⁻¹, at 25 °C. GL:galactomannan extracted from *L. leucocephala* (Lam.) de Wit. GG: commercial galactomannan guar gum.

To evaluate the profiles presented by the samples in the flow curve, the Ostwald de Waele model was used to determine the K and n parameters (Table 6) due to the better fit when compared to other rheological models. This model is determined by the mathematical equation ($\tau = K\dot{\gamma}^n$), where τ is the shear stress (Pa), K is the consistency coefficient ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (s^{-1}) e n is the flow behavior index (Rao, 2007). According to Steffe (1996), when the value of K is greater than 0 and the value of n is between $0 < n < 1$, the fluid is considered non-Newtonian and pseudoplastic. The values of K and n determined for the GL sample were 0.51 and 0.86, respectively (Table 6a).

Figure 5 shows the apparent viscosity ($\text{Pa}\cdot\text{s}$) behavior of the GL and GG galactomannan samples as a function of the shear rate. The slope of the curves indicates a decrease in viscosity with increasing shear rate, both for the GL sample and for the GG. Other studies that evaluated rheological parameters of leguminous galactomannans also observed the same behavior (Albuquerque et al., 2014; Buriti et al., 2014; Nwokocha & Williams, 2012; Cunha et al., 2009; Sciarini et al., 2009; Verma & Razdan, 2002).

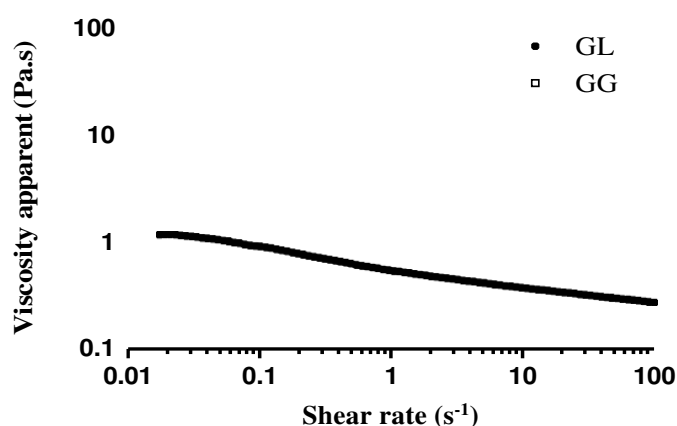


Figure 5: Viscosity curve obtained from the flow curve. **GL:** galactomannan extracted from *L. leucocephala*. **GG:** commercial galactomannan guar gum.

The apparent viscosity of GG was higher than that reported by GL (Table 6b). According to Pollard, Eder, Fischer, & Windhab (2010), the extraction conditions can result in degradation of the polymer chain inferring not only the decrease in the molar mass (M_w) but also the viscosity. In this study, high temperatures were used in the initial stages of the *L.*

leucocephala galactomannan extraction process, which may have influenced the lower molar mass (M_w) and viscosity results for the GL sample in relation to the GG sample.

In addition, the presence of metal cations was used by Lombardi (2003) and Debon & Tester, (2001) to explain the viscosity of fluids. In concentrated solutions, these can promote crosslinking between the polymer molecules making the system more rigid and resistant to shear stress (Cunha et al., 2009). According to the result presented by the EDS analysis, the element K was present in guar gum (GG), which may have contributed to a higher viscosity as a function of the shear rate in relation to GL, in the concentration of 5%.

Table 6

Rheological characteristics of the galactomannan of *L. leucocephala* (Lam.) of Wit (GL) and guar gum (GG)

(a) Parameters according to model: Ostwald de Waele: $\tau = k\dot{\gamma}^n$		
	GG	GL
Chi ²	84.28	0.07
R	0.99	1.0
K	9.40	0.51
n	0.58	0.86
(b) Aparent viscosity (Pa.s)		
Shear rate (s ⁻¹)	GG	GL
0.05	33.76	1.02
0.1	29.68	0.90
1	9.26	0.52
10	3.51	0.37
100	1.4	0.27

GL - Galactomannan from *L. leucocephala*. GG - guar gum

Variations in the galactomannan structure, particularly in the proporcinal ratio of Man:Gal residues, can also promote significant changes in viscosity. Usually, galactomannans which exhibit high numbers of Gal residues are highly water soluble and exhibit a low gel-forming ability, that is, the high number of Gal substitutions in the main chain of Man prevents intermolecular interaction (Prajapati, et al., 2013). However, galactomannans that have a lower number of substitutions in the main chain (high Man:Gal ratio) are able to interact with other polysaccharides by the provision of long blocks of mannose without substitution (Srivastava & Kapoor, 2005). In this work, although the Man: Gal ratio was

shown to be similar between the GL and GG samples, the distribution of the galactose residues in the mannose main chain may also have influenced the viscosity results presented by the evaluated polymers.

4 Conclusion

Seeds of *L. leucocephala* are sources of galactomannans with monosaccharide composition defined in mannose and galactose as major components and Man: Gal ratio of 1.5. The extraction process was able to generate a polymer with preserved water holding capacity. The images of the porous surface of the polysaccharide indicate the potential of this polymer not only for the permeation and interaction with water, but also the susceptibility to other synergistic stimuli. *L. leucocephala* (GL) galactomannan presented results for monosaccharide composition and Man:Gal ratio very similar to guar gum (standard). The GL and GG samples presented non-Newtonian and pseudoplastic behavior, however, the use of high temperatures in the initial stages of the extraction process may have influenced the decrease of M_w and apparent viscosity of GL relative to standard gum. The low amount of impurities, the behavior of galactomannan in aqueous solution to the rheological study and the Man: Gal ratio similar to guar gum, make *L. leucocephala* galactomannan an important adjuvant in biotechnological and industrial applications.

Acknowledgements

The authors thank the Federal University of Maranhão - UFMA for the availability of physical structure and equipment of their laboratories for conducting the analyzes and the Postgraduate Program in Biotechnology (RENORBIO). The authors also thank the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Federal University of Paraná for their important contribution to the analysis.

This work received financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA), process N° 01190/16 – UNIVERSAL 40/2015.

450 Referências

- 451 Albuquerque, P. B. S., Barros, W., Santos, G. R. C., Correia, M. T. S., Mourão, P. A. S.,
 452 Teixeira, J. A., & Carneiro-da-Cunha, M. G. (2014). Characterization and rheological study of
 453 the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. *Carbohydrate Polymers*, 104,
 454 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.010>
- 455 Busch, V. M., Kolender, A. A., Santagapita, P. R., & Buera, M. P. (2015). Vinal gum, a
 456 galactomannan from *Prosopis ruscifolia* seeds: Physicochemical characterization. *Food*
 457 *Hydrocolloids*, 51, 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.035>
- 458 de Almeida, R. R., Magalhães, H. S., de Souza, J. R. R., Trevisan, M. T. S., Vieira, Í. G. .,
 459 Feitosa, J. P. A., ... Ricardo, N. M. P. S. (2015). Exploring the potential of *Dimorphandra*
 460 *gardneriana* galactomannans as drug delivery systems. *Industrial Crops and Products*, 69,
 461 284–289. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.041>
- 462 Debon, S. J. J., & Tester, R. F. (2001). In vitro binding of calcium, iron and zinc by non-
 463 starch polysaccharides. *Food Chemistry*, 73(4), 401–410. [https://doi.org/10.1016/S0308-](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00312-5)
 464 8146(00)00312-5
- 465 Giang, N. T. T., Wanapat, M., Phesatcha, K., & Kang, S. (2016). Level of *Leucaena*
 466 *leucocephala* silage feeding on intake, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy
 467 steers. *Tropical Animal Health and Production*, 48(5), 1057–1064.
 468 <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1060-3>
- 469 Matsudo, V. K. R., Ferrari, G. L. de M., Araújo, T. L., Oliveira, L. C., Mire, E., Barreira, T.
 470 V., ... Katzmarzyk, P. (2016). Indicadores de nível socioeconômico, atividade física e
 471 sobrepeso/obesidade em crianças brasileiras. *Revista Paulista de Pediatria*, 34(2), 162–170.
 472 <https://doi.org/10.1016/j.rpped.2015.04.003>
- 473 Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., & Randeria, N. P. (2013). Pharmaceutical
 474 applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydrate*
 475 *Polymers*, 92(2), 1685–1699. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.021>
- 476 Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., Randeria, N. P., Nagar, B. J., Naikwadi, N. N.,
 477 & Variya, B. C. (2013). Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide.
 478 *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 83–92.
 479 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.017>
- 480 Salvalaggio, M. de O., Freitas, R. A. de, Franquetto, E. M., Koop, H. S., & Silveira, J. L. M.
 481 (2015). Influence of the extraction time on macromolecular parameters of galactomannans.
 482 *Carbohydrate Polymers*, 116, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.036>

- 483 Sciarini, L. S., Maldonado, F., Ribotta, P. D., Pérez, G. T., & León, A. E. (2009). Chemical
 484 composition and functional properties of Gleditsia triacanthos gum. *Food Hydrocolloids*,
 485 23(2), 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.02.011>
- 486 Sharma, B. R., Dhuldhoya, N. C., & Merchant, U. C. (2006). Flocculants—an Ecofriendly
 487 Approach. *Journal of Polymers and the Environment*, 14(2), 195–202.
 488 <https://doi.org/10.1007/s10924-006-0011-x>
- 489 Shobha, M., Vishukumar, A., Tharanathan, R., Koka, R., & Gaonkar, A. (2005). Modification
 490 of guar galactomannan with the aid of pectinase. *Carbohydrate Polymers*, 62(3), 267–273.
 491 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.07.031>
- 492 Soriano, D., Orozco-Segovia, A., Marquez-Guzman, J., Kitajima, K., Gamboa-de Buen, A., &
 493 Huante, P. (2011). Seed reserve composition in 19 tree species of a tropical deciduous forest
 494 in Mexico and its relationship to seed germination and seedling growth. *Annals of Botany*,
 495 107(6), 939–951. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr041>
- 496 Srivastava, M., & Kapoor, V. P. (2005). Seed Galactomannans: An Overview. *Chemistry &*
 497 *Biodiversity*, 2(3), 295–317. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200590013>
- 498 Thombare, N., Jha, U., Mishra, S., & Siddiqui, M. Z. (2016). Guar gum as a promising
 499 starting material for diverse applications: A review. *International Journal of Biological*
 500 *Macromolecules*, 88, 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.001>
- 501 Vijay, D., Gupta, S. K., & Mishra, S. M. (2016). Seed yield and quality enhancement of
 502 pollarded subabul (*Leucaena leucocephala*) by nutrient supplementation. *Agroforestry*
 503 *Systems*. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-9984-1>

504

505

Capítulo II

5 CAPÍTULO II

Artigo a ser submetido ao periódico “Physiology & Behavior”

Fator de Impacto 2,46

(Qualis 2015- Biotecnologia- B1)

**“EFEITO DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Leucaena leucocephala*
(Lam.) de Wit NO CONTROLE DA OBESIDADE EM RATOS”**

Efeito da galactomanana de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit no controle da obesidade induzida por dieta hiperlipídica em ratos

Kátia Danille Araújo Lourenço Viana^a, Ivone Garros Rosa^b, Marilene Oliveira da Rocha Borges^c

^aDepartamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Maranhão, Campus Universitário Dom Delgado, Caixa Postal 322, CEP 65080-040, São Luís – MA, Brasil. E-mail: katnutri@hotmail.com.

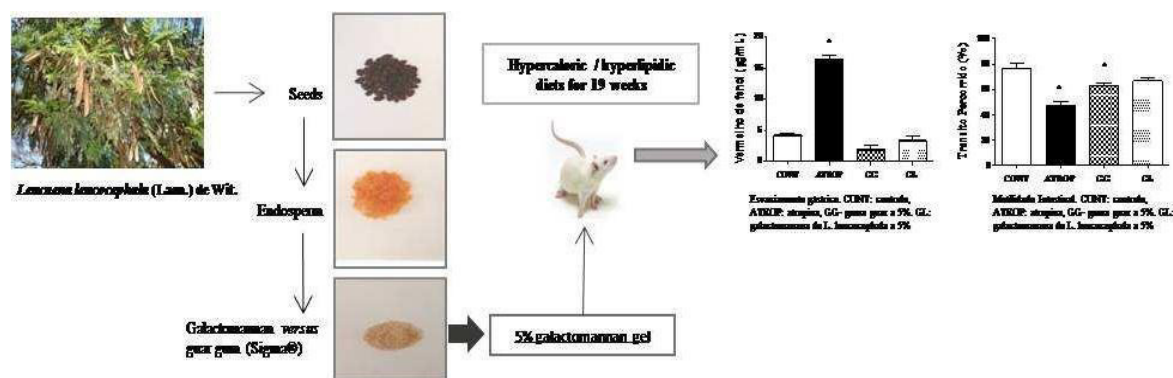
^bDepartamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão, Campus Universitário Dom Delgado, Caixa Postal 322, CEP 65080-040, São Luís – MA, Brasil. E-mail: ivonegarros@yahoo.com.br

^c ^aDepartamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Maranhão, Campus Universitário Dom Delgado, Caixa Postal 322, CEP 65080-040, São Luís – MA, Brasil. E-mail: morborges@yahoo.com.br

Destaques

- * Este estudo descreve, pela primeira vez, a atividade funcional da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* no controle da obesidade e suas complicações.
- * A galactomanana de *L. leucocephala* controlou o ganho de peso e o consumo alimentar.
- * A galactomanana de *L. leucocephala* diminuiu o acúmulo de gordura gonadal e visceral.

Graphical Abstract



Resumo

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da galactomanana extraída de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (leucaena) no controle da obesidade induzida por dieta hiperlipídica em ratos. A galactomanana foi obtida por precipitação em etanol a partir do endosperma das sementes de *L. leucocephala*. Para a indução da obesidade, ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*), fêmeas, 60 dias de idade, receberam dietas hiperlipídicas de diferentes composições, ofertadas a cada sete dias, durante o período de 18 semanas. Após a indução, os animais foram distribuídos em três grupos (n=5) e denominados de acordo com os tratamentos em: grupo controle-obeso (COB) recebeu água (0,1 mL/100 g); grupo goma guar (GG) tratado com gel de galactomanana comercial a 5% (goma guar, Sigma®) e o grupo *L. leucocephala* (GL) que recebeu gel de galactomanana a 5%, extraída das sementes de *L. leucocephala*. O grupo controle não-obeso (CNO) recebeu dieta padrão para ratos (Nuvilab®). Os tratamentos foram realizados diariamente, por via oral, durante o período de 18 semanas. Os parâmetros analisados foram: evolução da massa corporal, ingestão alimentar e calórica, parâmetros bioquímicos plasmáticos (colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos e glicemia de jejum), marcadores hepáticos (colesterol total, triglicerídeos e gordura total) e gordura corporal (retroperitonal, gonadal, visceral e adiposidade abdominal). Para a avaliação do esvaziamento gástrico e motilidade intestinal foram utilizados quatro grupos de animais (n=6): controle (CONT), atropina (ATROP), goma guar (GG) e galactomana de *L. leucocephala* (GL). A dieta hiperlipídica induziu obesidade no grupo COB.

O tratamento a longo prazo com o gel a 5% da galactomanana de *L. leucocephala* exerceu efeito protetor na evolução do peso corporal e reduziu significativamente o consumo alimentar diário e os depósitos de gordura gonadal e visceral em relação ao grupo COB. No grupo GL houve tendência de redução de triglicerídeos e colesterol total plasmáticos e lipídeos hepáticos. Os resultados obtidos indicam que a galactomanana de *L. leucocephala* na forma de gel a 5% pode ser considerada um importante adjuvante na terapêutica da obesidade e suas complicações.

Palavras – Chave: Obesidade, dieta hipercalórica, galactomanana, *Leucaena leucocephala*

1 Introdução

A obesidade configura-se como um problema nutricional, de magnitude mundial [1] e trata-se de um grupo heterogêneo de condições, com múltiplas causas [2]. A projeção mundial é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões obesos [3]. No Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 configurou a obesidade como uma epidemia crescente, afetando 14,8% dos indivíduos adultos [4], enquanto que a pesquisa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) apresentou prevalência de 17,0% de adultos obesos em 2014 [5].

De acordo com a WHO [6], a obesidade pode ser definida como um desequilíbrio energético, em que há um consumo excessivo de energia e pouco gasto das calorias ingeridas, sendo descrita pelo aumento de gordura corporal, que pode ser prejudicial à saúde. Dentre suas principais complicações estão a hipertensão arterial, hiperlipoproteinemias, doenças coronarianas, osteoarticulares, diabetes e câncer [2].

Determinantes sociais, desordens endócrinas, problemas psicológicos e fatores genéticos podem estar relacionados com a gênese da obesidade [7,8]. No entanto, muitos indícios apontam para a forte influência da dieta e do sedentarismo na prevalência desta patologia em diferentes grupos populacionais [9], uma vez que o desenvolvimento da obesidade está associado a uma dieta rica em gorduras, particularmente as de origem animal, e açúcares refinados com reduzida ingestão de carboidratos complexos e fibras [2], aliada ao declínio progressivo da atividade física [10]. Ao considerar os grupos de alimentos envolvidos na gênese desta patologia, o elevado consumo de carne vermelha e carne

processada [11], bem como bebidas açucaradas [12], podem estar associados aos efeitos deletérios do sobrepeso/obesidade.

A ingestão de alimentos ricos em fibras pode prevenir e tratar a obesidade, além de reduzir complicações associadas [13]. A estrutura, a composição química, a concentração e o peso molecular das fibras dietéticas (FDs) são fatores importantes que determinam o grau de viscosidade da fibra, influenciando no aumento da saciedade, reduzindo o apetite e a ingestão de alimentos [14,15]. As diferentes FDs são definidas por sua solubilidade, fermentabilidade e viscosidade [16].

Segundo Rao [17], as gomas também são consideradas FDs e sua viscosidade é uma característica que pode ser considerada um importante fator no controle do apetite. O retardo no esvaziamento gástrico e/ou motilidade do cólon configuram-se como mecanismos de ação na percepção da saciedade e ocorrem de maneira proporcional à viscosidade [17]. Além disso, a alta fermentabilidade desses biopolímeros está associada à produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente butiratos e proprionatos, no cólon, o que parece estimular a liberação de hormônios intestinais que influenciam não só a motilidade intestinal como também a percepção do apetite, induzindo a saciedade e conseqüente redução do consumo alimentar [18,19,20].

As Galactomananas são consideradas gomas e FDs do tipo solúveis, viscosas e altamente fermentáveis [16]. Estudos mostram que o uso de galactomananas em protocolos experimentais com humanos e animais reduzem o consumo alimentar e a ingestão energética, além de contribuir para o controle do peso corporal, perfil lipídico e acúmulo de tecido adiposo [17,21]. Tais biopolímeros encontram-se na composição da estrutura da parede celular de vegetais e são extraídas do endosperma de sementes [22,23], principalmente de leguminosas [24,25,26].

As principais galactomananas utilizadas comercialmente são: goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus* L. (Taub.)), goma tara (*Caesalpinia spinosa* (MOLINA) Kuntze) e alfarroba (*Ceratonia siliqua* L.) [26]. No entanto, estudos com galactomananas de sementes não tradicionais [22,23,26,27,28,29] apontam para a necessidade de fontes renováveis deste polímero para o uso em diferentes aplicações.

As sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit pertencente a família Fabaceae subfamília Mimosoidaeae [23], apresentam-se como fonte em potencial de galactomananas [30], usadas principalmente na indústria farmacêutica como agentes emulsificantes e de suspensão [31], além de apresentar atividades anti-inflamatória [32], hipoglicemiante [33] e aglutinante [34].

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da galactomanana extraída das sementes de *L. leucocephala* em parâmetros de obesidade, induzida por dieta hiperlipídica em ratos.

2 Material e Métodos

2.1 Isolamento da galactomanana

As sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit foram coletadas na cidade universitária da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, entre os meses de agosto a dezembro de 2014 e 2015. A espécie foi identificada e está depositada no Herbário Aprisco Viana da Universidade Federal do Ceará, sob o número 1065.

As sementes foram retiradas das vagens, estocadas em temperatura ambiente até utilização e seus endospermas foram separados segundo protocolo relatado por Cunha et al., [27] com modificações. As sementes de *L. leucocephala* (50 g) receberam tratamento térmico com água a 100 °C por 20 minutos, em seguida foram hidratadas com água destilada por 24 horas em temperatura de refrigeração (~12°C) e o endosperma removido manualmente.

O endosperma das sementes foi suspenso em água na proporção de 1:26 (m/v) e homogeneizado durante 10 minutos até a formação de uma solução viscosa que foi filtrada através de um tecido de nylon. O polissacarídeo foi obtido por precipitação em etanol 92,8° INPI (v/v) na proporção 2:1 (álcool:suspensão) e em seguida foi lavado com acetona P.A. para retirada do excesso de água. O sólido obtido foi seco em corrente de ar e pulverizado até obtenção de um pó. A galactomanana de *Cyamopsis tetragonolobus* L. (goma guar) comercial obtida junto a Sigma-Aldrich foi utilizada como goma padrão para efeito comparativo.

2.2 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*), fêmeas, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFMA. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), luminosidade (claro/escuro – 12 horas), dieta pesada três vezes por semana (a cada dois dias) e água *ad libitum* durante todo o período do estudo. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMA sob o parecer nº 23115.008080/201625.

2.2.1 Preparação da Dieta

A Dieta hiperlipídica, com diferentes composições, foi elaborada conforme o protocolo descrito por Nascimento et al., [35] com modificações. O ingrediente “biscoito de milho” foi substituído por “biscoito maisena” e a água foi adicionada em quantidade suficiente para moldagem de *pellets*. Foram utilizados como ingredientes na composição das dietas: amendoim, óleo de milho, chocolate, biscoito, batata frita, queijo ralado, leite condensado, biscoito *waffer*, macarrão instantâneo e sacarose. Após a moldagem, os *pellets* foram secos ($55,5\pm 5^{\circ}\text{C}$) e armazenados sob refrigeração até sua utilização, que ocorreu em um prazo não superior às 48 horas. A análise da composição nutricional das dietas foi realizada pelo programa Virtual Nutri Plus® enquanto que para a dieta padrão, a composição foi determinada segundo descrição do fabricante (Tabela 1).

2.2.2 Indução da Obesidade

Para a indução da obesidade, os animais receberam dieta hiperlipídica, com formulações distintas, que foram ofertadas em ciclos que variaram a cada sete dias durante 18 semanas. Após as 18 semanas de indução, os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos e denominados de acordo com os tratamentos em: grupo controle-obeso (COB) (n=5) recebeu apenas água como forma de tratamento; grupo goma guar (GG) (n=5) foi tratado com gel a 5% de galactomanana comercial (goma guar, Sigma®) e o grupo leucaena (GL) (n=5) recebeu gel a 5% de galactomanana de *L. leucocephala*. O grupo controle não-

obeso (CNO) (n=5) recebeu dieta padrão para ratos (Nuvilab®) e água. Os tratamentos foram realizados por um período de 18 semanas, totalizando 36 semanas.

Uma dose diária de 500µl de gel de galactomanana a 5% foi utilizada no tratamento dos grupos GG e GL, enquanto que os grupos CNO e COB receberam água em substituição ao gel da goma, na mesma proporção, por gavagem. A dose administrada foi determinada proporcionalmente a partir da recomendação de fibras solúveis (10g) estimada para um indivíduo adulto de aproximadamente 75 kg [35].

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas Padrão e Hiperlipídica.

Componentes	Dietas	
	Padrão (Nuvilab®)	Hiperlipídicas (Média±erro-padrão)
Proteína (%)	25,9	25,6 ±1,86
Carboidrato (%)	49,5	40,0 ±4,07
Lipídios (%)	8,1	20,9 ±3,83
Outros (%)*	16,5	13,3 ±1,36
Calorias (kcal/g)	3,6	4,6 ±0,21

* Outros: Vitaminas, Minerais, cinzas e água.

2.2.3 Evolução do peso corporal e consumo alimentar

O peso corporal (g) e o consumo alimentar (g) foram avaliados três vezes por semana. Para o cálculo da evolução do peso corporal foi utilizada a fórmula (Δ %) = $[(\text{peso final} - \text{peso inicial} / \text{peso inicial}) \times 100]$ [37]. A ingestão energética foi calculada a partir do consumo médio diário, considerando a densidade calórica da dieta ofertada.

2.2.4 – Avaliação da gordura corporal

Ao final de 18 semanas de tratamento, os animais foram pesados, eutanasiados com superdosagem de anestésicos (xilazina/cetamina), laparatomizados e tiveram os tecidos adiposos branco retroperitonal, gonadal e visceral removidos e pesados. A gordura abdominal foi determinada considerando o somatório de cada um dos depósitos de tecido adiposo e o peso corporal final dos animais.

2.2.5 Determinação dos parâmetros bioquímicos

Ao final do experimento e após a eutanásia dos animais, o sangue foi coletado em tubos heparinizados e o plasma obtido por centrifugação. As amostras de plasma foram armazenadas a -20 °C até as análises. Foram determinadas as concentrações de Colesterol total (CT), Triglicerídeos (TG) e HDL-c utilizando *kits* comerciais Labtest®, seguindo os protocolos descritos pelo fabricante. As leituras foram realizadas em um analisador semiautomatizado Bioplus-2000®. A glicemia de jejum foi determinada por meio de um glicosímetro digital Accu-Check Sensor Comfort® – Roche, Brasil, utilizando fitas reativas específicas.

2.2.6 Gordura Total e Parâmetros bioquímicos do Tecido Hepático

Para a determinação da gordura total do fígado utilizou-se protocolo previamente descrito por Freedman et al., [38]. Aproximadamente 500 mg do órgão foi pesado e homogeneizado em *mixer* juntamente com 5 ml de uma solução de clorofórmio:metanol (2:1 v/v). O homogeneizado foi mantido em repouso *overnight* (16 horas) em temperatura de refrigeração (~12°C) dentro de tubo previamente pesado, sendo em seguida filtrado. Adicionou-se salina 0,9% ao filtrado na proporção de 1:5 (filtrado:salina), seguido de repouso por 2 horas e centrifugação (1000 rpm). A fase superior foi descartada e o material seco em estufa. Os tubos foram pesados novamente e a gordura determinada pela diferença do peso final em relação ao peso inicial do fragmento do órgão.

As dosagens de Colesterol e Triglicerídeos do tecido hepático também foram determinadas. Para tanto, ressuspendeu-se a gordura seca em 1 ml de solução de Triton X-100:metanol (2:1) e determinou-se as concentrações através de *kits* comerciais Labtest®, seguindo os protocolos descritos pelo fabricante, em um analisador semiautomatizado Bioplus-2000®.

2.2.7 – Avaliação do Esvaziamento Gástrico e Trânsito Intestinal

O esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Suchitra et al. [39], com ligeiras modificações. As ratas foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos (n = 6 animais) e submetidos a um jejum de 6 h. Para o esvaziamento gástrico, os animais foram tratados por via oral (gavagem) com água (CONT), gel a 5% de goma de guar (GG) ou gel a 5% de galactomanana de *L. leucocephala* (GL) e subcutaneamente com atropina (ATROP, 3 mg/kg). Após 1 h ou 30 min dos tratamentos, cada animal recebeu por via oral 1,5 mL de solução de marcador semisólido (vermelho de fenol a 0,05% dissolvido em carboximetilcelulose a 1,5%).

Os grupos foram eutanizados com gás CO₂ 30 min após a administração do marcador. Os estômagos foram removidos, o conteúdo gástrico foi coletado e centrifugado (126×g) durante 15 minutos. Os resultados foram plotados em uma curva padrão de vermelho de fenol e expressos como a concentração (µg) de corante retida no estômago.

Após remoção dos estômagos das ratas no modelo de esvaziamento gástrico, o intestino delgado foi removido para avaliação do trânsito intestinal. Foi medido o comprimento total do intestino delgado de cada animal e a distância percorrida pela solução de vermelho de fenol (até a última porção do intestino contendo pelo menos 1 cm de marcador contínuo). Os resultados foram expressos como porcentagem de trânsito intestinal (%TI), calculada como segue: $\% \text{ TI} = \text{DP} / \text{CT} \times 100$, em que DP é a distância percorrida pelo marcador e CT é o comprimento total do intestino delgado.

2.3 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. As diferenças entre os grupos experimentais foram detectadas por meio de análise de variância unidirecional (One-way ANOVA), seguida de pós-teste Tukey, usando o *GraphPad Prism*, Inc software, versão 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

A evolução de peso corporal ($\Delta\%$) do COB na 18ª semana de tratamento mostrou-se significativamente maior em relação ao grupo CNO (11,51 vs 4,58%, $p=0,005$), refletindo o efeito das dieta hiperlipídica no aumento ponderal. O gel de galactomanana de *L. leucocephala* (GL) evitou o aumento na evolução do peso corporal dos animais, mostrando resultados inferiores para o grupo GL em relação ao grupo COB (7,57 vs 11,51%, respectivamente, $p=0,005$) (Tabela 2). A evolução de peso corporal ($\Delta\%$) em animais tratados com dieta hipercalórica e hiperlipídica foram descritos em estudos anteriores [36,40], onde os efeitos deletérios de dietas ricas em gordura, mostrando o aumento do peso corporal, têm sido muito documentados.

O principal objetivo da utilização do modelo em ciclos de dietas “peletizadas” foi aumentar os níveis de ingestão alimentar pela palatabilidade. Entretanto, os grupos experimentais que receberam dieta hiperlipídica (COB, GG e GL) apresentaram baixo consumo alimentar diário quando comparados ao grupo CNO (17,31g) (Tabela 2), sendo o menor consumo demonstrado pelo grupo GL (7,63g). Segundo Zambom et al., [37], a redução do consumo alimentar em ratos pode estar relacionado com a densidade energética da dieta hipercalórica e/ou hiperlipídica quando comparada com uma dieta padrão. No presente estudo, a densidade calórica (kcal) da dieta padrão, consumida pelo grupo CNO, foi de 3,6 kcal, enquanto que a dieta hiperlipídica apresentou média de 4,6 kcal/g (Tabela 1). Tal fato pode indicar o efeito da densidade calórica na baixa ingestão alimentar (g) dos grupos COB, GG e GL, que receberam dieta hipercalórica/hiperlipídica em relação ao grupo CNO.

A hipofagia apresentada nos grupos que receberam a dieta hipercalórica/hiperlipídica também foi observada por Nascimento et al., [35] em ratos que receberam o mesmo tipo de tratamento dietético. No estudo de Eguchi et al., [40], o aumento dos níveis séricos de leptina esteve associado a este comportamento, hormônio este conhecido por influenciar o aumento da saciedade, apresentando correlação positiva com a formação de depósitos de tecido adiposo. No entanto, o sexo e a idade do animal também são fatores que podem influenciar na ingestão alimentar de animais em experimentação submetidos a protocolos de indução da obesidade por dieta [41].

Rasoamanana et al.,[16] afirmam ainda que a viscosidade de fibras solúveis pode estar provavelmente envolvida nos parâmetros de saciedade pós-prandial, inferindo na redução da ingestão alimentar. Os principais mecanismos de ação envolvidos seriam a redução do fluxo pilórico e o aumento da retenção do conteúdo gástrico [17,21], o que poderia justificar o efeito da goma de *L. Leucocephala* no menor consumo alimentar quando comparado as demais grupos (Tabela 2).

Tabela 2

Evolução de peso corporal, consumo alimentar e ingestão energética diária de ratos *Wistar* dos grupos CNO (controle não-obeso), COB (controle obeso), GG (tratado com gel de goma guar a 5%) e GL (tratado com gel de galactomanans de *L. leucocephala* a 5%).

Parâmetros	Grupos			
	CNO	COB	GG	GL
Evolução do peso corporal ($\Delta\%$)	4,58 $\pm$ 0,63	11,51 $\pm$ 2,20 ^a	5,70 $\pm$ 2,35 ^b	7,57 $\pm$ 1,36 ^b
Consumo Alimentar (g/dia)	17,31 $\pm$ 0,46	11,79 $\pm$ 0,53 ^a	9,48 $\pm$ 0,38 ^{ab}	7,63 $\pm$ 0,43 ^{abc}
Ingestão Calórica (kcal/dia)	62,31 $\pm$ 1,65	79,63 $\pm$ 3,89 ^a	79,62 $\pm$ 8,19 ^a	83,22 $\pm$ 4,46 ^a

Valores representam a média $\pm$ erro-padrão da média (n=5).

^a- diferença estatística significativa em relação ao CNO, ^b- diferença estatística significativa em relação ao COB, ^c diferença estatística significativa em relação ao GG. One-way ANOVA, Tukey ($p < 0,05$).

Algumas galactomananas, especialmente a goma guar, desenvolvem uma alta viscosidade em soluções aquosas, mesmo em baixas concentrações, e pode influenciar na saciedade [31]. Além disso, a estrutura desses polímeros pode influenciar no processo fermentativo e resultar na produção de ácidos graxos de cadeia curta (butiratos e propionatos) que, eventualmente, estariam envolvidos na liberação de hormônios intestinais capazes de inferir na percepção do apetite [17]. Nesse sentido, tais mecanismos podem estar associados aos nossos resultados no que se refere ao baixo consumo alimentar e evolução de peso corporal apresentados pelo grupo GL.

Houve aumento do peso relativo dos tecidos adiposos brancos no grupo COB quando comparado ao CNO, influenciado pela composição nutricional das dietas ofertadas (Tabela 3). O aumento dos depósitos de tecido adiposo em animais tratados com dieta hipercalórica/hiperlipídica também foi observado em outros estudos [35,37,40,42,43,44]. Esses dados comprovam a eficiência do modelo de indução de obesidade empregado em nosso estudo, utilizando dieta hiperlipídica, na perspectiva de gerar obesidade exógena em ratos.

Tabela 3

Peso relativo (g tecido/100 g de peso corporal) dos tecidos adiposos brancos retroperitoneal, gonadal, visceral e adiposidade abdominal (%) de ratos *Wistar* dos grupos CNO (controle não-obeso), COB (controle obeso), GG (tratado com gel de goma guar a 5%) e GL (tratado com gel de galactomanans de *L. leucocephala* 5%).

Tecidos	Grupos			
	CNO	COB	GG	GL
Retroperitoneal (g/100g)	0,36 ±0,11	2,30 ±0,15 ^a	1,30 ±0,80	1,50 ±0,43
Gonadal (g/100g)	0,20 ±0,02	3,54 ±0,22 ^a	2,20 ±0,34 ^{ab}	2,20 ±0,12 ^{ab}
Visceral (g /100g)	0,28 ±0,10	2,16 ±0,14 ^a	1,46 ±0,38 ^a	1,20 ±0,26 ^{abc}
Adiposidade Abdominal (%)	0,83 ±0,23	8,06 ±0,77 ^a	5,22 ±1,57 ^a	4,37 ±1,07

Valores representam a média ± erro-padrão da médias (n=5).

^a diferença estatística significativa em relação ao CNO. ^b diferença estatística significativa em relação ao COB. ^c diferença estatística significativa em relação ao grupo GG. One-wayANOVA, Tukey ($p < 0,05$).

Além disso, o gel de galactomanana de *L. leucocephala* evitou o aumento do peso da gordura visceral (1,2% do peso corporal) e gonadal (2,2% do peso corporal) ao comparar os grupos GL com COB (Tabela 3). O controle no aumento dos compartimentos adiposos gonadal e visceral do grupo GL em relação ao grupo COB contribuiu para conter o avanço da adiposidade abdominal, embora sem significância estatística.

Hadri et al. [21] ao estudar o efeito da goma guar administrada no período pré-prandial em camundongos, observaram que este polímero controlou o aumento da adiposidade corporal dos animais estudados. A goma guar pode conter o acúmulo de gordura através de ação mecânica, diminuindo o trânsito intestinal e desencadeando sinalização associada no controle da homeostase energética ou bloqueando a disponibilidade desses nutrientes para a absorção no intestino [45,46] por meio da sua capacidade emulsificante [47]. Nesse sentido, o gel da galactomanana de *L. leucocephala* apresentou comportamento semelhante à goma guar no controle da gordura gonadal e foi mais eficiente do que esta galactomanana na redução da gordura visceral (Tabela 3).

A distribuição da gordura corporal é relevante, e especificamente a gordura visceral parece ser o elo entre o tecido adiposo e a resistência à insulina (RI), podendo trazer complicações para o quadro de obesidade e outras comorbidades associadas [48]. A proteção contra o aumento deste compartimento de tecido adiposo nesta pesquisa faz da galactomanana

de *L. leucocephala* um importante adjuvante no controle das complicações associadas à obesidade.

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos, o grupo GL apresentou concentrações mais baixas de triglicerídeos plasmáticos (31,67 mg/dl) em relação ao grupo CNO (93,00 mg/dl) (Tabela 4). Dietas hiperglicídicas estiveram associadas ao aumento de triglicerídeos plasmáticos em ratos magros e obesos no estudo de Kanazawa et al. [49]. Nesta pesquisa, a oferta de carboidratos na dieta padrão foi superior à média apresentada pela dieta hiperlipídica, podendo influenciar nos níveis de triglicerídeos mais elevados no grupo CNO.

Embora o tempo de tratamento de 18 semanas não tenha promovido redução dos parâmetros bioquímicos avaliados em relação ao grupo COB, observou-se uma tendência da galactomanana extraída de *L. leucocephala* em reduzir o colesterol total e triglicerídeos no grupo GL (54,00 e 31,67 mg/dl, respectivamente) (Tabela 4). Tal comportamento bioquímico, com tendência hipolipidêmica, pode ter sido atribuído a capacidade da galactomanana de *L. leucocephala* controlar o consumo alimentar, o ganho de peso e o acúmulo de depósitos de gordura corporal (visceral e gonadal) em relação ao grupo COB.

Tabela 4

Parâmetros bioquímicos séricos de ratos *Wistar* dos grupos CNO (controle não-obeso), COB (controle obeso), GG (tratado com gel de goma guar a 5%) e GL (tratado com gel de galactomanans de *L. leucocephala* 5%).

Parâmetros (mg/dl)	Grupos			
	CNO	COB	GG	GL
Glicose	84,40 ±5,25	89,57 ±5,24	78,00 ±5,50	81,33±7,42
Triglicerídeos	93,00 ±3,27	61,33 ±13,22	53,00 ±12,14	31,67±17,70 ^a
Colesterol Total	69,00 ±9,17	70,33 ±9,82	63,00 ±15,95	54,00±3,60
HDL-colesterol	29,00 ±8,56	43,00 ±4,16	41,67 ±17,05	33,67±3,52

Valores representam a média ± erro-padrão da médias (n=5).

^a- diferença estatística significativa em relação ao CNO. One-way ANOVA, Tukey ($p < 0,05$).

O efeito hipolipidêmico da goma guar e de galactomanana obtida de sementes de fenogreco foi confirmado por Ramulu; Giridharan & Udayasekhararao [50], que observaram redução dos níveis de triglicerídeos a partir da 3ª semana de tratamento e colesterol total apenas na 9ª semana. Hadri et al. [21] também encontraram níveis mais baixos de triglicerídeos no grupos de animais tratados com goma guar, comparado com o grupo controle, corroborando com os achados desta pesquisa.

Os mecanismos de ação das fibras solúveis sobre o controle das frações lipídicas séricas ainda não estão bem esclarecidos. Segundo Rupérez & Bravo [51], a fibra solúvel na matriz do alimento pode inferir mudança da viscosidade do meio aumentando a proteção da mucosa intestinal, diminuindo a absorção de lipídios e sequestrando gorduras, mais especificamente colesterol e ácidos biliares, eliminando-os nas fezes.

Na Tabela 5 apresentam-se os valores médios de triglicerídeos, colesterol total e gordura total do tecido hepático. O uso das galactomananas como forma de tratamento nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica resultou em tendência de redução nos parâmetros de colesterol e triglicerídeos hepáticos em relação ao grupo COB. Goma guar a 15% foi eficaz na redução dos níveis plasmáticos de colesterol total, bem como nos níveis de colesterol total e gordura total no tecido hepático no estudo de Eufrásio et al., [52]. Nesse sentido, a concentração dos géis de goma guar e galactomanana de *L. leucocephala* (5%) pode ter influenciado nos resultados apresentados pelos grupos avaliados em relação aos parâmetros bioquímicos do tecido hepático e plasmáticos que se mostraram semelhantes ao grupo COB.

Tabela 5

Valores de triglicerídios, colesterol e gordura total do tecido hepático de ratos *Wistar* dos grupos CNO (controle não-obeso), COB (controle obeso), GG (tratado com gel de goma guar a 5%) e GL (tratado com gel de galactomananas de *L. leucocephala* 5%).

Parâmetros	Grupos			
	CNO	COB	GG	GL
Triglicerídeos (mg/g)	66,40 ±6,05	94,00 ±15,28	90,50 ±4,50	62,00 ±12,58
Colesterol Total (mg/g)	34,40 ±1,36	37,67 ±4,63	33,67 ±2,02	31,67±3,28
Gordura Total (g gord/g tecido)	0,14 ±0,02	0,17 ±0,02	0,17 ±0,01	0,16 ±0,016

Valores representam a média ± erro-padrão da médias (n=5). One-way ANOVA, Tukey ($p<0,05$).

A viscosidade de biopolímeros, como as galactomananas, pode promover retardo no esvaziamento gástrico, tendo como principais mecanismos de ação a redução do fluxo pilórico e as características de digestibilidade e fermentação no cólon [16,17]. No entanto, o teste agudo de esvaziamento gástrico mostrou que tanto a goma guar quanto a galactomanana de *L. leucocephala*, não alteraram a velocidade do esvaziamento gástrico, apresentando concentração do corante vermelho de fenol ($\mu\text{g/mL}$) retido no estômago, semelhante ao grupo CNO (Figura 1a).

A viscosidade das fibras solúveis em solução pode promover retardo no esvaziamento gástrico quando ingeridas, no entanto, sua estabilidade pode ser afetada pelo pH do meio [31],

o que pode ir de encontro aos resultados apresentados pelos grupos GG e GL no esvaziamento gástrico, já que o pH ácido do estômago não favorece a estabilidade do gel. Segundo Rao [17], o efeito da goma guar no esvaziamento gástrico ainda não foi confirmado pela literatura, no entanto, foi encontrado efeito na floculação de gorduras e produção de colecistoquinina (CCK), que podem promover a demora no esvaziamento gástrico. Nesse sentido, a viscosidade pode não representar o único mecanismo de ação desses biopolímeros na terapêutica da obesidade. Este estudo apresenta os primeiros resultados na literatura sobre o efeito da galactomanana de *L. leucocephala* no esvaziamento gástrico, que mostrou comportamento semelhante a goma guar (Figura 1).

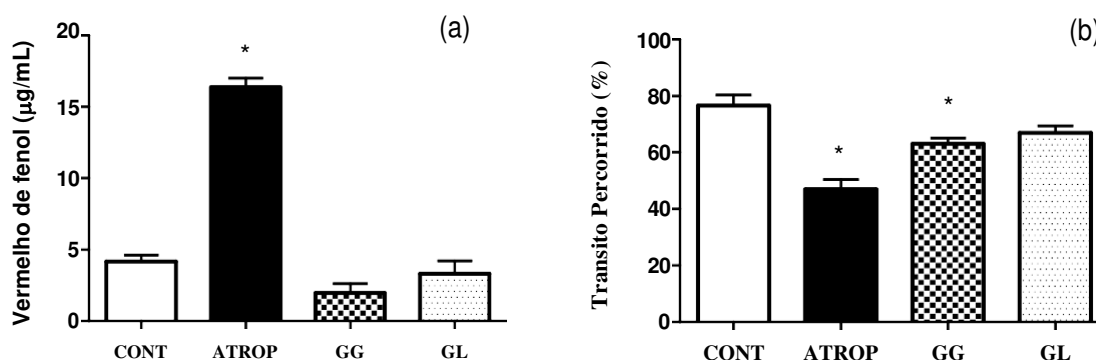


Figura 1. Esvaziamento Gástrico (a) e Trânsito Intestinal (b) dos grupos experimentais. CONT: grupo controle, ATROP: grupo atropina, GG: grupos tratados com gel de goma guar a 5%, GL: grupo tratado com gel de galactomanana de *L. leucocephala* a 5%. *significância estatística em relação ao grupo controle (CONT).

Na avaliação do trânsito intestinal, o grupo GL apresentou comportamento semelhante ao grupo CONT (66,95% vs 76,64%, respectivamente, $p = 0,568$). O percentual do trânsito percorrido pelo grupo GG (63,03%) foi significativamente inferior em relação ao grupo CONT (76,64%) e superior ao grupo tratado com atropina (ATP) (46,99%), um antiespasmódico padrão (Figura 1b).

A galactomanana de *L. leucocephala* não apresentou eficácia no controle do esvaziamento gástrico e motilidade colônica, sustentando a hipótese de que a ação mecânica não representa o mecanismo primário de ação deste polímero no controle da percepção do apetite e aumento da saciedade, com conseqüente redução do consumo alimentar e ganho

ponderal. Outras propriedades como a fermentação no cólon com formação de AGCC e a liberação de hormônios intestinais dentre eles a colecistoquinina (CKK), o GLP-1 e o peptídeo Y, que são capazes de aumentar a percepção para saciedade e inibir o consumo alimentar [17,21], além de propriedades físico-químicas como a capacidade emulsificante, parecem compor os mecanismos da ação funcional da galactomanana de *L. leucocephala* nos resultados encontrados neste estudo.

4 Conclusão

A galactomanana de *L. leucocephala*, administrada na forma de gel, reduziu a ingestão alimentar refletindo no controle da evolução do peso corporal e acúmulo de depósitos de tecidos adiposos brancos gonadal e visceral em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. A ação mecânica não foi confirmada nos testes de esvaziamento gástrico e trânsito intestinal para a galactomanana de *L. leucocephala*, sustentando a hipótese de que outras propriedades físico-químicas relativas ao gel, que não a viscosidade, e mecanismos metabólicos, estariam envolvidos em suas propriedades funcionais no controle da obesidade. Portanto, a galactomanana de *L. leucocephala* na forma de gel em tratamento a longo prazo pode ser considerado um importante adjuvante na terapêutica da obesidade e suas complicações. Entretanto, mais estudos são necessários para observarmos resultados mais significativos nos parâmetros antiobesidade apresentados pela galactomanana de *L. leucocephala* de modo a elucidar seus possíveis efeitos na liberação de hormônios intestinais ou produção de AGCC que estariam associados aos estímulos de percepção do apetite e aumento da saciedade, assim como avaliar o efeito da concentração da goma na potencialização da sua atividade funcional.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal do Maranhão - UFMA pela disponibilidade de estrutura física e equipamentos para realização das análises, em especial a toda a equipe que compõe o Laboratório de Pós-Graduação e Pesquisa em Farmacologia (LPPF).

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo em Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA), de acordo com o processo nº 01190/16 - UNIVERSAL 40/2015.

Referências

- [1] L. Lourenço; A. M. M. Rubiatti. Perfil nutricional de portadores de obesidade de uma Unidade Básica de Saúde de Ibaté-SP. *Rev. Bras. de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*. 10 (55) (2016) 25-39.
- [2] R.P.P. de Francischi et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Rev. Nutr*, 13 (1) (2000).17-28.
- [3] WHO. World Health Organization. Obesity and overweight. Fact sheet N 311. *Media Centre. Geneva, Switzerland* (2013).
- [4] Brasil. *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008 - 2009: Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil*. IBGE. Rio de Janeiro (2010).
- [5] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2015: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde (2015).
- [6] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2014: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde (2014).
- [7] D. C. Malta, M. A. S. Santos, S. S. C. A. Andrade, T. P. Oliveira, S. R. Stopa, M. M. Oliveira, P. Jaime. Tendência temporal dos indicadores de excesso de peso em adultos nas capitais brasileiras, 2006-2013. *Ciênc Saúde Coletiva*, 21(2016) 1061-1069.
- [8] S. A. Jebb. Aetiology of obesity. *British Medical Bulletin*. 53(2) (1997) 264-285.
- [9] WHO Joint; CONSULTATION, FAO Expert. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *WHO Technical* (1990).
- [10] C.A. Monteiro, L. Mondini, A.L.M. Souza, B.M. Popkin. Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil. In: C.A. MONTEIRO, *Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças*. São Paulo: Hucitec (1995) 247-255.

- [11] A.Fardet, Y.Boirie. Associations between food and beverage groups and major diet-related chronic diseases: an exhaustive review of pooled/meta-analyses and systematic reviews. *Nutrition Reviews*. 72(12) (2014) 741-762.
- [12] V. S.Malik, M. B.Schulze, F. B. Hu. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 84(2) (2006) 274-288.
- [13] W.J. Dahl,M. L. Stewart. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: health implications of dietary fiber. *J AcadNutr Diet.*; 115(11) (2015) 1861-70.
- [14] M. Kristensen, F.Savorani, S. Christensen, S.B.Engelsen, S.Bügel, S.Toubro, et al. Flaxseed dietary fibers suppress postprandial lipemia and appetite sensation in young men. *NutrMetabCardiovasc Dis.*; 23(2) (2013) 136-43.
- [15] V.Vuksan, S. Panahi, M. Lyon, A.L.Rogovik, A.L. Jenkins, L.A.Leiter. Viscosity of fiber preloads affects food intake in adolescents. *NutrMetabCardiovasc Dis*. 19 (7)(2009) 498-503.
- [16] R. Rasoamanana, P. C.Even, N. Darcel, D.Tomé, G. Fromentin. Dietary fibers reduce food intake by satiation without conditioned taste aversion in mice. *Physiology & behavior*.110 (2013) 13-19.
- [17] T. P. Rao. Role of guar fiber in appetite control. *Physiology & Behavior*. , 164:(2016) 277-283.
- [18] J.Carlson, A.Hospattankar, P. Deng, K.Swanson, J.Slavin. Prebiotic effects and fermentation kinetics of wheat dextrin and partially hydrolyzed guar gum in an in vitro batch fermentation system. *Foods*. 4(3)(2015) 349-358.
- [19] J.Noack, D.Timm, A.Hospattankar, J.Slavin.Fermentation profiles of wheat dextrin, inulin and partially hydrolyzed guar gum using an in vitro digestion pretreatment and in vitro batch fermentation system model. *Nutrient*.5(5) (2013)1500-1510.
- [20] M. Velázquez, C. Davies, R.Marett, J. L.Slavin, J. M. Feirtag. Effect of oligosaccharides and fibre substitutes on short-chain fatty acid production by human faecalmicroflora. *Anaerobe*. 6(2) (2000) 87-92.
- [21] Z.Hadri, C.Chaumontet, G.Fromentin, P. C.Even, N.Darcel, A. D.Bouras ... & R.Rasoamanana.Long term ingestion of a preload containing fructo-oligosaccharide or guar gum decreases fat mass but not food intake in mice. *Physiology & behavior*. 147 (2015)198-204.
- [22] V. M.Busch, A. A.Kolender, P. R.Santagapita, M. P.Buera.Vinal gum, a galactomannan from *Prosopis ruscifolia* seeds: Physicochemical characterization. *Food Hydrocolloids*.51 (2015) 495–502.

- [23] L. M.Nwokocha, P. A. Williams. Rheological characterization of the galactomannan from *Leucaena leucocephala* seed. *Carbohydrate Polymers*. 90(2) (2012) 833–838.
- [24] S. Liyanage, N. Abidi, D. Auld, H.Moussa. Chemical and physical characterization of galactomannan extracted from guar cultivars (*Cyamopsis tetragonolobus* L.). *Industrial Crops and Products*.74 (2015)388–396.
- [25] J. F.Bento, I.Mazzaro, L. M. de Almeida Silva, R. de Azevedo Moreira, M. L. C Ferreira, F.Reicher, C. L. de Oliveira Petkowicz. Diverse patterns of cellw all mannan/galactomannan occurrence in seeds of the Leguminosae. *Carbohydrate Polymers*. 92(1) (2013) 192–199.
- [26] M. A.Cerqueira, A. C.Pinheiro, B. W. S. Souza, Á. M. P. Lima, C. Ribeiro, C.Miranda, A. A.Vicente. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. *Carbohydrate Polymers*.75(3): (2009) 408–414.
- [27] P. L. R. Cunha, Í. G. P. Vieira, Â. M. C.Arriaga, R. C. M.de Paula, J. P. A. Feitosa. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. *Food Hydrocolloids*. 23(3) (2009).
- [28] F. C. A. Buriti, K. M. O. dos Santos, V. G.Sombra, J. S.Maciél, D. M. A.Teixeira Sá, H. O. Salles, ... A. S.Egito. Characterisation of partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fibre. *Food Hydrocolloids*.35 (2014) 512–521.
- [29] P. B. S.Albuquerque, W. Barros, G. R. C. Santos, M. T. S.Correia, P. A. S.Mourão, J. A. Teixeira, M. G. Carneiro-da-Cunha. Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. *Carbohydrate Polymers*.104 (2014) 127–134.
- [30] D.Soriano , A.Orozco-Segovia , J.Marquez-Guzman, K.Kitajima, A.Gamboa-de Buen, P.Huante. Seed reserve composition in 19 tree species of a tropical deciduous forest in Mexico and its relationship to seed germination and seedling growth. *Annals of Botany*. 107(6) (2011) 939–951.
- [31] V. D.Prajapati, G. K.Jani, N. G.Moradiya, N. P.Randeria, B. J.Nagar, N. N.Naikwadi, B. C. Variya. Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*.60 (2013)83–92.
- [32] J. C. S. Pinto, G. Remacle-Volon, C. A. Sampaio, J.Damas. Collagenase-induced oedema in the rat paw and the kinin system. *European journal of pharmacology*. 274(1) (1995) 101-107.
- [33] R.Sumarny, P.Simanjuntak. Antidiabetic activity of active fractions of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seeds in experiment model. *European Journal of Scientific Research*. 43(3) (2010) 384-391.

- [34] U. P. Deodhar, A. R. Paradkar, A. P. Purohit. Preliminary evaluation of *Leucaena leucocephala* seed gum as a tablet binder. *Drug development and industrial pharmacy*. 24(6) (1998) 577-582 .
- [35] A. F. Nascimento, M. M. Sugizaki, A. S. Leopoldo, A. P. Lima-Leopoldo, R. A. Luvizotto, C. R. Nogueira, A. C. Cicogna. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 52(6) (2008) 968-974.
- [36] F. S. R. Bernaud, T. D. C. Rodrigues. Fibra alimentar: ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. *Arquivos brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 57 (6) (2013) 397-405.
- [37] L. Zambon, F. O. Duarte, L. F. D. Freitas, F. R. R. Scarmagnani, A. Dâmaso, A. C. G. D. O. Duarte, & M. Sene-Fiorese, Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. *Rev. Nutr.* 22(5) (2009) 707-715.
- [38] B. D. Freedman, E.-J. Lee, Y. Park, and J. L. Jameson, “A Dominant Negative Peroxisome Proliferator-activated Receptor- Knock-in Mouse Exhibits Features of the Metabolic Syndrome,” *J. Biol. Chem.*, 280(17) (2005) 17118–17125.
- [39] A. Suchitra. Relative efficacy of some prokinetic drugs in morphine induced gastrointestinal transit delay in mice. *World J Gastroenterol*. 9 (4) 2003.
- [40] R. Eguchi, N. C. Cheik, L. M. Oyama, C. M. D. P. O. Nascimento, M. T. D. Mello, S. Tufik & A. R. Dâmaso. Efeitos do exercício crônico sobre a concentração circulante da leptina e grelina em ratos com obesidade induzida por dieta. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* (2008).
- [41] T. C. Rosini, A. S. R. da Silva & C. de Moraes, Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 58(3) (2012) 383-387.
- [42] A. J. D. Borba, M. G. M. Rocha, M. F. D. Silva, D. T. D. S. Tibúrcio, S. A. D. L. Pereira, L. C. D. Reis & G. Thedei Júnior. Dieta hiperlipídico-proteica utilizada para emagrecimento induz obesidade em ratos. *Rev. Nutr.* 24(4) 519-528 (2011).
- [43] A. B. Malafaia, P. A. N. Nassif, C. A. P. M. Ribas, B. L. Ariede, K. N. Sue, M. A. Cruz, Indução de obesidade com sacarose em ratos. *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.* 26(1) 17-21(2013).
- [44] L. C. Cabeço, M. Akiba, M. S. Calsa, D. R. D. S. Sartori, M. D. L. M. Vicentini-Paulino, D. F. Pinheiro. Dieta hiperlipídica com farinha de soja como fonte proteica: utilização na seleção de ratos propensos e resistentes à obesidade. *Revista de Nutrição*. 417-424 (2010).

- [45] M. Minekus., et al. "Effect of partially hydrolyzed guar gum (PHGG) on the bioaccessibility of fat and cholesterol." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* . 69.5 (2005) 932-938.
- [46] J. Santas. et al. "Partially hydrolyzed guar gums reduce dietary fatty acid and sterol absorption in guinea pigs independent of viscosity." *Lipids* 47.7 (2012) 697-705.
- [47] B.M. Prado, S.Kim, B.F. Ozen, L.J.Mauer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(2005) 2823-2829.
- [48] F.F.Ribeiro Filho, L.S. Mariosa, S.R.G. Ferreira, M.T. Zanella. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 50(2) (2006) 230-238.
- [49] M. Kanazawa, C.Y. Xue, H. Kageyama, E Suzuki, R. Ito, Y. Namba, T. Osaka, S. Kimura, S. Inaue. Effects of a high-sucrose diet on body weight, plasma triglycerides, and stress tolerance. *Nut Ver*. 61(5) 2003.
- [50] P. Ramulu, N. V.Giridharan & P.Udayasekhararao, Hypolipidemic effect of soluble dietary fiber (galactomannan) isolated from fenugreek seeds in WNIN (GR-Ob) obese rats. *Journal of Medicinal Plants Research*.5(19) (2011) 4804-4813
- [51] P. Rupérez, L. BRAVO. Oligofructanos e gomas. In: *Fibra dietética in Iberoamérica: tecnologia y salud*. São Paulo: Sarvier, (2001).61-75.
- [52] M. R. Eufrásio, M. D. F. P. Barcelos, R. V. D. Sousa, W. C. D Abreu, M. A. C.Lima, M. C. D. A. Pereira. Efeito de diferentes tipos de fibras sobre frações lipídicas do sangue e fígado de ratos wistar. *Ciência e Agrotecnologia* 33(6) (2009) 1608-1614.

Capítulo III

6 – CAPÍTULO III

Patente

“Produto Alimentício à base de proteína vegetal de castanha de caju”

Pedido de Depósito em: 16/06/2016

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

“PRODUTO ALIMENTÍCIO À BASE DE PROTEÍNA VEGETAL E CASTANHA DE CAJÚ”

I) Campo Técnico

[01] A presente invenção refere-se à formulação de hambúrguer a base de resíduos de castanha de caju e soja, com adição de galactomananas, visando o desenvolvimento de um alternativo vegetal com melhores propriedades nutricionais e sensoriais.

II) Antecedentes da Invenção

[02] O processo da industrialização tem gerado alterações no ritmo de vida das pessoas, acarretando mudanças em seus hábitos alimentares. A falta de tempo para as refeições tem levado ao aumento do consumo de “*fast-food*” e de alimentos prontos ou semiprontos (BLEIL, 1998; LIMA E OLIVEIRA, 2005; MOREIRA-ARAUJO, 2012), com baixo teor de fibras, ricos em calorias, principalmente carboidrato e gordura, e colesterol (GRAM et al., 2002; GAMBOA, 2006). Entre esses alimentos, destacam-se os hambúrgueres de carne bovina, representando os lanches preferidos de crianças, adolescentes e muito apreciados por adultos.

[03] O hambúrguer se tornou um alimento popular devido à praticidade que representa, visto que possui nutrientes que além de nutrir, saciam a fome, o que combina com o modo de vida que se observa nos grandes centros urbanos (ARISSETO, 2003).

[04] No entanto, esse tipo de preparação apresenta características nutricionais com elevados teores de gorduras e calorias podendo ser considerados fatores de risco para a obesidade e complicações relacionadas a ela, como as doenças cardiovasculares. Neste sentido uma das principais tendências da indústria de alimentos consiste no desenvolvimento de novos produtos alimentícios que apresentem os mesmos atributos dos produtos convencionais, como sabor e texturas adequados, entretanto, baixos teores de colesterol e gorduras e menor oferta calórica (DIAS, 2007; GALÁN, 2009).

[05] Na elaboração dessas novas alternativas, os alimentos funcionais se destacam por apresentarem efeitos benéficos à saúde, além do seu valor nutritivo (GALÁN, 2009).

[06] Dentre os diversos alimentos funcionais a soja tem se destacado. Muitos estudos comprovam a sua eficácia em reduzir os níveis de colesterol sanguíneo, através da ação de suas proteínas e isoflavonas (HASLER, 1998; PENHA, 2007; SILVA E MURA 2010).

[07] Apesar de o Brasil ser o segundo produtor mundial dessa leguminosa, o consumo humano da mesma ainda é restrito no país, devido aos aspectos socioculturais e hábitos alimentares da população, fato que estimula a pesquisa e desenvolvimento de produtos mais atrativos ao consumidor (RODRIGUES et al., 2009; TORREZAN et al., 2004). Com porcentagem de proteína de 40%, aproximadamente, a soja apresenta grande interesse para a alimentação como substituta da carne (WILCOX, 1985).

[08] Outro alimento com alto valor nutricional é o caju. Fruto típico do nordeste brasileiro, sendo essa região responsável por 99% da produção, contribuindo para a classificação do Brasil como o segundo produtor mundial, perdendo apenas para a Índia (MELO, et al., 1998). Segundo Garruti (2001), o caju apresenta especial interesse nutricional e econômico, pela riqueza em vitamina C de seu pseudofruto e pela qualidade do seu verdadeiro fruto, a castanha.

[09] A amêndoa da castanha de caju é um dos principais produtos de utilização do cajueiro, por apresentar grande valor nutritivo. A utilização dessa amêndoa se torna interessante na elaboração de substitutos de carne animal por ser rica em proteínas de alta qualidade, lipídios, carboidratos, fósforo e ferro, além de zinco, magnésio, fibras e gordura insaturada, que ajudam a diminuir o nível de colesterol no sangue (PAIVA; GARRUTI; SILVA NETO, 2000).

[10] Apesar de haver diferentes opções de alimentos funcionais, um dos principais desafios na elaboração das novas alternativas alimentares consiste na mimetização das características físicas bem como dos atributos sensoriais em relação aos produtos de consumo convencional. Com isso, as indústrias alimentícias estão pesquisando alguns compostos que, incorporados aos alimentos tradicionais, apresentem algum efeito benéfico para a população que o consome, garantindo qualidade igual ou semelhante a eles (GALÁN, 2009).

[11] Nesse contexto, as fibras alimentares (FA) tem apresentado grande utilidade. Estas são definidas comumente como uma classe de compostos vegetal constituída,

principalmente, de polissacarídeos e substâncias associadas, que, quando ingeridos, não sofrem hidrólise, digestão e absorção no intestino delgado de humanos (Camire *et al.*, 2001). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define a FA como “qualquer material comestível que não seja hidrolisado pelas enzimas endógenas do trato digestivo humano” (Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003) (Brasil, 2003).

[12] As galactomananas são polissacarídeos que se enquadram dentro das fibras solúveis em água, extraídas, principalmente, do endosperma de sementes de certas leguminosas (CRONQUIST, 1981; ENGLER, 1964). As galactomananas de importância comercial na indústria alimentícia são Goma Guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), goma tara (*Caesalpinia spinosa*) e goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*). No entanto, atualmente, as tendências internacionais buscam novas alternativas de fontes renováveis de gomas obtidas de sementes, a exemplo das galactomananas de *Adenanthera pavonina* L. e *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.

[13] São quimicamente constituídas por manose, que forma uma cadeia principal de manano com ligações β (1-4), ramificada com resíduos de galactose ligadas a cadeia principal com ligações α (1-6) (PANEGASSI, 2000). As galactomananas produzem soluções aquosas de viscosidade elevada, o que as torna comercialmente úteis, principalmente como espessante de sistemas aquosos, podendo ser utilizadas também como estabilizante nas indústrias de alimentos, além de contribuir com propostas terapêuticas a exemplo da redução dos níveis de colesterol (AZERO, ANDRADE, 1999; VANDAMME, DE BAETS, STEIMBUHEL, 2002; GAVA, SILVA E FRIAS, 2008). Podem ainda melhorar a textura e a aparência dos alimentos industrializados e aumentam a sua resistência a variações de temperatura (SANFORD, BAIRD, 1983; REID, EDWARDS, 1995)

[14] Devido ao crescente interesse das pessoas em aliar o seu estilo de vida a uma alimentação mais balanceada, buscou-se com esta invenção o desenvolvimento de uma alternativa de hambúrguer vegetal com melhores propriedades nutricionais e sensoriais. A elaboração de produtos vegetais como substituto da carne animal ainda constitui um desafio no que se refere à boa palatabilidade e ao seu valor nutricional. A sua inserção na alimentação das pessoas é uma tarefa difícil devido aos seus diferentes costumes e culturas, portanto, faz-se necessário a criação de meios alternativos que possibilitem o consumo dos mesmos, através da adição em produtos presentes no hábito alimentar.

[15] As patentes PI N°1000785-7 e 0402597-0 descrevem formulação e processo de hambúrgueres vegetais, respectivamente, tendo como ingredientes principais o palmito, produto de proteína vegetal e glúten. No entanto, apenas na segunda ocorreu a utilização de um polissacarídeo vegetal, a metil celulose, com o intuito de contribuir na melhora da textura da formulação bem como sua estabilidade.

[16] Diante disto, buscou-se o desenvolvimento de uma formulação análoga de um produto muito disseminado entre jovens, crianças e adultos: o hambúrguer. O objetivo desta invenção é permitir oferecer ao consumidor uma nova alternativa desse produto, a base de castanha de caju e soja, com fibras alimentares, características sensoriais aceitáveis, teor reduzido de gordura e textura adequada, quando comparado ao produto convencional, adquirida através das funções que a galactomanana possui como propriedade espessante e estabilizante.

Descrição Detalhada da Invenção

[17] A presente invenção refere-se à elaboração de um hambúrguer vegetal a base de resíduo de castanha de caju e soja, com adição de galactomananas de sementes de leguminosas, o qual apresenta a seguinte formulação:

Tabela 1 – Formulação para hambúrguer vegetal

Ingredientes	(% em peso)
Castanha de caju	20,17
Proteína Texturizada de Soja (PTS)	10,08
Soja em pó	10,08
Creme de cebola	40,35
Gel da galactomanana*	17,29
Sal	0,63
Alho desidratado	0,40
Orégano	0,28
Corante	0,28
Manjericão desidratado	0,28
Glutamato monossódico	0,09

* Espécies vegetais: *Adenanthera pavonina* L., *Leucaena leucocephala* e Goma guar

[18] Processamento do hambúrguer:

- a) Pesagem, em uma balança digital, de todos os ingredientes em temperatura ambiente.
- b) Preparo do creme de cebola conforme as explicações contidas na embalagem.
- c) A Proteína Texturizada de Soja (PTS) e a soja em pó foram incorporadas ao creme de cebola para hidratar, por aproximadamente 10 minutos.
- d) A castanha de caju foi triturada em liquidificador doméstico na presença de água na proporção de 3:2 e posteriormente filtrada para obtenção do resíduo.
- e) O resíduo da castanha de caju juntamente com o orégano, glutamato monossódico, sal, corante, manjerição e alho desidratados, foram acrescentados à mistura de soja com creme de cebola e homogeneizados manualmente.
- f) E por fim o gel da galactomanana foi acrescido. Para tanto, foram utilizadas sementes de *Adenanthera pavonina* L. e *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit selecionadas, as quais tiveram seus endospermas retirados para a extração da galactomanana. Este carboidrato, obtido em pó, por precipitação em álcool e secagem em estufa, foi solubilizado em água destilada sob agitação constante para obtenção de um gel.
- g) A massa obtida dessa mistura foi homogeneizada manualmente e o hambúrguer foi moldado, embalado em plástico filme e acondicionado em saco plástico. Foi mantido a temperatura de congelamento até a ocasião das análises.

IV) Determinação da composição nutricional

[19] Os resultados da avaliação físico-química, obtidos através das médias encontradas para composição centesimal, estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição centesimal do hambúrguer vegetal a base de PTS e castanha de caju

Análise	média ± desvio-padrão
Umidade %	51,32 ± 0,31
Cinzas %	3,25 ± 0,11
Proteínas%	18,9 ± 0,65
Lipídeos %	7,39 ± 0,87
Carboidratos%	19,4 ± 0,53

[20] Segundo a legislação vigente, os hambúrgueres devem conter 23% de gordura (máxima), 15% de proteína (mínima) (BRASIL, 2000). Assim, os lipídios e as proteínas desta invenção, estão de acordo com o preconizado pela legislação para este seguimento alimentício.

REIVINDICAÇÕES

- 1- HAMBURGUER a base de soja e condimentos (creme de cebola, sal, alho desidratado, orégano, corante, manjerição desidratado e glutamato monossódico) **caracterizado por** conter resíduo de castanha de caju e galactomanana.
- 2- HAMBURGUER, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** galactomanana ser obtida das espécies vegetais *Adenanthera pavonina* L. e *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit na forma de gel.
- 3- HAMBURGUER, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado pelo** gel de galactomanana ser utilizado em concentrações variando de 0,5 a 1,5% na formulação.

RESUMO

“HAMBÚRGUER À BASE DE RESÍDUO DE CASTANHA DE CAJU E SOJA E GALACTOMANANAS”

A presente invenção refere-se a um hambúrguer à base de resíduo da castanha de caju e soja, com adição de gel de galactomananas de *Adenanthera pavonina* L. e *Leucaena leucocephala*, além de condimentos na composição. O desenvolvimento do referido produto visa estabelecer uma alternativa de produto alimentício, análogo à carne, no entanto de origem vegetal, com melhores propriedades nutricionais e sensoriais.

Considerações Finais

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo realizou-se a caracterização físico-química e estrutural da galactomanana de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit além da avaliação do seu efeito no controle da obesidade em ratos.

Os resultados apresentados nos capítulos I e II nos permitem concluir que a galactomanana obtida do endosperma de sementes de *L. leucocephala*, coletadas na Cidade Universitária da UFMA, apresentou características físico-químicas e estruturais semelhantes à goma guar, que é uma galactomanana comercialmente utilizada. Além disso, em ensaios pré-clínicos, a galactomanana de *L. leucocephala* administrada na forma de gel, reduziu a ingestão alimentar, o que refletiu no controle da evolução do peso corporal e acúmulo de depósitos de tecidos adiposos brancos gonadal e visceral, em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica.

O capítulo III apresentou uma formulação de produto alimentício, análogo à carne, de origem vegetal, tendo o gel de galactomanana de *L. leucocephala* como ingrediente da formulação. Este gel contribuiu para gerar um produto com melhores características sensoriais e nutricionais.

Considerando que a galactomanana de *L. leucocephala* contribuiu no controle da obesidade e apresentou propriedades físico-químicas e estruturais semelhantes à goma guar, comercialmente utilizada, este polímero apresenta-se como uma fonte de fibra solúvel, podendo ser considerada um adjuvante em potencial nas aplicações biotecnológicas, em indústrias alimentícias e na área médica.

Referências

Referências

- ABETE, Itziar et al. Obesity and the metabolic syndrome: role of different dietary macronutrient distribution patterns and specific nutritional components on weight loss and maintenance. **Nutrition reviews**, v. 68, n. 4, p. 214-231, 2010.
- ALBUQUERQUE, P. B. S., BARROS, W., SANTOS, G. R. C., CORREIA, M. T. S., MOURÃO, P. A. S., TEIXEIRA, J. A., & CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.. Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. **Carbohydrate Polymers**, 104, 127–134. 2014.
- AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Extraction and characterization of the galactomannan from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima*. **Polímeros**, v. 9, n. 2, p. 54-59, 1999.
- BENTO, J. F. et al. Diverse patterns of cell wall mannan/galactomannan occurrence in seeds of the Leguminosae. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 192-199, 2013.
- BOCCHINFUSO, Gianfranco et al. Guar gum and scleroglucan interactions with borax: experimental and theoretical studies of an unexpected similarity. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 41, p. 13059-13068, 2010.
- BRASIL. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008 - 2009: Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil**. IBGE. Rio de Janeiro 2010.
- _____. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2014: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde 2014.
- _____. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2014: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde 2015.
- BURITI, F. C.A et al. Characterisation of partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 512-521, 2014.
- BUSCH, V. M. et al. Vinal gum, a galactomannan from *Prosopis ruscifolia* seeds: Physicochemical characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 495-502, 2015.
- CARLSON J., HOSPATTANKAR A., DENG P., SWANSON K., SLAVIN J. Prebiotic effects and fermentation kinetics of wheat dextrin and partially hydrolyzed guar gum in an in vitro batch fermentation system. **Foods**. 4(3) 349-358, 2015.
- CERQUEIRA, M. A. et al. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate polymers**, v. 75, n. 3, p. 408-414, 2009.

COWBURN, G., HILLSDON, M., HANKEY, C.R. Obesity management by life-style strategies. **British Medical Bulletin**, v.53, n.2, p.389-408, 1997.

CRISÓSTOMO, C.V. **Polissacarídeo endospérmico de Bauhinia pentandra: caracterização e estudo de interação com lectinas**. 2008. Tese de Doutorado.

COSTA, J. N. M. N. da, & DURIGAN, G. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae): invasora ou ruderal? **Revista Árvore**, 34(5), 825–833. 2010.

CUNHA, P.L.R.; PAULA, R.C.M. de.; FEITOSA, J.P.A. Purification of guar gum for biological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 324–331, 2007.

DEODHAR U. P., PARADKAR A. R., PUROHIT A. P. Preliminary evaluation of *Leucaena leucocephala* seed gum as a tablet binder. **Drug development and industrial pharmacy**. 24(6) 577-582, 1998.

DOUIARE, M.; NORTON, I. T. Designer colloids in structured food for the future (short survey). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 3147-3154, 2013.

EDWARDS, Mary et al. Control of mannose/galactose ratio during galactomannan formation in developing legume seeds. **Planta**, v. 187, n. 1, p. 67-74, 1992.

FARDET, A.; BOIRIE, Y. Associations between food and beverage groups and major diet-related chronic diseases: an exhaustive review of pooled/meta-analyses and systematic reviews. **Nutrition reviews**, v. 72, n. 12, p. 741-762, 2014.

FERNANDES, C. A.D et al. Novas contribuições ao estudo da galactomanana bruta extraída de sementes de *Senna spectabilis* DC. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, p. 353-358, 2004.

FLEGAL K.M; GRAUBARD, B. I. Estimates of excess deaths associated with body mass index and other anthropometric variables. **The American journal of clinical nutrition**, v. 89, n. 4, p. 1213-1219, 2009.

FRANCISCHI, R. P. P. de et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Rev. Nutr**, v. 13, n. 1, p. 17-28, 2000.

GREENWAY, F. L. Physiological adaptations to weight loss and factors favouring weight regain. **International journal of obesity**, v. 39, n. 8, p. 1188-1196, 2015.

GRUNDY, S. M. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. **The American journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 3, p. 563S-572S, 1998.

HANNAN, J. M. A. et al. Soluble dietary fibre fraction of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed improves glucose homeostasis in animal models of type 1 and type 2 diabetes by delaying carbohydrate digestion and absorption, and enhancing insulin action. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 03, p. 514-521, 2007.

- HILL, J. O. et al. Obesity and the environment: where do we go from here?. **Science**, v. 299, n. 5608, p. 853-855, 2003.
- JEBB, S. A. Aetiology of obesity. **British Medical Bulletin**, v. 53, n. 2, p. 264-285, 1997.
- KOLOTKIN, R. L. et al. Development of a brief measure to assess quality of life in obesity. **Obesity research**, v. 9, n. 2, p. 102-111, 2001.
- LEITE, L. D.; DE MEDEIROS ROCHA, E D.; BRANDÃO-NETO, J.. Obesidade: uma doença inflamatória. **Ciência & Saúde**, v. 2, n. 2, p. 85-95, 2010.
- LIYANAGE, S. et al. Chemical and physical characterization of galactomannan extracted from guar cultivars (*Cyamopsis tetragonolobus* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 388-396, 2015.
- LOTTENBERG, A. M. P. Tratamento dietético da obesidade. **Einstein (São Paulo)**, v. 4, n. supl. 1, p. S23-S28, 2006.
- LOURENÇO L.; RUBIATTI A. M. M. Perfil nutricional de portadores de obesidade de uma Unidade Básica de Saúde de Ibaté-SP. **Rev. Bras. de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v.10, n. 55, p. 25-39, 2016.
- MACHADO, S. P.; RODRIGUES, D.G.C.; VIANA, K.D.A.L.; SAMPAIO, H. A. C. Correlação entre o índice de massa corporal e indicadores de adiposidade abdominal em portadores de diabetes mellitus tipo 2. **Rev. Bras. Promoç. Saúde**. v. 25, n. 4, p. 512-20, 2012.
- MALIK, V. S.; SCHULZE, M. B.; HU, F. B. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. **The American journal of clinical nutrition**, v. 84, n. 2, p. 274-288, 2006.
- MALTA, D. C. et al. Tendência temporal dos indicadores de excesso de peso em adultos nas capitais brasileiras, 2006-2013. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 4, 2016.
- MARTINEZ, J. Alfredo. Body-weight regulation: causes of obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, n. 03, p. 337-345, 2000.
- MATHERN, J. R. et al. Effect of fenugreek fiber on satiety, blood glucose and insulin response and energy intake in obese subjects. **Phytotherapy research**, v. 23, n. 11, p. 1543-1548, 2009.
- MATSUDO, V. K. R., FERRARI, G. L. DE M., ARAÚJO, T. L., OLIVEIRA, L. C., MIRE, E., BARREIRA, T. V., ... KATZMARZYK, P. Indicadores de nível socioeconômico, atividade física e sobrepeso/obesidade em crianças brasileiras. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 34, n. 2, p. 162–170, 2016.

- MILAGRO, F. I. et al. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progresses and perspectives. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 4, p. 782-812, 2013.
- MONTEIRO C.A., MONDINI L., SOUZA, A.L.M., POPKIN B.M. Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil. In: C.A. MONTEIRO, *Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças*. São Paulo: Hucitec. 247-255, 1995.
- MONTEIRO C. A; MONDINI L.; SOUZA A.L.M., POPKIN B.M. **Da desnutrição para obesidade: a transição nutricional no Brasil**. In: Monteiro CA. *Velhos e novos males da saúde no Brasil*. 2a ed. São Paulo: Editora Hucitec, 247-255, 2000.
- MORRILL A.C.; CHINN C.D. The obesity epidemic in the United States. **J Public Health Policy** v.23, n. 3, p. 353– 66, 2004.
- NASCIMENTO A. F., SUGIZAKI M. M., LEOPOLDO A. S., LIMA-LEOPOLDO A. P., LUVIZOTTO R. A., NOGUEIRA C. R., CICOGNA A. C. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. 52(6) 968-974, 2008.
- NOACK J., TIMM D., HOSPATTANKAR A., SLAVIN J. Fermentation profiles of wheat dextrin, inulin and partially hydrolyzed guar gum using an in vitro digestion pretreatment and in vitro batch fermentation system model. **Nutrient**. 5(5)1500-1510, 2013.
- NOVAIS, M.; LEITE, F.; CARNEIRO, L. A. Hábitos de vida-Uma análise da alimentação, do sedentarismo e do tabagismo. **Instituto de estudos de saúde suplementar (IESS)**, 2011.
- NWOKOCHA, L. M.; WILLIAMS, P. A. Rheological characterization of the galactomannan from *Leucaena leucocephala* seed. **Carbohydrate polymers**, v. 90, n. 2, p. 833-838, 2012.
- PANEGASSI, V. R.; SERRA, G. E.; BUCKERIDGE, M. S. Potencial tecnológico do galactomanano de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis*) para uso na indústria de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 406-415, 2000.
- PITANGA, F. J.G.; LESSA, I. Indicadores antropométricos de obesidade como instrumento de triagem para risco coronariano elevado em adultos na cidade de Salvador-Bahia. **Arq Bras Cardiol**, v. 85, n. 1, p. 26-31, 2005.
- POLLARD, M.A.; FISCHER, P.A. Partial aqueous solubility of low-galactose-content galactomannans - What is the quantitative basis? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 184–190, 2006.
- PRAJAPATI, V.I D. et al. Galactomannan: a versatile biodegradable seed polysaccharide. **International journal of biological macromolecules**, v. 60, p. 83-92, 2013.
- RAMULU, P.; GIRIDHARAN, N. V.; UDAYASEKHARARAO, P.. Hypolipidemic effect of soluble dietary fiber (galactomannan) isolated from fenugreek seeds in WNIN (GR-Ob) obese rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 19, p. 4804-4813, 2011.

RAO T. P. Role of guar fiber in appetite control. **Physiology & Behavior**. 164. 277-283, 2016.

RASOAMANANA, R., EVEN, P. C., DARCEL, N., TOMÉ, D., & FROMENTIN, G. Dietary fibers reduce food intake by satiation without conditioned taste aversion in mice. **Physiology & behavior**. p.110:13-19. 2013.

ROSINI, T. C.; DA SILVA, A. S. R.; DE MORAES, C.. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

SALVALAGGIO, M. de O. **Galactomananas de sementes de espécies brasileiras : otimização da extração e caracterização físico-química por espalhamento de luz** . 2010. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências. Universidade Federal do Paraná, Paraná.

SBD. Manual de Nutrição : Profissional da Saúde. Departamento de Nutrição e Metabologia. Sociedade Brasileira de Diabetes . São Paulo, 2009

SILVEIRA, J. L. M.; BRESOLIN, T. M. B. Pharmaceutical use of galactomannans. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 292-299, 2011.

SOLAS, M. et al. Precision Obesity Treatments Including Pharmacogenetic and Nutrigenetic Approaches. **Trends in pharmacological sciences**, 2016.

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V.P. Seed galactomannans: an overview. **Chemistry and Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 295-317, 2005.

STONY BROOK UNIVERSITY (SBU). **Dietary treatment of obesity : A Systematic Review**. 2013

STUNKARD, A. J.; WADDEN, T. A. Psychological aspects of severe obesity. **The American journal of clinical nutrition**, v. 55, n. 2, p. 524S-532S, 1992.

SUEZ, Jotham *et al.* Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. **Nature**, v. 514, n. 7521, p. 181-186, 2014.

TAYLOR, A. E. *et al.* Comparison of the associations of body mass index and measures of central adiposity and fat mass with coronary heart disease, diabetes, and all-cause mortality: a study using data from 4 UK cohorts. **The American journal of clinical nutrition**, v. 91, n. 3, p. 547-556, 2010.

TSCHÖP, M.; HEIMAN, M. L. Rodent obesity models: an overview. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes**, v. 109, n. 06, p. 307-319, 2001.

VELÁZQUEZ M., DAVIES C., MARETT R., SLAVIN J. L., FEIRTAG J. M. Effect of oligosaccharides and fibre substitutes on short-chain fatty acid production by human faecal microflora. **Anaerobe**. 6(2) 87-92. 2000.

VENDRUSCOLO, C. W. **Xanthan and galactomanann from seeds of m. scabrella as hydrophylic matrices of theophylline**. 2005. 112 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Substâncias Bioativas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

VERMA, P. R. P.; RAZDAN, B.. Studies on Leucaena leucocephala seed gum: rheological properties. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 61, n. 6, p. 437-443, 2002.

ZAMBON L., DUARTE F. O., FREITAS L. F. D., SCARMAGNANI F. R. R., DÂMASO A. , DUARTE, A. C. G. D. O., & SENE-FIORESE M. Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. **Rev. Nutr.** 22(5) 707-715. 2009.

ZINMAN, Bernard et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 22, p. 2117-2128, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. Fact sheet N 311. **WHO Media Centre. Geneva, Switzerland**, 2013.

_____. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation presented at: the World Health Organization; June3-5, 1997; Geneva, Switzerland. **Geneva, Switzerland: WHO**, 1997.

_____. Joint; CONSULTATION, FAO Expert. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. **WHO Technical**, 1990.

Anexos

ANEXO A- Cópia do comprovante do pedido de depósito da patente “PRODUTO ALIMENTÍCIO À BASE DE PROTEÍNA VEGETAL E CASTANHA DE CAJU”



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 013958 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal do Maranhão

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 05279103000119

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. dos Portugueses, 1966 - Cidade Universitária, Bacanga

Cidade: São Luís

Estado: MA

CEP: 65080-805

País: Brasil

Telefone: (98) 32728710

Fax:

Email: nit-dapi@ufma.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PRODUTO ALIMENTÍCIO À BASE DE PROTEÍNA VEGETAL E CASTANHA DE CAJU

Resumo: A presente invenção refere-se a um hambúrguer à base de resíduo da castanha de caju e soja, com adição de gel de galactomananas de *Adenanthera pavonina* L. e *Leucaena leucocephala* além de condimentos na composição. O desenvolvimento do referido produto visa estabelecer uma alternativa de produto alimentício, análogo à carne, no entanto de origem vegetal, com melhores propriedades nutricionais e sensoriais.

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5

Nome: KÁTIA DANIELLE ARAÚJO LOURENÇO VIANA

CPF: 02729940499

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Rua Um, Cond. Village Du Vinhais, casa 23, Planalto Vinhais II

Cidade: São Luís

Estado: MA

CEP: 65074-875

País: BRASIL

Telefone: (98) 981 257444

Fax:

Email: katnutri@hotmail.com

Inventor 2 de 5

Nome: CAIO PAVÃO TAVARES

CPF: 43207243304

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Rua Plutão, Park Vinhais Condomínio Club, Bloco 06, Apt. 701,
Recanto dos Vinhais

Cidade: São Luís

Estado: MA

CEP: 65070-400

País: BRASIL

Telefone: (98) 999 088330

Fax:

Email: caloptavares@gmail.com

Inventor 3 de 5

Nome: KAMILA OLIVEIRA BARROS DAMASCENO

CPF: 04876170371

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Rua Magalhães de Almeida, nº 100, Centro

Cidade: Presidente Dutra

Estado: MA

CEP: 65760-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 5

Nome: MICHELE BEZERRA SILVA

CPF: 60079744303

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Avenida Alberto Lamego, nº 637, bloco 17, apto 302, Parque
Califórnia

Cidade: Campos dos Goytacazes

Estado: RJ

CEP: 28016-811

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 5 de 5

Nome: IVONE GARROS ROSA

CPF: 04203410304

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Rua 17, Quadra casa 12, COHASERMA

Cidade: São Luís

Estado: MA

CEP: 65072-310

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	RELATÓRIO DESCRITIVO.pdf
Reivindicação	HAMBURGUER - Reivindicações última versão.pdf
Resumo	RESUMO.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	COMPROVANTE GRU.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Obrigado por acessar o Peticionamento Eletrônico

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Este pedido foi enviado pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 15/06/2018 às 00:25

ANEXO B- PARECER COMITÊ DE ÉTICA DE USO ANIMAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA

CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito de galactomananas de *Leucaena leucocephala* no controle da obesidade" registrada com o nº 23115.008080/2016-25, sob a responsabilidade de Kátia Danielle Araujo Lourenço Viana, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **Aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 19/12/2016.

FINALIDADE	☐ Ensino ☒ Pesquisa ☐ Extensão
Vigência da autorização	10/01/2017 à 10/01/2018
Espécie/linhagem/raça	Roedores da linhagem Wistar (<i>Rattus norvegicus albinus</i>)
Nº de animais	36
Peso/Idade	21 dias
Sexo	18 Machos e 18 fêmeas
Origem	Biotério Central - UFMA

Prof. Dra. Lucilene Amorim Silva
 Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
 UFMA

ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO - *Food Hydrocolloids*

Manuscript Details

Manuscript number FOODHYD_2017_672

Title Physicochemical and structural characterization of galactomannan seeds of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Article type Research paper

Abstract

The objective of this research was to characterize the galactomannan obtained from *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seeds according to physical-chemical and structural parameters. Galactomannan was obtained from the endosperm of mature seeds, dissolving in water, filtration and precipitation in ethanol. The yield of galactomannan was 8.8% relative to the weight of the seed. The water holding capacities (70.8 g H₂O/g polysaccharide) and oil (0.8 g oil/g polysaccharide) were similar to guar gum (standard). Scanning electron microscopy (SEM) revealed a polymer with an intense degree of surface porosity, with the elements: oxygen (54.9%), carbon (38.3%) and nitrogen (6.8%) as dry matter composition by energy dispersive X-rays analysis (EDS). The monosaccharide composition presented mannose (59.44%) and galactose (39.60%) as major components and Man:Gal ratio of 1.5. Fourier transform infra-red spectroscopy analysis suggests, from the spectra obtained, a crystalline structure essentially formed by pyranoside rings of galactosyl and mannosyl residues. The *L. leucocephala* (GL) galatomannan was homogeneous with a high molar mass (*M_w*) (8.51x10⁵ g mol⁻¹). The apparent viscosity of GL in 5% aqueous solution was lower than guar gum (standard), however, the fluid presented a non-Newtonian and pseudoplastic behavior, similar to that presented by the standard guar gum. GL has physical and chemical characteristics similar to guar gum (standard), which makes this polymer an important adjuvant in the use of galactomannans in biotechnological and industrial processes.

Keywords Polysaccharides; Galactomannans; *Leucaena leucocephala*

Taxonomy Carbohydromics, Colloid Viscosity, Food Biotechnology

Corresponding Author Marilene Rocha Borges

Corresponding Author's Institution Federal University of Maranhão

Order of Authors Kátia Danielle Lourenço Viana, Daniele Rodrigues, Thiago Farias, Eurípedes Oliveira, Joana Léa Silveira, Shayla Fernanda Barbieri, Adeilton Maciel, Ivone Garros-Rosa, Marilene Rocha Borges

Suggested reviewers Carmen Petkowicz, Cicero Bezerra, Renato Moreira, Martin Williams

ANEXO D – Normas para submissão de artigo ao periódico “Food Hydrocolloids”

Food Hydrocolloids

Publishes original and innovative research concerned with the characterisation, properties, functionality and application of hydrocolloids in food products. Hydrocolloids are defined as polysaccharides and proteins of commercial importance. The key focus of the research should be on the hydrocolloid material itself and the manuscript should include a fundamental discussion of the research findings and their significance. Manuscripts that simply report data without providing a detailed interpretation of the results are unlikely to be accepted for publication in the journal. The main areas of interest are: Chemical and physicochemical characterisation Thermal properties including glass transitions and conformational changes Rheological properties including viscosity, viscoelastic properties and gelation behaviour The influence on organoleptic properties Interfacial properties including stabilisation of dispersions, emulsions and foams Film forming properties with application to edible films and active packaging Encapsulation and controlled release of active compounds The influence on health including their role as dietary fibre Manipulation of hydrocolloid structure and functionality through chemical, biochemical and physical processes New hydrocolloids and hydrocolloid sources of commercial potential. The Journal also publishes

Review articles that provide an overview of the latest developments in topics of specific interest to researchers in this field of activity.

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Food Hydrocolloids only publishes original and novel research that is of high scientific quality. Research areas include basic and applied aspects of the characteristics, properties, functionality and use of macromolecules in food systems. Hydrocolloids in this context include polysaccharides, modified polysaccharides and proteins acting alone, or in mixture with other food components, as thickening agents, gelling agents, film formers or surface-active agents. Included within the scope of the journal are studies of real and model food

colloids - dispersions, emulsions and foams - and the associated physicochemical stability phenomena - creaming, sedimentation, flocculation and coalescence. In particular, *Food Hydrocolloids* covers: the full scope of hydrocolloid behaviour, including isolation procedures, chemical and physicochemical characterization, through to end use and analysis in finished food products; structural characterization of established food hydrocolloids and new ones ultimately seeking food approval; gelling mechanisms, syneresis and polymer synergism in the gelation process; rheological investigations where these can be correlated with hydrocolloids functionality, colloid stability or organoleptic properties; theoretical, computational or simulation approaches to the study of colloidal stability, provided that they have a clear relationship to food systems; surface properties of absorbed films, and their relationship to foaming and emulsifying behaviour; phase behaviour of low-molecular-weight surfactants or soluble polymers, and their relationship to food colloid stability; droplet and bubble growth, bubble nucleation, thin-film drainage and rupture processes; fat and water crystallization and the influence of hydrocolloids on these phenomena, with respect to stability and texture; direct applications of hydrocolloids in finished food products in all branches of the food industry, including their interactions with other food components; and toxicological, physiological and metabolic studies of hydrocolloids. ***Types of paper***

Research papers (Regular papers) Review papers Short communications Book reviews
Research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review papers will be accepted in areas of topical interest and will normally focus on literature published over the previous five years.

Short Communications are concise but complete descriptions of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to literature, and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 4 printed pages (about 8 manuscript pages, including figures, tables and references).

Contact details for submission

Submission for all types of manuscripts to *Food Hydrocolloids* proceeds totally online. Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal, <http://ees.elsevier.com/foodhyd>, you will be guided step-by-step through the creation and uploading of the various files.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list

should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases. For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. *Funding body agreements and policies* Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors. Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation. *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)* For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include

in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is **USD 3550**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF

file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 4 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Papers Prepared as Part of a Series

Authors are advised that closely related papers, or papers prepared as part of a series (Part I, Part II, etc.) should be submitted in strict chronological sequence, to allow for the first paper to pass through the reviewing process before the second one is considered. Papers in a series will all be handled by the same editor.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the Word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. Lines must be numbered consecutively throughout the manuscript, and all pages must be numbered.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a

subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should not exceed 250 words.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership

online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the Best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points

(maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below: Chemical compounds studied in this article Ethylene glycol (PubChem

CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865) More information.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.). *Formatting of funding sources* List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Formulae

1. Formulae should be typewritten. Leave ample space around the formulae.
2. Subscripts and superscripts should be clear.
3. Greek letters and other non-Latin or handwritten symbols should be explained where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.
4. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

5. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
6. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
7. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.
8. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.
9. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} and CO_3^{2-} , not as Ca^{++} or CO^{--3} .
10. Isotope numbers should precede the symbols
11. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Conventions

In general, the journal follows the conventions of the *CBE Style Manual* (Council of Biology Editors, Bethesda, MD, 1983, 5th edn). Follow *Chemical Abstracts* and its indexes for chemical names. For guidance in the use of biochemical terminology follow the recommendations issued by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, as given in *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, published by the Biochemical Society, UK. (see the website <http://www.iupac.org/publications/compendium/index/html>)

For enzymes use the recommended name assigned by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978, as given in *Enzyme Nomenclature*, published by Academic Press, New York, 1980. Where possible, use the recommended SI (Système International) units.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file. A detailed guide on electronic artwork is available. **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted

article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in Text; Proof of 'in press' required

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted all citations in the text should refer to:

1. **Single author:** the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication (Smith, 2003).
2. **Two authors:** both authors' names and the year of publication (Smith & Jones, 2004).
3. **Three, four or five authors:** all authors names and year of publication (Smith, Jones, & Brown, 2005). For all subsequent citations of this work use et al. (Smith et al., 2005).
4. **Six or more authors:** first author's name followed by et al. and the year of publication (Blacket al., 2007). Citations may be made directly or parenthetically. Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, b, 1999; Allan & Jones, 1995; Allen et al., 1994). Kramer et al. (2000) have recently shown..."

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style.

If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-hydrocolloids> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK. *List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13.03.03.
Journal abbreviations source Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). More information and a full list of supported databases.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

R code viewer

You can enrich your online article by including R code and underlying data sets, which will be displayed in your article on ScienceDirect. All R code and data files should be submitted as part of a single ZIP file. This ensures the code and data files that depend on each other are stored and made available together. R code should be saved as a plain text ASCII file. In your manuscript, you can indicate where the material should appear in the article, by including a note such as "Insert file Rcode.ZIP here". When your article is published on ScienceDirect, readers will be able to interactively explore highlighted R code next to the article page. More information.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. Full instructions.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address . All necessary files have been uploaded, and contain:
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet) Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white
- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our Support Center.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the

text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For no extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Track your submitted article

You are also welcome to contact the Elsevier Contact Center.

ANEXO E – Normas para submissão de artigo ao periódico “*Physiology & Behavior*”

Physiology & Behavior is aimed at the causal physiological mechanisms of behavior and its modulation by environmental factors. The journal invites original reports in the broad area of behavioral and cognitive neuroscience, in which at least one variable is physiological and the primary emphasis and theoretical context are behavioral. The range of subjects includes behavioral neuroendocrinology, psychoneuroimmunology, learning and memory, ingestion, social behavior, and studies related to the mechanisms of psychopathology. Contemporary reviews and theoretical articles are welcomed and the Editors invite such proposals from interested authors. Thematic issues and more comprehensive studies are also considered for publication, subject to the same review standards and process. Articles will be published in English. Benefits to authors We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our author services. Please see our Guide for Authors for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com> AUDIENCE . Physiologists, neurologists, psychologists, pharmacologists. IMPACT FACTOR . 2015: 2.461 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016.

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS Elsevier BIOBASE Chemical Abstracts Current Contents/Life Sciences MEDLINE® Energy Data Base Energy Research Abstracts IBZ Nutrition Abstracts PsycLIT CD-ROM Reference Update PsycINFO ScopusMEDLINE® Energy Data Base Energy Research Abstracts IBZ Nutrition Abstracts PsycLIT CD-ROM Reference Update PsycINFO Scopus.

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you

be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. To find out more, please visit the Preparation section below.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded: Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable) Supplemental files (where applicable) Further considerations
- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made

- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum. Article transfer service This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license. Author rights As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information. Elsevier supports responsible sharing Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Funding body agreements and policies Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the

Open Access Publication Fee.

Details of existing agreements are available online. Open access This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors. Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is USD 2600, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access

page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public.

This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

As part of the submission process your paper may be screened for English language usage and conformity to the guide for authors before it reaches the review stage. This is to ensure the journal's high standards are maintained and the review process is kept to a minimum. Passing this check is not a guarantee that your submission will subsequently proceed to the peer review process, which is a decision to be made at the sole discretion of the journal editor.

If you are asked to revise your manuscript during the review stage please submit a list of changes or a rebuttal against each point which is being raised when you submit the revised manuscript. The standard deadline for authors to submit the revision is 5 weeks. If you require a time extension to return the revision you should state the reasons for this extension and advise on a more feasible date for returning it.

Submission Address

https://www.evis.com/evis/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=PH
B

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections. Figures and tables embedded in text Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of

the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. Drugs Proprietary (trademarked) names should be capitalized. The chemical name should precede the trade, popular name, or abbreviation of a drug the first time it occurs.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Please seek permission from individuals before acknowledging them in your article.

Formatting of funding sources List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding:

This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Anesthesia

In describing surgical procedures on animals, the type and dosage of the anesthetic agent should be specified. Curarizing agents are not anesthetics; if these were used, evidence must be provided that anesthesia of suitable grade and duration was employed.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct.

Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged. A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a

source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/physiology-and-behavior> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style Text:

Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example:

'..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result' List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

*Examples:**Reference to a journal publication:*

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304. Reference to a website: [4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described

research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). More information and a full list of supported databases. AudioSlides The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper. Interactive plots This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. Full instructions.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.