

**LUCIDARCE MARTINS DA MATTA**

**FELJÃO COMUM BRANCO (*Phaseolus vulgaris*): PRODUÇÃO DE ISOLADO  
PROTEICO, FRACIONAMENTO CROMATOGRAFICO E INVESTIGAÇÃO DAS  
PROPRIEDADES SUPERFICIAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Luis Antônio Minim

Coorientadores: Eduardo Basílio de Oliveira  
Márcia Cristina Teixeira R. Vidigal  
Valéria Paula Rodrigues Minim

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M435f  
2020

Matta, Lucidarce Martins da, 1984-  
Feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*): produção de  
isolado proteico, fracionamento cromatográfico e investigação  
das propriedades superficiais / Lucidarce Martins da Matta. –  
Viçosa, MG, 2020.  
142 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Luis Antônio Minim.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Proteínas. 2. Agentes ativos de superfície. 3. Tensão  
superficial. 4. Amilases - Inibidores. 5. Alfa-amilase.  
6. Viscoelasticidade. 7. Goma arábica. 8. Pectinas.  
9. Carboximetilcelulose. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Doutorado em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 572.6

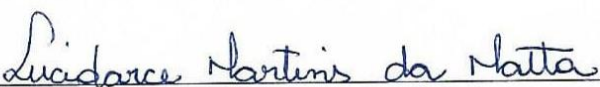
**LUCIDARCE MARTINS DA MATTA**

**FEIJÃO COMUM BRANCO (*Phaseolus vulgaris*): PRODUÇÃO DE ISOLADO  
PROTEICO, FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO E INVESTIGAÇÃO DAS  
PROPRIEDADES SUPERFICIAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 25 de junho de 2020.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Lucidarce Martins da Matta  
Autora

  
\_\_\_\_\_  
Luis Antônio Minim  
Orientador

*Ao Grande e Todo Poderoso Deus, que me forneceu força, paciência e persistência nos diversos momentos de angústia e desequilíbrio ao longo desses cinco anos e seis meses de Pós Graduação.*

*Sem hipocrisia, a mim, pela constante motivação em executar o estudo proposto e em colaborar com os colegas do Departamento de Tecnologia de Alimentos nos momentos oportunos.*

*Aos meus pais, Darcisio e Lucilene da Matta, pela grande força e apoio dados a mim e os muitos momentos de declaração de orgulho por esta filha cheia de defeitos.*

*Ao “Benzim”, Marcelo Augusto, pela constante demonstração de orgulho e apoio, aliada a preocupação com a minha saúde durante a permanência em Viçosa.*

*Aos meus sobrinhos, Larissa e Lorenzo da Matta, pelo amor incondicional e as risadas repletas de alegria nas férias em Goiânia.*

*Aos meus irmãos, Darcileno e Darcilucy da Matta, pelo constante apoio.*

*A eterna irmã de coração e alma, Mirtza Fúlvia, que nos diversos momentos de dúvida foi compreensiva e presente, demonstrando preocupação com a intensa rotina e estando presente para nossas “conversas cabeças” por telefone.*

*Às minhas Avós, Iraci e Sebastiana (in memorian), que embora não estejam presentes, deixaram legado de postura que certamente compõe cada atitude em prol da realização de todo objetivo de minha vida.*

*Às amigas Rafaela e Louise que tornaram a minha permanência em Viçosa menos árdua e sofrida.*

*E sem falta, à minha Monalisa que me faz muita falta no hoje.*

## AGRADECIMENTOS

Sempre serei agradecida de coração, todavia, faço questão de apontar nessas breves linhas a quem digo o “*Muito Obrigada!*”...

Ao Todo e Poderoso Deus, pela minha saúde e a dos meus familiares, em especial, coloco diante Dele a recuperação de meu pai, pedindo que seja contínua a constante. Digo Glória a ti, Senhor!

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos que me ofereceu uma estrutura de ponta para execução do projeto de Pesquisa, e ao quadro técnico que sempre se colocou a disposição no auxílio das atividades laboratoriais diárias.

À CAPES, pela concessão de bolsa, essencial para o suprimento das necessidades do dia a dia ao longo doutorado.

Ao professor Luís Antônio Minim, sou agradecida pela oportunidade de realizar o doutorado em um laboratório de moderno, estruturado, sempre em funcionamento.

Ao professor Eduardo Basílio, pelos vários momentos de conversa e apoio para enfrentar as tempestades do doutorado. Agradeço pela disposição de me atender e ajudar no esclarecimento das dúvidas oriundas da rotina de bancada.

À professora Monique, pela disposição de discutir alguns dos diversos resultados, momentos que me auxiliaram na solução de dúvidas.

À equipe da “Diretoria” do LADESP, Janaína, Priscila Fidelis e Isabele: mulheres fantásticas que me receberam com imenso carinho e que dividiram comigo momentos de café e muita risada.

Aos meus pais, Lucilene e Darcisio, pelo constante apoio e amor, indispensáveis para enfrentar a jornada de morar longe de casa por tanto tempo.

Ao “Benzim”, Marcelo Augusto, que compreendeu desde o início o propósito de morar tão longe e se colocou ao meu lado com imenso amor e companheirismo!

À amiga Lara Bueno, que foi a minha principal incentivadora na reta final de elaboração deste documento final.

À Rafaela, amizade como a sua não se encontra em qualquer lugar e merece ser reconhecida. Sou sortuda por ter você como amiga!

À mãezinha da Rafaela, Sra. Edna, que me recebeu em sua casa com carinho e sabor de mãe. Agradeço por me ajudar sempre!

À amiga Louise, que foi uma grande companheira nos momentos de solidão em Viçosa.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – DTA/UFV.

## BIOGRAFIA

Lucidarce Martins da Matta, filha de Darcisio Rodrigues da Matta e Lucilene Martins da Matta, nasceu em Anápolis, município de Goiás, no dia 29 do mês de abril de 1984.

Em março de 2003, ingressou no Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás (UFG), concluindo-o em janeiro de 2008. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico entre os anos de 2006 e 2007, sob a orientação da Professora Doutora Célia Maria Lopes do Departamento de Tecnologia de Alimentos, na Escola de Agronomia/UFG.

Em março de 2011, Lucidarce ingressou no Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós Graduação *Strictu Sensu* da Escola de Agronomia/UFG, sob a orientação do Professor Doutor Ângelo Luís Fazani Cavallieri. Em 25 do mês de fevereiro de 2013, Lucidarce concluiu o mestrado com a defesa da dissertação intitulada “Retenção do óleo de pequi em micropartículas de concentrado proteico de soro de leite e maltodextrina”.

Em março de 2015, ela ingressou no Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós Graduação *Strictu Sensu* do Departamento de Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do Professor Doutor Luis Antônio Minim. Em junho de 2020, Lucidarce concluiu o doutorado com a defesa da tese intitulada “Feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*): Produção de isolado proteico, fracionamento cromatográfico e investigação das propriedades superficiais”.

## RESUMO

DA MATTA, Lucidarce Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2020. **Feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*): Produção de isolado proteico, fracionamento cromatográfico e investigação das propriedades superficiais.** Orientador: Luis Antônio Minim. Coorientadores: Eduardo Basílio de Oliveira, Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal e Valéria Paula Rodrigues Minim.

O estudo das propriedades reológicas superficiais é essencial na compreensão da formação e estabilização de sistemas envolvendo proteínas. A formação de filme interfacial viscoelástico e coeso podem ser avaliadas através da dinâmica de redução da tensão interfacial ( $\sigma$ ). Diante de evidências científicas da atividade espumante de proteínas globulares de feijão e da necessidade de avaliar a propriedade reológica superficial, o objetivo deste estudo foi extrair, purificar e caracterizar a faseolamina e, avaliar os efeitos do pH e da concentração de NaCl e a presença de polissacarídeo na condição ácida salina sobre as propriedades reológicas superficiais do isolado proteico do feijão comum branco (IFB). Inicialmente, duas variáveis do processo da extração por solubilização salina, Proporção solvente ( $\text{NaCl}_{\text{aq}}$ )/farinha desengordurada ( $\text{Far}_{\text{des}}$ ) –  $X_1$  e Temperatura –  $X_2$ , foram estudadas sobre a atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ IA) do isolado e a purificação da faseolamina foi avaliada por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). Em seguida, por meio do método da gota pendente, foram avaliados os efeitos do pH (3, 5 e 7) e da concentração de NaCl (0 %, 1,5 % e 3,0 % m/v) e da presença de polissacarídeo (carboximetilcelulose CMC, goma arábica ou pectina LM) em meio ácido salino (pH 3 e 1,5 % m/v NaCl) sobre as propriedades reológicas superficiais do IFB. Apenas a proporção  $\text{NaCl}_{\text{aq}}/\text{Far}_{\text{des}}$  exibiu efeito sobre a  $\alpha$ IA, o IFB exibiu  $\alpha$ IA igual a  $5274,03 \pm 86,67 \text{ U.g}_{\text{iso}}^{-1}$  e, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, o perfil eletroforético obtido apresentou bandas de 97 kDa, 48 – 43 kDa, ~35 kDa e 20 – 18 kDa. Com base no perfil eletroforético, verificou-se que as frações proteicas obtidas na purificação não foram constituídas por proteínas isoladas. A variação do pH e da concentração de NaCl não possuíam efeito significativo ( $\text{Pr} > 0,05$ ) sobre os parâmetros de decaimento da  $\sigma$ . Constatou-se que IFB preparado em pH 5 sem NaCl apresentou a maior taxa de decaimento ( $k = 1,163 \text{ ms}$ ) e o menor valor de tensão interfacial de equilíbrio ( $\sigma_{\text{eq}} = 9,173 \text{ mN/m}$ ). Os filmes superficiais exibiam estrutura gélica com comportamento viscoelástico, baixa concentração de NaCl favoreceu o aumento da viscoelasticidade em qualquer pH e os maiores valores de viscoelasticidade foram obtidos em amostras preparadas em pH 3, com ou sem Sal. Na

presença de polissacarídeos, observou-se o favorecimento da redução da  $\sigma$  apenas na presença da goma arábica (11,5 – 7,17 mN/m), o comportamento viscoelástico dos filmes variava ao longo do tempo e dependia da identidade do polissacarídeo e, todos filmes formados possuíam estrutura gélida. Logo, concluiu-se que (i) a purificação da faseolamina por cromatografia HIC não foi eficiente e pode ser avaliada combinando-a com outra(s) técnica(s) cromatográfica(s), (ii) pH e concentração de NaCl não exibiram efeito significativo sobre os parâmetros de decaimento da  $\sigma$  e, (iii) em meio ácido (pH 3) salino (1,5 % m/v NaCl), além da presença, a identidade do polissacarídeo também pode interferir no desempenho das habilidades superficiais das proteínas globulares de feijão comum branco.

Palavras-chave: Faseolamina. Atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase. Tensão interfacial. Interface ar/água. Viscoelasticidade. Carboximetilcelulose. Goma arábica. Pectina LM.

## ABSTRACT

DA MATTA, Lucidarcy Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2020. **White kidney bean (*Phaseolus vulgaris*): protein isolate production, chromatographic fractionation and superficial properties investigation.** Adviser: Luis Antônio Minim. Co-Advisors: Eduardo Basílio de Oliveira, Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal and Valéria Paula Rodrigues Minim.

The study of superficial rheological properties is essential to understand the formation and stabilization of systems involving proteins. The formation of the viscoelastic and cohesive film can be evaluated through the dynamics of reducing the interfacial tension ( $\sigma$ ). In the face of scientific evidence of the foaming activity of globular proteins in beans and the need to evaluate the surface rheological property, this study aimed was to extract, purify and characterize the phaseolamin and to evaluate the effects of pH and NaCl concentration and the presence of polysaccharides in the saline acid condition on the surface rheological properties of the protein isolate of white kidney beans (IFB). The effects of two variables of the extraction process by saline solubilization, solvent ( $\text{NaCl}_{\text{aq}}$ )/defatted flour ( $\text{BF}_{\text{def}}$ ) ratio –  $X_1$  and temperature –  $X_2$ , were studied over the inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase ( $\alpha\text{IA}$ ) and the purification of the phaseolamin was evaluated by hydrophobic interaction chromatography (HIC). Through of the drop droplet method, the effect of pH (3, 5 and 7) and NaCl concentration (0 %, 1.5 % and 3.0 % w/v) and the presence of polysaccharide (carboxymethylcellulose CMC, gum arabic or pectin LM) in acid saline medium (pH 3.0 and 1.5 % w/v NaCl) over the surface rheological properties of IFB were evaluated. Only the  $\text{NaCl}_{\text{aq}}/\text{BF}_{\text{def}}$  ratio exhibited effect on  $\alpha\text{IA}$ , the IFB exhibited  $\alpha\text{IA} = 5274.03 \pm 86.67 \text{ U} \cdot \text{g}_{\text{iso}}^{-1}$  and the electrophoretic profile in the reducing condition obtained exhibited bands of 97 kDa, 48 - 43 kDa, ~ 35 kDa and 20 - 18 kDa. Based on the electrophoretic profile, it was found that the protein fractions obtained in the purification were not composed of pure proteins. The variation of pH and NaCl concentration had no significant effect ( $\text{Pr} > 0.05$ ) on the  $\sigma$  decay parameters. It was found that IFB prepared at pH 5 without NaCl showed the highest decay rate ( $k = 1.163 \text{ ms}$ ) and the lowest equilibrium interfacial tension value ( $\sigma_{\text{eq}} = 9.173 \text{ mN/m}$ ). The superficial films exhibited a gel structure with viscoelastic behavior, low NaCl concentrations favored an increase in viscoelasticity at any pH and the highest values of the viscoelastic module were obtained in samples prepared at pH 3 with or without salt. In the presence of polysaccharides, it was observed that the reduction of  $\sigma$  was favored only in the

presence of arabic gum (11.5 - 7.17 mN/m), that the viscoelastic behavior of the isolate films varied over time and depends on the polysaccharide identity and that the film formed had a structure similar to the gel network. Therefore, it was concluded that (i) purification of the phaseolamin by HIC chromatography was not efficient and can be evaluated by combining it with other chromatographic technique, (ii) pH and NaCl concentration had no significant effect on the decay parameters of  $\sigma$  and, (iii) in an acid medium (pH 3) saline (1.5% w/v NaCl), besides of the presence, polysaccharide identity can also to interfere in the performance of the surface abilities of globular proteins of white kidney beans.

Keywords: Phaseolamin. Inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase. Interfacial tension. Air/water interface. Viscoelasticity. Carboxymethylcellulose. Arabic gum. LM pectin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1 - Revisão bibliográfica

Figura 1.1 - Perfis de solubilidade proteica em função do pH de (A) isolados proteicos de diferentes variedades de feijões comuns (*Phaseolus vulgaris*) produzidos por solubilização alcalina (pH 9) e precipitação isoelétrica (pH 4,5). Variedades: (●) *Speckled Sugar*, (◇) *Red Mexican*, (▲) *Great Northern*; (B) isolado proteico de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) produzido por: solubilização alcalina (pH 8,5), precipitação isoelétrica (pH 4,5) e centrifugação 4000 rpm (◆), solubilização alcalina (pH 8,5), precipitação isoelétrica (pH 4,5) e centrifugação 9900 rpm (▲), solubilização alcalina (pH 8,5) e ultrafiltração (5 kDa) (■) e solubilização salina (2 % NaCl) (x); (C) de produto proteico rico em faseolamina (PRP, ■) e isolado proteico (KPI, ●) de feijão comum; (D) das frações de albumina (- -) e globulina de feijão (-); ..... 40

Figura 1.2 - Perfil de solubilidade em função do pH de (A) extratos proteicos reticulados pela transglutaminase microbiana (MTGase), Control (□), K-30 (○), K-60 (Δ) e K-120 (▽) indicam as amostras tratadas pela MTGase por 0, 30, 60 e 120 min, respectivamente; (B) hidrolisados proteicos de feijão comum Contendor (*Phaseolus vulgaris* L.) obtidos pela ação de papaína. Nativo (◆), hidrolisado por 30 min (■), hidrolisado por 60 min (▲)..... 42

### CAPÍTULO 2 - Extração, purificação por cromatografia de interação hidrofóbica e caracterização da faseolamina de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*)

Figura 2.1 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na ausência (A) e presença (B) de β-mercaptoetanol da farinha desengordurada (Faixa F) e dos isolados de proteínas (Faixa 1-11 correspondem a cada ensaio do delineamento) de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*). Faixa (P) corresponde ao padrão de proteínas: ovotransferrina (74,6 kDa), BSA (66,4 kDa), ovoalbumina (44,3 kDa) e lisozima (14,3 kDa). ..... 81

Figura 2.2 - Cromatograma do fracionamento do isolado proteico de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*) por cromatografia de interação hidrofóbica na matriz Fenil *StreamLine* (5 mm x 10 cm). ..... 83

Figura 2.3 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na ausência (A) e presença (B) de  $\beta$ -mercaptoetanol: Faixa P representa o padrão de proteínas (ovotransferrina - 74,6 kDa, BSA - 66,4 kDa e ovoalbumina - 44,3 kDa), Faixa F representa a farinha desengordurada, Faixa 1 representa o conteúdo não adsorvido na coluna, Faixas 2 e 3 representam os picos I e II, respectivamente. (C) Medidas de potencial  $\zeta$  (mV) de soluções de isolados proteico de feijão comum branco nativo (ISO<sub>NAT</sub>) e do submetido a (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M (ISO<sub>TRAT</sub>), das frações coletadas (Picos 1 e 2) no fracionamento cromatográfico proteico..... 84

Figura 2.4 - (A) Espectros de varredura 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> do isolado de feijão comum branco nativo (ISO<sub>NAT</sub>) e do isolado (ISO<sub>TRAT</sub>) submetido ao tampão de adsorção da cromatografia HIC. Deconvolução das bandas espectrais amida I (1600 – 1700 cm<sup>2</sup>) dos ISO<sub>NAT</sub> (A) e ISO<sub>TRAT</sub> (B). ..... 86

### **CAPÍTULO 3 - Estudo do efeito do pH e concentração de NaCl sobre as propriedades tensoativas superficial das proteínas globulares de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*)**

Figura 3.1 - Solubilidade do isolado proteico de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*) em função da variação de pH. (■) Sem NaCl, (□) 1,5 % NaCl e (▲) 3,0 % NaCl..... 103

Figura 3.2 - Perfil de decaimento cinético da tensão interfacial do filme superficial contendo 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de IFB preparados em 50 mM fosfato-citrato (▲ 0 % NaCl, ■ 1,5 % NaCl e ◆ 3,0 % NaCl): (A) pH 3, (B) pH 5 e (C) pH 7. .... 105

Figura 3.3 - Perfis dos parâmetros dilatacionais do filme superficial de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de IFB preparado em 50 mM de fosfato-citrato em pH 3 (▲ sem NaCl, ● 1,5 % NaCl e ■ 3,0 % NaCl): (A) Módulo viscoelástico (E), (B) módulo de elástico (E'), (C) módulo viscoso (E'') e (D) ângulo de fase ( $\varphi$ ). .... 109

Figura 3.4 - Perfis dos parâmetros dilatacionais do filme superficial contendo 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de IFB preparado em 50 mM de fosfato-citrato em pH 5 (▲ sem NaCl, ● 1,5 % NaCl e ■ 3,0 % NaCl): (A) Módulo viscoelástico (E), (B) módulo de elástico (E'), (C) módulo viscoso (E'') e (D) ângulo de fase ( $\varphi$ ). .... 110

Figura 3.5 - Perfis dos parâmetros dilatacionais do filme superficial contendo 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de IFB preparado em 50 mM de fosfato-citrato em pH 7 (▲ sem NaCl, ● 1,5 % NaCl e ■ 3,0 % NaCl): (A) Módulo viscoelástico (E), (B) módulo de elástico (E'), (C) módulo viscoso (E'') e (D) ângulo de fase ( $\varphi$ ). .... 111

## **CAPÍTULO 4 - Polissacarídeos influenciam as propriedades reológicas superficiais das proteínas globulares de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*).**

Figura 4.1 - Curvas de escoamento das soluções contendo (A) ovoalbumina e (B) isolado proteico de feijão comum branco na presença de polissacarídeos. ....	128
Figura 4.2 - Perfil de decaimento da tensão superficial contendo 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteína e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ polissacarídeo. As soluções foram preparadas em 50 mM fosfato-citrato (pH 3) com 1,5 % m/v NaCl. (A) Ovoalbumina ALB e (B) isolado proteico de feijão comum branco IFB. ....	131
Figura 4.3 - Perfis dos parâmetros dilatacionais dos filmes proteicos formados na interface ar/água contendo 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ovoalbumina (ALB) e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de polissacarídeo preparado em fosfato-citrato (50 mM pH 3) contendo 1,5 % NaCl: (A) Módulo de viscoelasticidade (E), (B) módulo de elasticidade (E'), (C) módulo viscoso (E'') e (D) ângulo de fase ( $\phi$ ).....	135
Figura 4.4 - Perfis dos parâmetros dilatacionais dos filmes proteicos formados na interface ar/água contendo 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de isolado proteico de feijão branco (IFB) e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de polissacarídeo preparado em fosfato-citrato (50 mM pH 3) contendo 1,5 % NaCl: (A) Módulo de viscoelasticidade (E), (B) módulo de elasticidade (E'), (C) módulo viscoso (E'') e (D) ângulo de fase ( $\phi$ ). ....	136

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1 - Revisão bibliográfica**

Tabela 1.1 - Perfil de aminoácidos (g/100 g proteína) de farinha integral de diferentes variedades feijão do gênero <i>Phaseolus</i> .....	24
Tabela 1.2 - Propriedades físicas da fração proteica faseolamina do feijão comum ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) em função do pH. ....	26
Tabela 1.3 - Influência do pH e força iônica sobre as características moleculares de legumina de ervilha. ....	27
Tabela 1.4 - Propriedades de hidratação de extratos proteicos nativos de variedades de feijão do gênero <i>Phaseolus</i> .....	35
Tabela 1.5 - Propriedades de hidratação de extratos proteicos modificados de variedades de feijão do gênero <i>Phaseolus</i> .....	38
Tabela 1.6 – Propriedades emulsificantes de extratos proteicos nativos de feijões do gênero <i>Phaseolus</i> .....	47
Tabela 1.7 – Propriedades emulsificantes de extratos de proteínas modificados de feijões do gênero <i>Phaseolus</i> .....	50
Tabela 1.8 – Propriedades espumantes de extratos proteicos nativos de feijão do gênero <i>Phaseolus</i> .....	56
Tabela 1.9 - Propriedades espumantes de extratos proteicos modificados de feijão de gênero <i>Phaseolus</i> .....	59

### **CAPÍTULO 2 - Extração, purificação por cromatografia de interação hidrofóbica e caracterização da faseolamina de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*)**

Tabela 2.1 - Delineamento do estudo do processo de produção de extrato proteico de feijão comum branco por solubilização salina: valores reais e codificados das variáveis de independentes. ....	72
Tabela 2.2 - Delineamento do estudo do processo de produção do extrato proteico de feijão comum branco ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) por solubilização salina: valores reais e codificados das variáveis independente e resposta: rendimentos, teor de proteína e atividade inibitória da $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ IA). ....	78

Tabela 2.3 - Efeito estimado, erro padrão, valor t e grau de significância para cada fator do modelo codificado para atividade inibitória da $\alpha$ -amilase.....	79
Tabela 2.4 - Análise de variância do modelo ajustado para a atividade inibitória da $\alpha$ -amilase. ....	79
Tabela 2.5 - Processo de separação das proteínas do isolado de feijão comum branco ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Fenil <i>Streamline</i> . ....	85
Tabela 2.6 - Peptídeos encontrados em proteínas homólogas segundo <i>Mascot</i> e <i>Scaffold</i> para as bandas do gel não redutor (N) e redutor (R). ....	89

**CAPÍTULO 3 - Estudo do efeito do pH e concentração de NaCl sobre as propriedades tensoativas superficial das proteínas globulares de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*).**

Tabela 3.1 – Níveis das variáveis do estudo de avaliação das propriedades superficiais do filme contendo isolado proteico de feijão comum branco (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).....	100
Tabela 3.2 - Parâmetros do modelo exponencial de decaimento ajustado aos dados de tensão interfacial experimental ( $\sigma$ ) da superfície contendo 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de IFB em função do pH (3, 5 e 7) e da concentração de NaCl (0 %, 1,5 % e 3,0 % - m/v). ....	107
Tabela 3.3 - ANOVA do modelo de regressão avaliado para tensão interfacial de equilíbrio. ....	107
Tabela 3.4 - ANOVA do modelo de regressão avaliado para taxa de decaimento. ....	108
Tabela 3.5 - ANOVA do modelo de regressão avaliado para o instante em que $\sigma - \sigma_{eq} = 0,005$ . ....	108

**CAPÍTULO 4 - Polissacarídeos influenciam as propriedades reológicas superficiais das proteínas globulares de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*)**

Tabela 4.1 - Medidas de potencial zeta, tamanho médio e distribuição de tamanho de partículas das fases contínuas contendo proteínas (ovoalbumina – ALB ou isolado proteico de feijão comum branco – IFB) ou a mistura proteína-polissacarídeo preparadas em 50 mM fosfato-citrato pH 3 com 1,5 % (m/v) NaCl. ....	126
Tabela 4.2 – Parâmetros reológicos de escoamento das soluções contendo ovoalbumina (ALB) e um polissacarídeo.....	129

Tabela 4.3 - Parâmetros reológicos de escoamento das soluções com isolado proteico de feijão comum branco (IFB) e um polissacarídeo.....	129
Tabela 4.4 - Parâmetros do modelo exponencial de decaimento ajustado aos dados de tensão interfacial experimentais ( $\sigma$ ) da interface ar/água contendo $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteína e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de polissacarídeo, ambos preparados em 50 mM fosfato-citrato (pH 3) contendo 1,5 % (m/v) NaCl. ....	132

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
<b>1 - Proteínas do feijão.....</b>	<b>23</b>
1.1 - Processo de purificação de proteína de leguminosas .....	28
<b>2 - Propriedades funcionais das proteínas.....</b>	<b>31</b>
2.1 - Propriedade de hidratação .....	33
2.2 - Solubilidade.....	39
2.3 - Sistemas interfaciais.....	43
2.3.1 - Emulsão.....	44
a) Propriedades emulsificantes de extratos proteicos de feijão .....	45
2.3.2 - Espumas .....	53
a) Propriedade espumantes de proteínas de feijão.....	54
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>CAPITULO 2 - EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA E CARACTERIZAÇÃO DA FASEOLAMINA DE FEIJÃO COMUM BRANCO (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....</b>	<b>68</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>68</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>2 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>70</b>
2.1 - Material .....	70
2.2 - Produção da farinha desengordurada de feijão branco.....	71
2.3 - -- Delineamento experimental .....	71
a) Produção do isolado proteico de feijão comum branco .....	73
2.4 - Captura cromatográfica da faseolamina.....	73
2.5 - Caracterização dos isolados e frações proteicas.....	74
a) Eletroforese (SDS-PAGE).....	74
b) Atividade de inibição de $\alpha$ -amilase <i>in vitro</i> .....	74
c) Ponto isoelétrico médio (pI <sub>médio</sub> ).....	75
d) Espectrofotometria no Infravermelho FTIR-ATR .....	76

e) Espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF .....	76
<b>3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
3.1 - Extração de proteínas de feijão comum branco .....	77
a) Eletroforese.....	80
3.2 - Captura cromatográfica do isolado proteico de feijão comum branco.....	82
a) Espectrofotometria FTIR-ATR.....	86
b) Espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF.....	88
<b>4 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>92</b>

<b>CAPITULO 3 - ESTUDO DO EFEITO DO pH E CONCENTRAÇÃO DE NaCl SOBRE AS PROPRIEDADES TENSOATIVAS SUPERFICIAL DAS PROTEÍNAS GLOBULARES DE FEIJÃO COMUM BRANCO (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....</b>	<b>96</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>96</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>2 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>99</b>
2.1 - Material .....	99
2.2 - Produção do isolado proteico de feijão comum branco .....	99
2.3 - Solubilidade.....	100
2.4 - Estudo das propriedades reológicas superficiais .....	100
2.5 - Propriedades reológicas superficiais .....	101
2.5.1 - Propriedades dinâmicas .....	101
2.5.2 - Medidas reológicas dilatacionais.....	101
<b>3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>102</b>
3.1 - Solubilidade.....	102
3.2 - Propriedades superficiais do isolado proteico .....	103
3.2.1 - Tensão interfacial de equilíbrio .....	103
3.2.2 - Propriedades reológicas dilatacionais .....	109
<b>4 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>112</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>113</b>

<b>CAPITULO 4 - POLISSACARÍDEOS INFLUENCIAM AS PROPRIEDADES SUPERFICIAIS DAS PROTEÍNAS GLOBULARES DE FEIJÃO COMUM BRANCO (<i>Phaseolus vulgaris</i>).</b> .....	<b>113</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>117</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>118</b>
<b>2 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>120</b>
2.1 - Material .....	120
2.2 - Produção do isolado proteico de feijão comum branco .....	121
2.3 - Preparo das soluções .....	121
2.4 - Distribuição de Tamanho e Medidas de Potencial Zeta.....	122
2.5 - Propriedades superficiais.....	122
2.5.1 - Propriedades dinâmicas.....	123
2.5.2 - Medidas reológicas dilatacionais .....	123
2.6 - Propriedades reológicas de escoamento da fase aquosa.....	124
2.7 - Análise estatística.....	125
<b>3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>125</b>
3.1 - Medidas de tamanho de partícula e potencial zeta.....	125
3.2 - Propriedades reológicas de escoamento .....	127
3.3 - Propriedades reológicas interfaciais.....	130
3.3.1 - Tensão superficial de equilíbrio .....	130
3.3.2 - Medidas de reologia dilatacional .....	134
<b>4 - CONCLUSÃO</b> .....	<b>137</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>138</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>138</b>

## INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos do século XX, a sociedade passou por transformações profundas que influenciaram o estilo de vida e no hábito alimentar dos indivíduos. O consumidor contemporâneo tornou-se mais exigente e, hoje, busca produtos alimentícios que se encaixem em suas rotinas aceleradas, que atendam a exigência nutricional e sejam benéficos à saúde. Atenta ao contínuo crescimento da demanda por alimentos isentos de glúten, lactose e proteínas animais, a indústria alimentícia almeja elaborar produtos seguros que sejam aceitos pelo consumidor e, para isso, é importante dispor de informações a respeito das habilidades técnico-funcionais dos ingredientes.

A intensidade das características sensoriais de textura do alimento é resultado das interações intermoleculares entre os seus componentes/ingredientes, sobretudo, envolvendo as proteínas. Essas biomoléculas são muito versáteis, pois, atuam em interfaces e formam redes estruturadas, um retrato da habilidade da interação com outros constituintes, principalmente, com a água. Em paralelo ao setor industrial, estão os pesquisadores que avaliam as propriedades interfaciais (emulsificação e espumabilidade) das proteínas de origem vegetal, sobretudo de sementes leguminosas, a fim de atender a necessidade de ofertar novos ingredientes proteicos. As dietas vegetarianas, a sustentabilidade e o baixo custo de produção são os argumentos que reforçam a escolha por proteínas vegetais, especialmente, de grãos de culturas domesticadas e de práticas agrícolas difundidas.

As sementes de leguminosas estão presentes na história da alimentação humana há muitos séculos. Fonte de energia (carboidratos), de macro e micronutrientes essenciais à manutenção da vida (proteínas, fibras e minerais), o grupo de sementes de leguminosas denominado “*pulses*” (ervilha, lentilha, fava, grão de bico e feijão) em 2018 registrou produção superior a 92 milhões de toneladas ocupando uma área agrícola superior a 95 milhões de hectares (FAO, 2020).

As inúmeras variedades de feijão, selvagem ou domesticada, são consideradas as sementes de leguminosas mais consumidas nos países em desenvolvimento, com destaque para as cultivares domesticadas do gênero *Phaseolus*. Além de fornecer aminoácidos essenciais, fibras, minerais (cálcio, potássio e magnésio) e apresentar baixo índice glicêmico, o feijão pode proporcionar vários outros benefícios à saúde, por exemplo, o controle de fatores dos riscos de doenças coronarianas, como a pressão arterial e os níveis do colesterol LDL na corrente sanguínea. A produção mundial de feijão seco e verde em 2018 superou 54

milhões de toneladas em uma área de cultivo de quase 36 milhões de hectares. A participação do agronegócio brasileiro nesse mesmo ano atingiu quase 3 milhões de toneladas sendo a área de cultivo pouco inferior a 2,9 milhões de hectares (FAO, 2020).

Recentes estudos sobre as propriedades interfaciais dos extratos proteicos de feijão revelam que a modificação estrutural da cadeia polipeptídica pode levar a melhoria do desempenho de suas habilidades de formação e estabilização de emulsões e espumas. As proteínas do feijão são de reserva, majoritariamente, e em sua forma nativa apresentam estruturas terciárias enoveladas e bastante compactas o que compromete a interação intermolecular favorável com outros constituintes, sobretudo com a água, logo, atrapalha o desempenho das propriedades técnico-funcionais das biomoléculas. Embora os estudos científicos apresentem resultados promissores, as avaliações das habilidades interfaciais de proteínas realizadas por meio de medidas das propriedades de formação e estabilidade, seguindo os métodos analíticos consagrados, são insuficientes para fornecer as estimativas necessárias no desenvolvimento formulações de dispersões alimentícias (emulsão e espumas). Isso porque os dados obtidos não retratam a adsorção da proteína na interface, processo termodinâmico que governa a formação de filme interfacial viscoelástico e coeso, tido como essencial para a existência de estabilidade cinética de sistemas interfaciais. O avanço tecnológico dos instrumentos de medidas da reologia interfacial permite, atualmente, a aquisição de informações valiosas sobre o processo adsorptivo das biomoléculas tensoativas, como as proteínas, nas interfaces óleo/água e ar/água que regem a formação e estabilização das dispersões.

Uma proteína para ser considerada tensoativo de qualidade precisa difundir rapidamente em direção à interface, ser flexível e capaz de desenovelar sua estrutura na interface para, favoravelmente, interagir com as moléculas vizinhas, sobretudo, com as demais cadeias polipeptídicas, a fim de formar um filme interfacial viscoelástico e coeso.  $\beta$ -lactoglobulina, ovoalbumina, extrato proteico do soro de leite bovino e caseína são exemplos de proteínas animais cuja avaliação das propriedades reológicas nas interfaces líquidas (óleo/água e ar/água) é realizada por pesquisadores ao redor do mundo. A continuidade da intenção de investigar a substituição parcial ou total das proteínas animais por vegetais é vista no aumento da quantidade pesquisas das propriedades reológicas de filmes interfaciais formados por proteínas de leguminosas, estudos que complementam as informações existentes na literatura a respeito da formação e estabilização de emulsões e espumas, como é caso das proteínas de lentilha e de feijão faba. Além dessas, é possível encontrar resultados de pesquisas sobre a atuação de proteínas de feijão comum do gênero *Phaseolus* na interface

óleo/água. Entretanto, não foram encontradas pesquisas sobre as propriedades reológicas superficiais de proteínas de feijão comum branco do gênero *Phaseolus*. Diante disso, o objetivo deste estudo foi extrair, purificar e caracterizar a faseolamina e avaliar os efeitos do pH e da concentração de NaCl e da presença de diferentes polissacarídeos na condição ácida salina sobre as propriedades reológicas superficiais do isolado proteico do feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*).

Este trabalho é apresentado em 4 capítulos: O Capítulo 1 consiste em uma revisão bibliográfica geral sobre as proteínas de feijão, os métodos de extração das proteínas, as propriedades de hidratação e interfaciais de extratos de feijão do gênero *Phaseolus*. Na sequência são abordados, também na forma de artigos, os seguintes títulos:

Capítulo 2 – Extração, fracionamento por cromatografia de interação hidrofóbica e caracterização da faseolamina de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*).

Capítulo 3 – Estudo do efeito do pH e concentração de NaCl sobre as propriedades tensoativas superficial das proteínas globulares de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*).

Capítulo 4 – Polissacarídeos influenciam as propriedades reológicas superficiais de proteínas globulares de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*).

## CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 - Proteínas do feijão

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma dicotiledônea presente na dieta da civilização humana há muitos séculos que se tornou uma das culturas domesticadas mais antigas das dietas latino americana, africana e asiática (DE LA FUENTE et al., 2011; LÓPEZ-PEDROUSO et al., 2014). O baixo custo e o alto valor nutricional da leguminosa são os fatores que fortalecem a sua permanência na alimentação das populações de baixa renda em países em desenvolvimento, sendo em muitos deles a única fonte diária de proteína (BLAIR, 2013; THARANATHAN; MAHADEVAMMA, 2003). Trata-se de um alimento fonte de carboidratos (60 %), proteínas (20 – 30 %), fibras (24 – 30 %), sais minerais (cálcio, magnésio, potássio, ferro) e compostos fenólicos. Pesquisas sugerem que concentrados proteicos hidrolisados de feijão comum podem ser inseridos na alimentação como suplementação porque possuem compostos antioxidantes e são de baixo índice glicêmico devido à presença do amido resistente (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010; EVANGELHO et al., 2017; HOJILLA-EVANGELISTA et al., 2018; MARQUEZI et al., 2017; MEJIA et al., 2005; RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2014; RUI et al., 2011).

O perfil aminoacídico das proteínas de feijão do gênero *Phaseolus* (TABELA 1.1) em geral exhibe, nessa ordem, alto e baixo teores de aminoácidos essenciais (lisina, leucina, isoleucina, asparagina/ácido aspártico, glutamina/ácido glutâmico) e sulfurados (metionina, cisteína, triptofano, valina e tirosina). Essa composição reforça a sugestão nutricional de consumo associado com cereais, como arroz, milho e/ou trigo, uma vez que cereais possuem baixo e alto teor de lisina e aminoácidos sulfurados, respectivamente (HOJILLA-EVANGELISTA et al., 2018; MONTOYA et al., 2010)

Tabela 1.1 - Perfil de aminoácidos (g/100 g proteína) de farinha integral de diferentes variedades feijão do gênero *Phaseolus*.

<b>Aminoácidos</b>	<b>Comum<sup>1</sup></b>	<b>Lima<sup>2</sup></b>	<b>Vermelho<sup>3</sup></b>	<b>Branco<sup>4</sup></b>
Asx*	10,86	12,16	13,09	12,03
Thr	3,17	4,85	4,52	4,13
Ser	4,62	7,36	6,12	6,13
Glx*	15,34	12,66	17,25	16,88
Pro	2,95	5,47	4,43	4,10
Gly	3,57	7,63	4,20	4,20
Ala	3,8	5,48	4,52	4,30
Cys	0,94	0,20	1,00	1,07
Val	5,29	4,80	4,60	5,68
Met	1,62	1,05	1,36	1,28
Ile	5,21	3,46	3,90	4,76
Leu	8,46	7,51	8,13	8,41
Tyr	3,16	3,0	2,94	3,65
Phe	5,91	5,01	5,89	5,64
His	3,42	5,49	2,97	3,03
Lys	4,91	7,41	7,50	6,93
Arg	5,29	5,64	6,32	6,52
Trp	-	1,06	1,17	-

Fontes:<sup>1</sup> Liu et al. (2013); <sup>2</sup>Seidu et al. (2015); <sup>3</sup>Mundi & Aluko (2012); <sup>4</sup>Carbonaro et al., (1997).

\*Asx: ácido aspártico+asparagina; Glx: ácido glutâmico+glutamina.

As proteínas das leguminosas são, basicamente, classificadas conforme a solubilidade e a função biológica. Embora muito antiga, a classificação de Osborne das proteínas conforme a solubilidade ainda prevalece e são denominadas albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas. As albuminas são solúveis em água e em soluções salinas de baixa molaridade, as globulinas são insolúveis em água e solúveis em solução salina, as prolaminas são solúveis em etanol e as glutelinas são aquelas solúveis em soluções ácida ou alcalina diluídas (OSBORNE, 1909). Quanto à função biológica podem ser denominadas metabólicas ou de reserva. As proteínas metabólicas são aquelas que executam atividades enzimática ou estrutural nos cotilédones e as de reservas são as proteínas que fornecerão nitrogênio e esqueleto carbônico durante o desenvolvimento da planta.

As albuminas e globulinas são as proteínas de reserva predominantes entre variedades de feijão, no gênero *Phaseolus*. Prevalecendo sobre as demais (40 – 60 %), as globulinas desse gênero podem ser classificadas segundo o coeficiente de sedimentação em 7S e 11S ou vicilina e legumina, nesta ordem (CHAGAS; SANTORO, 1997; DE LA FUENTE et al., 2011; DERBYSHIRE; WRIGHT; BOULTER, 1976; DURANTI; GIUS, 1997).

Classificada como vicilina e representando mais da metade da composição proteínica do feijão, a faseolamina é uma glicoproteína formada por manose, xilose, fucose e N-acetilglucosamina (9 – 10 % de carboidrato) e uma grande estrutura polipeptídica (~100 – 150 kDa) cujo arranjo quaternário compacto consiste de duas a três subunidades polipeptídicas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  com massas moleculares que variam de 43 kDa a 53 kDa e os pontos isoelétricos de 5,0 a 5,5 (FUENTE et al., 2012; LÓPEZ-PEDROUSO et al., 2014; MARSHALL; LAUDA, 1975; MONTOYA et al., 2010; WILCOX; WHITAKER, 1984). A estrutura secundária monomérica é formada por folhas- $\beta$  e *random coil*, predominantemente, e a sequência primária é pobre em aminoácidos metionina e cisteína.

A estabilidade estrutural da faseolamina trimérica é basicamente mantida por forças intramoleculares de interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio, sendo que as ligações dissulfídicas não contribuem na manutenção da estabilidade. Apresenta temperatura de desnaturação ( $T_d$ ) próximo de 90 °C em pH 7 (tampão fosfato 10 mmol.L<sup>-1</sup>) e sua estrutura permanece enovelada na ausência ou presença dos íons cloreto (1 M) ou brometo (1 M) em condição de pH 7, porém, no mesmo pH a estrutura desenovela quando em presença dos íons iodeto (1 M) ou tiocianato (1 M) (DANIELSSON, 1949a; HARADA; MIYAIRI; MURAI, 2010; LAWRENCE et al., 1994; LÓPEZ-PEDROUSO et al., 2014; MARINIELLO et al., 2007; MARSHALL; LAUDA, 1975; YIN et al., 2011)

A faseolamina possui comportamento de associação-dissociação da cadeia polipeptídica dependente do pH: quando há variação do pH, ocorrem mudanças nas características estruturais e de sedimentação da proteína. Conforme Sun et al. (1974) e, posteriormente, confirmado por Lawrence et al. (1994), a forma trimérica dessa vicilina é formada em condições de alta acidez, neutralidade e baixa alcalinidade, enquanto as formas dodecamérica e monomérica ocorrem em condições de baixa acidez e alta alcalinidade, respectivamente (TABELA 1.2).

Tabela 1.2 - Propriedades físicas da fração proteica faseolamina de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) em função do pH.

	Conformação da faseolamina		
	Dodecamérica	Trimérica	Monomérica
pH da solução	3,8<pH<5,4	pH<3,0 ou 6,4<pH<10,5	pH>11,5
Coefficiente de sedimentação	18S	7S	3S
Massa molecular	~650 kDa	~160 kDa	~50 kDa

<sup>1</sup>Fonte: Sun et al. (1974).

A exemplo de Sun et al. (1974) e Lawrence et al. (1994), muitos outros autores mencionam o arranjo quaternário da faseolamina como trimérico, entretanto, evidências apontam haver três tipos dessa vicilina entre as variedades de feijão selvagens e domesticadas. Os tipos de faseolaminas podem ser classificados em Tendergreen (T), Sanilac (S) e Inca (I), sendo que T-faseolamina tem arranjo trimérico enquanto S- e I-faseolamina possuem arranjos diméricos (BROWN et al., 1981; KOENIG; SINGH; GEPTS, 1990). T- e S-faseolamina possuem cadeia polipeptídica de maior massa molecular (~52 kDa) e I-faseolamina não a tem. Buscando caracterizar o número de cadeias polipeptídicas do arranjo de faseolaminas, 40 variedades de feijão dos seis continentes do globo foram analisadas por eletroforese (YAO et al., 2016): 36 variedades da leguminosa possuem o tipo S-faseolamina e o restante o tipo T-faseolamina. Ao contrário da forma trimérica, nenhum estudo foi encontrado que descreva o comportamento associação-dissociação dependente do pH da faseolamina dimérica.

Outra globulina presente nas variedades de feijão é a legumina 11S que apresenta estrutura quaternária hexamérica (330 – 410 kDa) formada por subunidades (80 – 60 kDa) constituídas por duas cadeias polipeptídicas, uma ácida (60 – 40 kDa) e outra básica (35 – 20 kDa), ligadas por interações dissulfídicas, e pontos isoelétricos que variam de 4,5 a 5,0. A composição de aminoácido das leguminas é rica em glutamina, asparagina e glicina e pobre em aminoácidos sulfurados (DANIELSSON, 1949b; HENNIG; SCHLESIER, 1994; LAWRENCE et al., 1994; MENG; MA, 2001; MÜHLING; GILROY; CROY, 1997).

Não foi encontrado nenhum relato científico sobre a associação-dissociação da estrutura molecular de leguminas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Por outro lado, foram encontradas confirmações da associação-dissociação da estrutura molecular dependente do pH e, também, da força iônica ( $\mu$ ) de lentilha (JARPA-PARRA et al., 2015) e ervilha (GUEGUEN et al., 1988). Os últimos pesquisadores estudaram o fenômeno de associação-dissociação das leguminas de ervilha e observaram que em pH 7 e baixa força iônica ( $\mu < 0,05$ )

há formação de agregados, levando à formação de solução turva e há estabilização do estado nativo da proteína (12S) em pH 7 e alta força iônica ( $\mu > 0,4$ ). Subirade, Gueguen, Schwenke (1992) também verificaram que a legumina da ervilha se oligomeriza (12S) em pH neutro e  $\mu \geq 0,1$  e dissocia (2 – 4S) quando as condições de pH forem extremas de acidez ou de alcalinidade e  $\mu \geq 0,05$  (TABELA 1.3). Observação declarada por esses estudos é a presença simultânea de polipeptídeos de coeficientes de sedimentação 3S, 7S e 12S quando o pH variar de 3,5 a 7,0. E, por fim, Gueguen et al. (1988) observaram a irreversibilidade da dissociação da legumina de ervilha ocorrida nos valores extremos de pH.

Tabela 1.3 - Influência do pH e força iônica sobre as características moleculares de legumina de ervilha.

	Conformação da faseolamina	
	Hexamérica	Monomérica
pH da solução <sup>1</sup>	7,0 < pH < 9,0	3 < pH ou pH > 11
Força iônica <sup>2</sup>	$\mu \geq 0,1$	$\mu \geq 0,05$
Coefficiente de sedimentação <sup>2</sup>	12,7S	2-4S
Massa molecular	~360 kDa	~60-65 kDa

Fontes: Gueguen et al. (1988), Subirade, Gueguen & Schwenke (1992).

<sup>1</sup>Força iônica ( $\mu$ ) de 0,1; <sup>2</sup>Tampão glicina pH 10,6.

Rui et al. (2011), em estudo comparativo por eletroforese desnaturante e não desnaturante do perfil proteico de nove variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), descreveram significativa similaridade entre as composições proteica das variedades, sobretudo, a presença da vicilina 7S de massa molecular em torno de 47 kDa. Os autores observaram que na presença do agente desnaturante ( $\beta$ -mercaptoetanol) as bandas das subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) da vicilina 7S permaneciam presente, característica diferente da observada na banda das leguminas (~66 kDa). Isto porque as subunidades da vicilina não se dissociam ao passo que a subunidade das leguminas se dissociam nas unidades ácida (~40 kDa) e básica (~20 kDa) pelo rompimento da interação dissulfídica em condições desnaturante. A mesma característica da vicilina 7S foi observada na avaliação eletroforética do isolado proteico do feijão “pinto” (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto) preparado usando solução tampão fosfato de sódio pH 8,0 e precipitação isoelétrica (TAN; NGOH; GAN, 2014): a presença de uma fração de massa molecular 47 kDa cuja estrutura permanecia inalterada na

presença do  $\beta$ -mercaptoetanol, aspecto que indica que a interação entre cadeias polipeptídicas é desprovida de interação dissulfídica.

### 1.1 - Processo de purificação de proteína de leguminosas

Os processos de extração de proteínas mais citados na literatura para produção de extratos proteicos de leguminosas destinados a aplicação industrial compreendem as etapas de enriquecimento e de recuperação em função do alto rendimento de extração proteica. A combinação dessas etapas conduz a produção de extratos proteicos classificados segundo o teor proteico em concentrado (teor<sub>mínimo</sub> = 68 %) ou isolado (teor<sub>mínimo</sub> = 88 %) (BRASIL, 2005).

O enriquecimento constitui a etapa em que se promove a solubilização das proteínas e pode ser realizada por meio das solubilizações alcalina, ácida, salina ou aquosa e a recuperação ou precipitação das proteínas é efetuada modulando as condições de pH (precipitação isoelétrica), de força iônica (precipitação salina - fenômeno *salting out*) ou por diferença dos tamanhos moleculares (ultrafiltração) (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010).

As técnicas eleitas para a execução da etapa de enriquecimento definem a quantidade a ser recuperada de proteína. As condições do processo de enriquecimento (solubilização) influenciam no teor, no perfil de proteínas e na preservação das características estrutural e funcional das proteínas extraídas (BODZON-KULAKOWSKA et al., 2007; DE LA FUENTE et al., 2011; STONE et al., 2015). As frações proteicas que compõem as sementes leguminosas predominantemente são albuminas e globulinas, características que permitem administrar a etapa de enriquecimento, pela alteração da técnica de solubilização, para melhor selecionar frações proteicas (STONE et al., 2015).

Muito empregada na produção de extratos proteicos de soja, a técnica de solubilização alcalina por hidróxido de sódio (NaOH) é realizada adicionando o agente alcalino à farinha desengordurada dispersa em água destilada. Em meio alcalino, ocorre desprotonação dos grupos aminos das proteínas ( $-\text{NH}_3^+ \rightarrow -\text{NH}_2$ ), tornando a cadeia polipeptídica carregada negativamente, o que induz o aumento das interações proteína-água e, conseqüentemente, aumenta a solubilização da biomolécula (DAMODARAN, 2010; ROTHSTEIN, 1993). O ponto crítico da solubilização alcalina é a desnaturação que pode ser irreversível em função do desdobramento das estruturas quaternária e terciária promovido em pH altos. O efeito de quatro valores de pH (8, 9, 10 e 11) na solubilização alcalina (NaOH) foi

avaliado na extração de proteínas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) por Ruiz et al. (2016). Os autores constataram que o rendimento de proteínas extraídas aumentou em função do aumento do pH: mínimo de 36,3 % (m/m) e máximo de 52,0 % (m/m). Em contrapartida, verificaram que houve aumento da desnaturação, redução da solubilidade e diminuição da pureza dos produtos proteicos obtidos nas extrações realizadas em pH 10 e 11. Por outro lado, as proteínas extraídas em pH 8 e 9 apresentaram melhor capacidade de formação de géis uma vez que esses eram autossustentáveis com redes microestruturais densas.

A etapa de solubilização das proteínas no processo de extração também pode ser realizada em meio salino: a interação proteína-sal proporciona estabilização estrutural às macromoléculas. A solubilidade proteica aumenta em baixa concentração salina devido à neutralização eletrostática das cargas proteicas promovida pelas interações eletrostáticas entre os íons do sal e os grupos ionizáveis das cadeiras laterais dos aminoácidos, evento denominado efeito *salting in* (DAMODARAN, 2010; ROTHSTEIN, 1993; WHITIFORD, 2007). O efeito *salting in* é comprometido se houver aumento significativo da força iônica: o aumento de íons ao redor das moléculas proteicas conduz, instantaneamente, à redução da interação iônica com a superfície proteica e ao aumento da interação sal-água. O incremento das interações atrativas proteína-proteína se restabelece levando à formação de agregados, resultado do efeito *salting out* (DAMODARAN, 2010; WHITIFORD, 2007; ROTHSTEIN, 1993). O teor e o perfil de proteínas solubilizadas em meio salino são influenciados pela identidade do sal empregado, pela concentração do sal, pela proporção de farinha desengordurada:solução salina e pela temperatura (EVANS; KERR, 1963; OOMAH; MAZZA; CUI, 1994).

Ishino & Ortega D. (1975) afirmaram que o isolado proteico de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) extraído por solubilização salina (0,5 M NaCl pH 7,5) é constituído basicamente de globulina (75 % das proteínas). Hojilla-Evangelista et al. (2018) quantificaram de 79,1 a 82,4 % de proteínas em extratos proteicos de quatro variedades de feijões comuns (*Phaseolus vulgaris*) produzidos por solubilização salina (500 mM NaCl) em pH 6,13. E, buscando preparar extratos proteicos de feijão comum ricos em vicilinas, Shen & Tan (2014) e Tang & Sun (2011) aplicaram a solubilização salina e ácida (500 mM NaCl + 25 mM HCl, pH 3,5) e relataram, respectivamente, teores proteicos de 82,1 e 82,7 %. Comumente, no processo de produção de isolados proteicos por solubilização salina, as albuminas são descartadas após o processo de diálise contra água ultra pura (AJIBOLA et al., 2016).

A etapa consecutiva à solubilização é a recuperação da proteína que pode ser executada por precipitação ou por ultrafiltração, geralmente, seguida por uma operação unitária de secagem. A precipitação pode ser realizada empregando condições ácidas (HCl) ou saturadas por sulfato de amônio (efeito *salting out*). A precipitação proteica que consiste na redução do pH do sobrenadante recuperado na solubilização é comumente chamada de precipitação isoelétrica (pH 4,5) e, análogo à solubilização alcalina, é a técnica de recuperação mais empregada nos muitos estudos publicados. Nesta técnica, a precipitação das proteínas ocorre como consequência da redução da hidratação das moléculas proteicas que existe na faixa de pH 4-5. Sabe-se que as proteínas apresentam solubilidade mínima nessa faixa porque há neutralização das cargas elétricas líquidas, ou seja, há redução da repulsão eletrostática permitindo que haja a formação de agregados proteicos. Shevkani et al. (2015) produziram isolados proteicos de feijão comum por solubilização alcalina (pH 9,0) seguida de precipitação isoelétrica (pH 4,5) e liofilização do precipitado. Os autores relataram que o perfil de proteínas isoladas era composto basicamente por estruturas globulares, vicilina (7S) e leguminas (11S).

Outra técnica de recuperação das proteínas é a ultrafiltração que emprega membranas que seletivamente retêm as moléculas pelos tamanhos moleculares. A recuperação proteica por ultrafiltração é considerada pelos estudiosos uma excelente escolha devido à preservação estrutural das macromoléculas, porém, é indispensável à etapa de solubilização (MOHAMMAD et al., 2012). Extrações das frações albumina e globulina do feijão africano (*Sphenostylis stenocarpa*) foram realizadas por solubilizações aquosa e alcalina e os métodos de precipitação isoelétrica e ultrafiltração foram comparados entre si no estudo de Arogundade et al. (2014). Os autores verificaram que a ultrafiltração mostrou-se mais eficiente na recuperação de proteínas solubilizadas em água (62 %) e em meio alcalino (92 %) e também resultou em produtos proteicos com menor e maior teor de ácido fítico e de taninos, respectivamente, (AROGUNDADE et al., 2014).

A influência do método de enriquecimento e recuperação escolhido para realizar a extração das proteínas estende-se às propriedades funcionais desempenhadas pelo produto proteico recém fabricado. A produção de isolado proteico de ervilha (*Pisum sativum* L.) foi estudada para avaliar os efeitos dos métodos de extração sobre o teor de proteína de isolados proteicos e suas propriedades funcionais (STONE et al., 2015). Os métodos usados foram solubilização alcalina e precipitação isoelétrica (API) e solubilização salina e diálise (SD), sendo observado que o isolado proteico extraído por API apresentou maior teor de proteína (83,3 - 86,9 %) que o extraído por SD (71,5 - 79,3 %). Entretanto, apesar de exibir menor

conteúdo proteico, o isolado preparado pelo método salino exibiu maiores capacidades de formação de espuma e emulsão, baixa estabilidade espumante e alta estabilidade emulsificante. Baseando nisso, os pesquisadores concluíram que o isolado preparado pelo método salino foi o melhor, sobretudo, em termos de desempenho das propriedades funcionais (STONE et al., 2015).

Isolados proteicos de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) foram produzidos por três métodos de extração: (i) solubilização alcalina (pH 9) seguida de precipitação isoelétrica (IPI), (ii) solubilização alcalina (pH 9) e ultrafiltração (IUF) e, por último, (iii) solubilização em água deionizada (pH 5) seguida de centrifugação (IF). Foi observado que os isolados IPI e IF eram constituídos basicamente de globulinas e albuminas, respectivamente, enquanto o isolado IUF apresentava as duas frações proteicas sendo a quantidade de globulinas maior que albuminas. Além disso, verificou-se que a composição dos isolados proteicos influenciou na temperatura de gelificação: o isolado rico em albuminas (IF) apresentou a menor temperatura de gelificação (~68 °C), seguido pelo isolado produzido por ultrafiltração (~78 °C) e por último pelo preparado pela precipitação isoelétrica (~85 °C), todos testados na mesma concentração (10 % - m/v) (PAPALAMPROU et al., 2009).

## **2 - Propriedades funcionais das proteínas**

Uma vez definido o grupo alimentar, os critérios usados pelo consumidor para fazer a distinção entre uma marca e outra são as características sensoriais e a presença de benefícios à saúde. Dando ênfase aos atributos sensoriais, é consenso que as interações intermoleculares envolvendo as proteínas e os componentes/ingredientes do alimento são, comumente, responsáveis pelas características sensoriais. Para ser apontada como ingrediente vantajoso, uma proteína precisa exibir várias funcionalidades tecnológicas que se referem às propriedades físico-químicas que interferem no desempenho das proteínas dos sistemas alimentícios durante o processamento, armazenamento, preparo e consumo (DAMODARAN et al., 2010). A propriedade viscoelástica em pães, a suculência de carnes, a formação de coágulo de produtos lácteos, a formação e estabilidade de espumas em sorvete e a formação e estabilidade de sistemas emulsionados como molhos de saladas e maionese são exemplos de situações cuja qualidade de conservação e características sensoriais são altamente

dependentes do desempenho das propriedades técnico-funcionais de proteínas (YADA, 2004; ZAYAS, 1997).

As propriedades técnico-funcionais das proteínas podem ser notadas como expressão de três aspectos moleculares: (i) propriedade de hidratação, (ii) propriedade interfaciais (emulsionante e formação de espuma) e (iii) propriedade reológica (gelificante e espessante). As propriedades físico-químicas que controlam a funcionalidade tecnológica das proteínas são tamanho; forma; composição e sequência dos aminoácidos; carga líquida e distribuição das cargas; razão de hidrofobicidade/hidrofilicidade; tipo de estrutura secundária ( $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha); organização da estrutura terciária e quaternária dos segmentos polipeptídicos; presença de ligação dissulfídica (ligações cruzadas inter e/ou intramolecular); flexibilidade e rigidez molecular; e capacidade de interagir com outros componentes (água, carboidratos, lipídeos e proteínas) (DAMODARAN et. al., 2010; YADA, 2004).

As proteínas de origem animal (leite, ovo e carne) são ingredientes consolidados na indústria de alimentos porque são capazes de realizar múltiplas funções tecnológicas. Por exemplo, a clara de ovo: gelifica, emulsifica, forma espuma e liga-se à água, ou seja, é uma fonte proteica altamente desejável como ingrediente em novas formulações alimentícias. Entretanto, não é novidade que existe no mercado grupo de consumidores que procura por alimentos isentos de proteínas animais, glúten e lactose. Atentos a isso, estudiosos começaram a testar proteínas de origem vegetal, sobretudo de sementes leguminosas, para atender a atual demanda do mercado com novas opções de ingredientes úteis e seguros (JARPA-PARRA et al., 2014; KARACA; LOW; NICKERSON, 2011; PAPALAMPROU et al., 2009; STONE et al., 2015). A sustentabilidade e o baixo custo de produção desses grãos são vantagens que reforçam a escolha por proteínas vegetais, especialmente de culturas domesticadas e de práticas agrícolas amplamente difundidas.

A soja é a semente mais utilizada para produção de proteína vegetal: um ingrediente útil na elaboração de formulações infantis, bebidas, suplementos proteicos, de produtos cárneos e panificados, pois, possui propriedades funcionais (hidratação, interfacial e reológica) apropriadas, além de manter excelentes perfis sensorial e nutricional dos alimentos destinados ao público alérgico às proteínas animais (KINSELLA, 1979; PHILIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994). Mesmo assim, a alta demanda por novas proteínas vegetais tem impulsionado a caracterização das propriedades funcionais de proteínas de outras fontes. Assim, as sementes da família *Fabaceae* ou *Leguminosae* bem como o feijão comum do gênero *Phaseolus* vêm recebendo ampla atenção da comunidade científica. Ciente desse cenário, a proposta desse item foi reunir as informações publicadas sobre as propriedades

funcionais tecnológicas das proteínas nativas e modificadas (via química, enzimática ou física) de extratos proteicos de feijão comum do gênero *Phaseolus* visando futura aplicação industrial (FEYZI; MILANI; GOLIMOVAAHHED, 2018).

## 2.1 - Propriedade de hidratação

A água é um constituinte muito importante no alimento. As características de textura e reológica de um produto alimentício são o resultado da interação da água com outros constituintes do alimento, essencialmente com proteínas e polissacarídeos. A capacidade de retenção de água é uma propriedade importante para a qualidade de alimentos como sopas, produtos de confeitarias, panificação e cárneos (CELLENO et al., 2007). Essa propriedade da proteína reflete a sua habilidade de interagir química e fisicamente com moléculas de água e retê-las em face da ação de forças mecânicas. A capacidade de retenção de água de uma proteína é dependente de sua composição de aminoácidos, do pH, da força iônica, da temperatura, do tipo e da concentração de sal e da conformação proteica (DAMODARAN et. al., 2010). Segundo Damodaran et. al. (2010), a capacidade de retenção de água, também chamada de capacidade de hidratação, é definida como:

$$CRA = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad \text{Equação 1.1}$$

em que CRA é a capacidade de retenção de água,  $m_1$  é a massa (g) de água retida e  $m_2$  é massa (g) de proteína.

Uma série de dados reportado em estudos sobre a capacidade de retenção de água de proteínas de feijão comum do gênero *Phaseolus* é apresentada na Tabela 1.4. A capacidade de retenção de água pode ser relacionada à estrutura das proteínas e a disponibilidade de resíduos de aminoácidos polares, sítios de interação proteína-água (LAFARGA et al., 2018) e, após analisar os resultados da lista de estudos (TABELA 1.4) é possível sugerir que o método de extração (enriquecimento e recuperação) pode interferir no desempenho da capacidade de retenção de água. Isso porque esses dados indicam que valores altos de pH do enriquecimento alcalino pode modificar o arranjo estrutural da proteína (RUIZ et al., 2016), expondo grupos hidrofóbicos antes mantidos no interior da biomolécula, e que a recuperação por ultrafiltração/diafiltração produz extratos proteicos de perfil proteico distinto

daquele obtido através da precipitação isoelétrica. Até o momento, não foi localizado nenhum estudo cujo objetivo fosse relacionar o método de extração com a CRA. Essa ausência de dados incentiva a realização de estudos cujo objetivo seja esclarecer tal possível relação, sobretudo, porque a influência sobre a solubilidade já foi confirmada.

Tabela 1.4 - Propriedades de hidratação de extratos proteicos nativos de variedades de feijão do gênero *Phaseolus*.

Variedade	Processo de extração	Variáveis de extração	Proteína (%) <sup>A</sup>	CRA	Referência
Comum preto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Solubilização alcalina / Precipitação isoelétrica	Dispersão em água (10 mL/g) pH 7,0 por 6 h e precipitação pH 4,5	-	~6,0 g/g	He et al. (2018)
Comum preto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)			81,8 % <sup>1</sup>	10 mg/mL proteína pH 2 → 0,9 g/g pH 7 → 1,0 g/g pH 10 → 0,9 g/g	
Comum Vermelho escuro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização salina (pH 6,15) / Precipitação aquosa	Dispersão em 500 mM NaCl (pH 6,13), 45 °C por 3 h; Liofilização por 3 dias (concentração de sólidos); Diálise 4 °C por 1 semana; Atomização;	79,1 % <sup>1</sup>	10 mg/mL proteína pH 2 → 1,6 g/g pH 7 → 2,0 g/g pH 10 → 1,4 g/g	Hojilla- Evangelista et al. (2018)
Great Northern ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)			80,8 % <sup>1</sup>	10 mg/mL proteína pH 2 → 1,1 g/g pH 7 → 1,6 g/g pH 10 → 1,3 g/g	
Comum Pinto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)			82,4 % <sup>1</sup>	10 mg/mL proteína pH 2 → 2,0 g/g pH 7 → 2,2 g/g pH 10 → 1,2 g/g	
Ganxet ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. Ganxet)	Solubilização alcalina + sonicação / Precipitação isoelétrica	Dispersão em 400 mM NaOH (pH 12), homogeneização (14 000 rpm/30 s), sonicação (4 °C, 40 kHz, 250 W/60 min) e precipitação pH 5,5.	69,59 % <sup>2</sup>	0,98 g/g	Lafarga et al., (2018)

<sup>A</sup>Refere-se ao teor de proteínas do extrato proteico produzido. Os métodos de quantificação: <sup>1</sup> método AOCS Ba4e-93 (Nx6,25); <sup>2</sup> método Bradford; <sup>3</sup>método AOAC 920.87; <sup>4</sup>método Lowry.

Tabela 1.4 - Propriedades de hidratação de extratos proteicos nativos de variedades de feijão do gênero *Phaseolus*. (Continuação)

Variedade	Processo de extração	Variáveis de extração	Proteína (%) <sup>A</sup>	CRA	Referência
Comum Pinto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto)	Solubilização NaHPO <sub>4</sub> / Precipitação não mencionada	Dispersão em NaHPO <sub>4</sub> pH 8,0 (20 mL/g) a 25 °C e 60 min	-	1,65 mL/g	Tan, Ngoh & Gan (2014)
Comum Francês ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Solubilização alcalina / Precipitação isoelétrica	Dispersão em água (4 mL/g) pH 10 por 1 h e precipitação pH 4,5	76,96 % <sup>3</sup>	5,83 mL/g	Wani et al. (2014)
Comum Vermelho ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização NaHPO <sub>4</sub> / Precipitação (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Dispersão em NaHPO <sub>4</sub> pH 8,0 (1:10 - m:v) a 4 °C/2 h; Precipitação: 40 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> → 80 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> → Diálise → Albumina (sobrenadante) e Globulina (precipitado)	Albumina: 41 % <sup>4</sup>  Globulina: 91 % <sup>4</sup>	3,40 mL/g  2,56 mL/g	Mundi & Aluko (2012)

<sup>A</sup>Refere-se ao teor de proteínas do extrato proteico produzido. Os métodos de quantificação: <sup>1</sup>método AOCS Ba4e-93 (Nx6,25); <sup>2</sup> método Bradford; <sup>3</sup>método AOAC 920.87; <sup>4</sup>método Lowry.

Como alterações conformacionais das cadeias polipeptídicas podem influenciar no desenvolvimento da habilidade proteica de reter água, grupos de pesquisas estudam o efeito das modificações químicas, enzimáticas e físicas nos extratos proteicos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) para mensurar as alterações da CRA (TABELA 1.5). Ahmed et al. (2018) averiguaram a implicação do tratamento de alta pressão sobre a capacidade hidratação de extratos proteicos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e detectaram relação positiva entre a propriedade e a intensidade de pressão aplicada seguindo uma equação polinomial de segunda ordem ( $R^2 > 0,92$  e  $p < 0,05$ ). Para estudiosos essa relação positiva é devido às diferenças geradas na conformação da proteína e às mudanças no número e natureza de sítios de ligação com água na molécula proteica.

A CRA de extratos proteicos de feijão comum preto (*Phaseolus vulgaris* L.) conjugados ao monometoxipoli(etilenoglicol) (mPEG) foi examinada por He et al. (2018), que constataram a diminuição da capacidade de retenção entre os extratos nativo e modificado. Embora as diferenças não tenham sido significativas ( $p > 0,05$ ), para os autores, a conjugação produziu o efeito máscara sobre os resíduos de aminoácidos hidrofílicos fato que levou a diminuição da capacidade de retenção de água.

A hidrólise proteolítica é um dos métodos recorrentes entre as tentativas de melhorar as propriedades funcionais das proteínas. Wani et al. (2014) e Wani, Sogi & Gill (2015) avaliaram as propriedades funcionais de extratos proteicos de feijões comuns modificados pela papaína, entre elas, a capacidade de retenção de água e relataram que houve aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) na capacidade de retenção após a hidrólise. A hidrólise enzimática da cadeia polipeptídica produz peptídeos de cadeia curta e exposição de mais cadeias laterais de aminoácidos para interagir com moléculas de água, o que justifica a melhoria da capacidade de retenção de água.

Tabela 1.5 - Propriedades de hidratação de extratos proteicos modificados de variedades de feijão do gênero *Phaseolus*.

Variedade	Extração	Método da modificação	Teor de proteína <sup>A</sup>	CRA	Referência
Comum preto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 7,0) e Precipitação isoeletrica (pH 4,5).	Modificação Química: Conjugação proteína + mPEG-SC:	-	Nativo → ~ 6,0 g/g Conjugado → ~ 5,5 g/g	He et al. (2018)
Black gram, Cultivar Mash 1-1 ( <i>Phaseolus mungo</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 10) e Precipitação isoeletrica (pH 4,5).	Modificação enzimática: • Papaína, 37 °C pH 8,0 por 60 min	83,3 % <sup>1</sup>	Nativo → 6,7 g/g Hidrolisado → 7,0 g/g	Wani, Sogi & Gill (2015)
Black gram, Cultivar PU-19 ( <i>Phaseolus mungo</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 10) e Precipitação isoeletrica (pH 4,5).	Modificação enzimática: • Papaína, 37 °C pH 8,0 por 60 min	86,3 % <sup>1</sup>	Nativo → 6,1 g/g Hidrolisado → 7,1 g/g	Wani, Sogi & Gill (2015)
Comum Vermelho ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 10) e Precipitação isoeletrica (pH 4,5).	Modificação enzimática: • Papaína, 37 °C pH 8,0 por 30 min	80,04 % <sup>1</sup>	Nativo → 5,34 g/g Hidrolisado → 5,48 g/g	Wani et al., (2014b)
Comum Contendor ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 10) e Precipitação isoeletrica (pH 4,5).	Modificação enzimática: • Papaína, 37 °C pH 8,0 por 30 min	83,96 % <sup>1</sup>	Nativo → 5,48 g/g Hidrolisado → 5,64 g/g	Wani et al. (2014)

<sup>A</sup>Refere-se ao teor de proteínas do extrato proteico produzido. Os métodos de quantificação: <sup>1</sup>método AOAC 920.87.

## 2.2 - Solubilidade

A solubilidade é apontada como a mais relevante propriedade funcional de uma proteína porque a eficiência do desempenho das demais propriedades funcionais (interfacial e reológica) depende do quão a proteína se solubiliza em água. A título de exemplo, a taxa de difusão da proteína em direção às regiões interfaciais e a flexibilidade da biomolécula na interface são relacionados à solubilidade, ou seja, a viscoelasticidade do filme formado é dependente da solubilidade no solvente. Portanto, extratos proteicos que exibem a maior solubilidade proteica podem atuar como melhores agentes espumante e emulsificante (FANTINI et al., 2009).

A solubilidade de uma proteína é a manifestação termodinâmica do equilíbrio entre interações proteína-proteína e proteína-água. As principais interações intermoleculares que regem as características de solubilidade das proteínas são de natureza hidrofóbica e iônica. As interações hidrofóbicas governam as interações proteína-proteína, gerando diminuição de solubilidade enquanto as iônicas promovem interações proteína-água levando ao aumento ou diminuição da solubilidade (DAMODARAN et al., 2010).

Segundo as características de solubilidade, as proteínas são classificadas em:

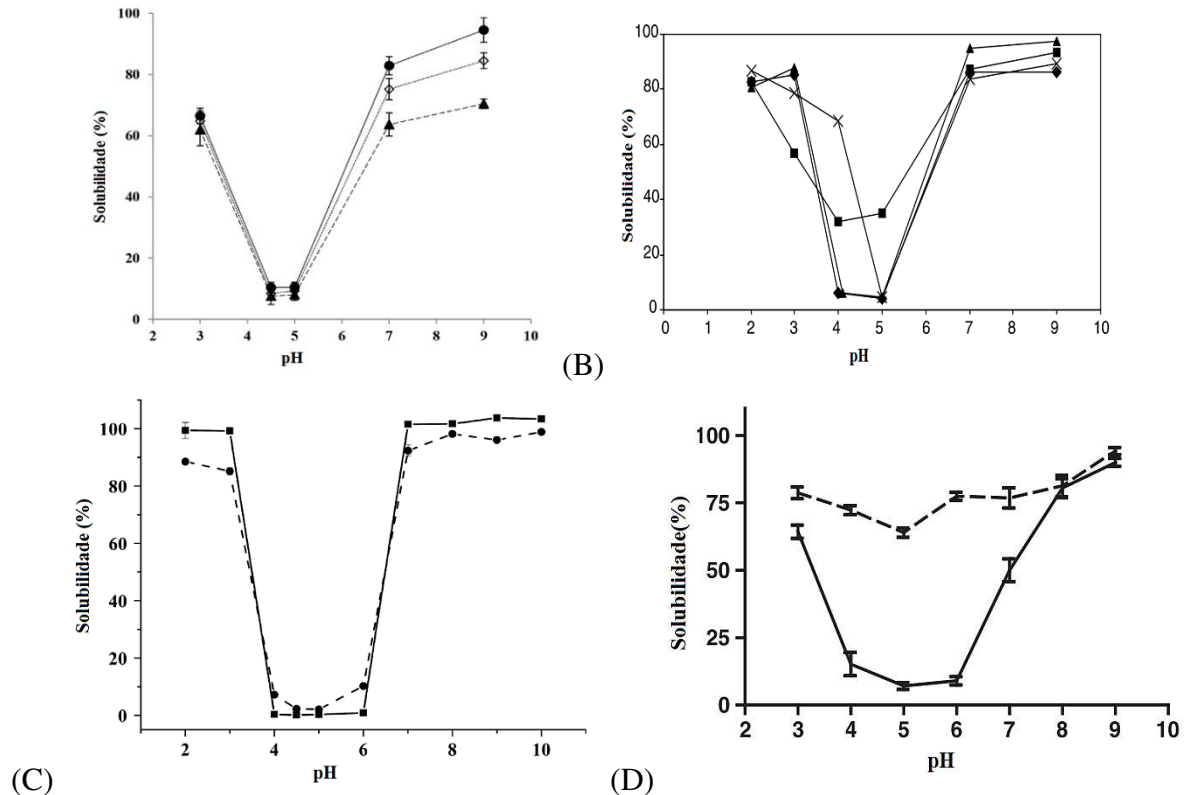
- Albuminas: solúveis em água. Exemplo: ovoalbumina e  $\alpha$ -lactoalbumina;
- Globulinas: solúveis em soluções salinas de baixa concentração (200 mM). Exemplo: vicilinas, leguminas e  $\beta$ -lactoglobulinas;
- Glutelinas: solúveis apenas em soluções ácidas (pH 2,0) e em soluções alcalinas (pH 12). Exemplo: glutelinas de trigo;
- Prolaminas: solúveis em etanol 70 %. Exemplo: gliadina;

A solubilidade das proteínas é influenciada pelos seguintes fatores: pH, força iônica, temperatura e presença de solventes. A curva característica da solubilidade em função do pH da maior parte das proteínas dos alimentos exhibe o formato de “U”. A solubilidade mínima ocorre em proximidade ao ponto isoelétrico das proteínas devido à falta de repulsão eletrostática resultante da presença de carga elétrica superficial líquida neutra, consequentemente, surgem interações eletrostáticas de natureza atrativa seguida de interações hidrofóbicas, o que leva a precipitação e agregação (DAMODARAN et al., 2010).

Os resultados de solubilidade em função do pH de extratos proteicos de feijões comuns do gênero *Phaseolus* exibem o formato “U” com a solubilidade mínima na faixa de pH 4 – 6 (FIGURA 1.1). Além dos fatores citados anteriormente, é observado na literatura

que os extratos proteicos obtidos de variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) podem apresentar diferenças entre os perfis de solubilidade (RAHMATI et al., 2018) (FIGURA 1.1A) e que o método de extração das proteínas pode influenciar no perfil de solubilidade dos extratos proteicos (FIGURA 1.1B). Na etapa de solubilização alcalina, resultados da literatura mostram que o pH empregado pode apresentar correlação negativa com a solubilidade. Isso porque as proteínas solubilizadas dessa forma podem sofrer mudança conformacional ou até modificação estrutural o que promove exposição de grupos hidrofóbicos antes escondidos no núcleo do arranjo estrutural da proteína (RUIZ et al., 2016).

Figura 1.1 - Perfis de solubilidade proteica em função do pH de (A) isolados proteicos de diferentes variedades de feijões comuns (*Phaseolus vulgaris*) produzidos por solubilização alcalina (pH 9) e precipitação isoelétrica (pH 4,5). Variedades: (●) *Speckled Sugar*, (◇) *Red Mexican*, (▲) *Great Northern*; (B) isolado proteico de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) produzido por: solubilização alcalina (pH 8,5), precipitação isoelétrica (pH 4,5) e centrifugação 4000 rpm (◇), solubilização alcalina (pH 8,5), precipitação isoelétrica (pH 4,5) e centrifugação 9900 rpm (▲), solubilização alcalina (pH 8,5) e ultrafiltração (5 kDa) (■) e solubilização salina (2 % NaCl) (x); (C) de produto proteico rico em faseolamina (PRP, ■) e isolado proteico (KPI, ●) de feijão comum; (D) das frações de albumina (- -) e globulina de feijão (-);



(A) Fonte: adaptada de Rahmati et al. (2018); (B) Fonte: adaptada de Makri & Doxastakis (2006); (C) Fonte: adaptada de Yin et al. (2010); (D) Fonte: adaptada de Mundi & Aluko (2012);

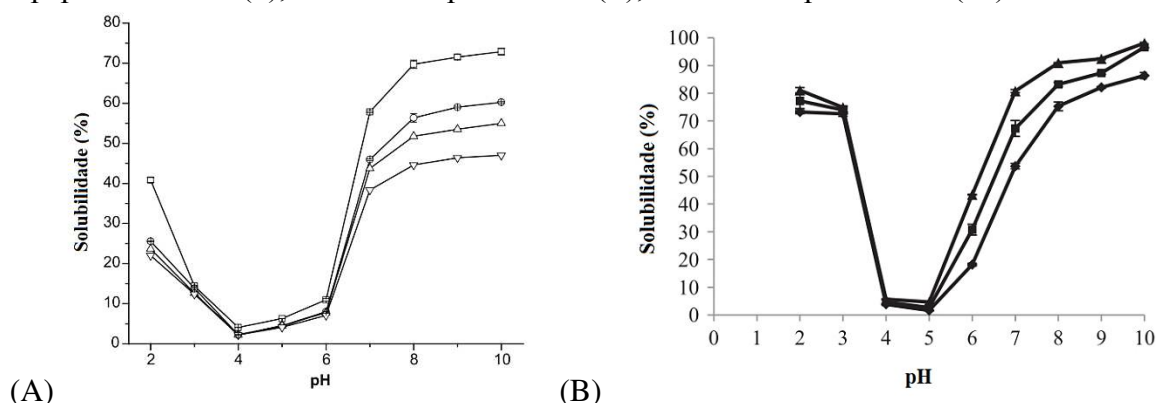
O método de recuperação das proteínas é outro fator que pode interferir no perfil de solubilidade. Makri & Doxastakis (2006) investigaram os efeitos dos métodos de recuperação (precipitação isoelétrica e ultrafiltração) sobre as propriedades funcionais de extratos proteicos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Os pesquisadores observaram que a solubilidade mínima na faixa de pH 4 – 6 das proteínas recuperadas por ultrafiltração foi maior que a obtida pelo processo de precipitação, associando tal diferença ao perfil proteico (albumina e globulina) do extrato proteico recuperado (MAKRI; DOXASTAKIS, 2006).

Yin et al. (2010) avaliaram as propriedades funcionais de extratos proteicos de feijão produzidos por (i) solubilização alcalina e precipitação isoelétrica e (ii) solubilização salina ácida (pH 3,5). Os pesquisadores observaram diferenças de solubilidade nas condições de pH ácido e alcalino e atribuíram tais diferenças à desnaturação na condição alcalina e ao perfil de fração proteica que compõe cada extrato proteico produzido (FIGURA 1.1C). A influência da composição proteica no extrato também foi observada por Mundi & Aluko (2012) que mostraram que as globulinas apresentam solubilidade mínima na faixa de pH 4 – 6 enquanto que a albumina é solúvel em todos os valores de pH 3 – 10 (FIGURA 1.1D). Segundo os pesquisadores, a maior solubilidade da albumina pode ser atribuída à presença e quantidade de glicoproteínas (45 % de conteúdo de carboidrato) quando comparada a globulina (3,9 % conteúdo de carboidrato).

Investigações sobre o efeito de modificação estrutural das proteínas de feijão (*Phaseolus*) sobre a solubilidade demonstram que os resultados são dependentes do método de modificação aplicado (químico, enzimático e físico) (FIGURA 1.2), contudo, em geral, não observa-se melhoria de solubilidade na região do ponto isoelétrico ( $4 < \text{pH} < 5$ ). Resultados da modificação química por meio da conjugação de monometoxipoli(etileno glicol) (mPEG) à moléculas de proteínas de feijão comum preto indicam aumento da solubilidade proteica em  $\text{pH} < 4$  e  $5 > \text{pH} > 12$  (HE et al., 2018). A melhoria da solubilidade observada provem do favorecimento das interações proteína-água que surge com a introdução dos grupos hidrofílicos do mPEG e, provavelmente, da diminuição da agregação induzida pelas interações eletrostáticas, pois, a conjugação leva à redução da carga elétrica superficial da proteína. Ao contrário da conjugação, a modificação química por reticulação enzimática (transglutaminase microbiana – MTGase) não favoreceu a solubilidade de extratos proteicos de feijão do gênero *Phaseolus* (FIGURA 1.2A) (TANG et al., 2008). O processo de reticulação enzimática envolve aplicação de energia na forma de calor com objetivo de desnaturar parcialmente a proteína para expor as cadeias polipeptídicas à ação da MTGase, que leva à modificação conformacional e ao progressivo aumento de massa molecular,

características que não favoreceram as interações proteína-água. Wani et al. (2014) e Wani, Sogi & Gillb (2015) investigaram os efeitos da ação da papaína sobre o perfil de solubilidade de extratos proteicos de feijão comum (*Phaseolus*) e verificaram que os hidrolisados proteicos produzidos exibem melhor solubilidade que as amostras nativas. A Figura 1.2B apresenta o perfil de solubilidade de extratos proteicos nativos e hidrolisados de feijão comum Contendor em função do pH obtido por Wani et al. (2014). Ao examinar o perfil, constata-se que a hidrólise enzimática não proporcionou melhoria de solubilidade na região do ponto isoelétrico ( $4 < \text{pH} < 5$ ), mas, por outro lado, favoreceu o aumento da solubilidade proteica em condições de  $\text{pH} > 5$  e  $\text{pH} 2,0$ . Segundo os autores, o incremento da solubilidade pode ser atribuído a presença de peptídeos de baixa massa molecular e à exposição de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, antes escondidos no interior da biomolécula nativa.

Figura 1.2 - Perfil de solubilidade em função do pH de (A) extratos proteicos reticulados pela transglutaminase microbiana (MTGase), Control ( $\square$ ), K-30 ( $\circ$ ), K-60 ( $\Delta$ ) e K-120 ( $\nabla$ ) indicam as amostras tratadas pela MTGase por 0, 30, 60 e 120 min, respectivamente,; (B) hidrolisados proteicos de feijão comum Contendor (*Phaseolus vulgaris* L.) obtidos pela ação de papaína. Nativo ( $\blacklozenge$ ), hidrolisado por 30 min ( $\blacksquare$ ), hidrolisado por 60 min ( $\blacktriangle$ ).



(A) Fonte: adaptada de Tang et al. (2008); (B) Fonte: adaptada de Wani et al. (2014);

A aplicação de energia na forma de calor é outra opção de modificação estrutural das proteínas e seu efeito sobre a solubilidade de extratos proteicos ricos em vicilina de feijões comuns (*Phaseolus*) foi investigada por Tang, Sun & Yin (2009). Os resultados da pesquisa revelaram que o aquecimento provocou modificação estrutural e, conseqüentemente, favoreceu significativamente a solubilidade do extrato proteico no pH 7. Essa melhoria observada, segundo os pesquisadores, se deve ao aumento da exposição de resíduos carregados na superfície da proteína, conseqüência do desenovelamento causado pelo aquecimento (TANG; SUN; YIN, 2009). A adoção do tratamento de altas pressões para fins

de conservação de alimentos é uma realidade industrial e a implicação desse tratamento sobre a solubilidade das proteínas do extrato rico em vicilinas de feijão comum vermelho (*Phaseolus vulgaris* L.) foi averiguada por Yin et al. (2008) que relatam melhora na solubilidade dos extratos proteicos tratados com pressão superior a 400 MPa. Os pesquisadores alegaram que a aplicação de altas pressões nas proteínas pode provocar o desenovelamento estrutural, o que conduz a formação de novas ligações dissulfídicas, fato que está envolvido na formação de agregados solúveis (YIN et al., 2008).

### 2.3 - Sistemas interfaciais

As proteínas são moléculas anfifílicas, o que significa que possuem, em sua cadeia polipeptídica, trechos hidrofóbico e hidrofílico. Essa característica fornece às proteínas a capacidade de interagirem, simultaneamente, com moléculas hidrofóbica e hidrofílica. Quando as proteínas são acrescentadas a dispersões, essas biomoléculas migram espontaneamente do volume total das dispersões para a região de contato entre as fases, denominada interface, e adsorvem nela, o que permite que haja interação simultânea com as fases. Essa capacidade das proteínas de adsorverem na região interfacial as inclui no grupo de substâncias tensoativas/surfactantes.

Em sistemas alimentícios, a utilização das proteínas na produção de emulsões e espumas é muito relevante e possível porque essas biomoléculas são anfifílicas. Contudo, existem diferenças expressivas no desempenho de suas habilidades interfaciais atribuídas às diferenças de conformação das proteínas, de flexibilidade da cadeia polipeptídica, de capacidade de adaptação a mudanças no meio (pH, força iônica, temperatura, etc.) e ao padrão de distribuição de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na superfície proteica, fatores conformacionais que, de forma interdependentes, influenciam a propriedade ativa de interface das proteínas. Resumindo, é consenso na literatura que as proteínas que apresentam a propriedade tensoativa almejada exibem: (i) capacidades de difundir e adsorver rapidamente na interface e (ii) de desdobrar-se com rapidez (flexibilidade) e reorientar-se na região interfacial e (iii) uma vez na interface, tenham habilidade de interagir com moléculas vizinhas e, assim, formar uma forte película coesiva e viscoelástica que possa suportar movimentos térmicos e mecânicos (DAMODARAN, 1990; DICKINSON, 1992).

Emulsões e espumas são sistemas coloidais termodinamicamente instáveis. O equilíbrio cinético desses sistemas é alcançado com o uso de um tensoativo ou surfactante

adequado que adsorve na interface entre as fases imiscíveis, promovendo redução efetiva da tensão interfacial. Tensioativos de estrutura molecular pequena, como lecitina, fosfolipídios e monoacilglicerol, ou macromoléculas, como proteínas, são exemplos de substâncias anfifílicas empregadas em emulsões e espumas alimentícias. As proteínas costumam ser menos efetivas do que tensioativos de baixa massa molecular na diminuição da tensão interfacial, entretanto, formam uma película viscoelástica na interface, o que fornece resistência mecânica, e os sistemas coloidais preparados por polipeptídeos são mais estáveis do que aqueles formados com surfactantes de baixa massa molecular.

A flexibilidade molecular é a propriedade molecular que causa mais impacto sobre a propriedade interfacial das proteínas. Essa propriedade refere-se à capacidade da proteína de sofrer mudança conformacional rapidamente quando as condições do ambiente são diferentes. As moléculas altamente flexíveis podem sofrer mudanças conformacionais rápidas quando adsorvidas na interface, permitindo que mais segmentos polipeptídicos se conectem a interface. As caseínas e albumina sérica bovina são exemplos de proteínas flexíveis. Em contrapartida, as proteínas globulares com estrutura compacta e rígida, como as proteínas de soja e de feijão, não podem passar por mudanças conformacionais expressivas.

### **2.3.1 - Emulsão**

Diversos gêneros alimentícios naturais ou industrializados, como leite, molhos para salada, bolos, creme de leite, são produtos do tipo emulsão (DAMODARAN, 2010). Emulsão é uma dispersão formada por dois líquidos imiscíveis, comumente óleo e água, sendo que um dos líquidos está disperso, no outro, na forma de gotículas esféricas com tamanhos variando entre 0,1 e 100  $\mu\text{m}$ . Comumente, as emulsões são classificadas segundo a distribuição das fases óleo e água. Um sistema que consiste de gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa é chamado de emulsão óleo em água (oil/water – O/W), por exemplo, leite, molhos de saladas, maionese. O sistema que é formado por gotas de água dispersas em uma fase oleosa é chamado de emulsão água em óleo (water/oil – W/O) (MCCLEMENTS, 2005). Damodaran et. al. (2010) afirmaram que alimentos que sejam verdadeiras emulsões água em óleo dificilmente existem: manteiga e margarina são formadas por gotículas aquosas que estão embebidas em uma gordura plástica, o derretimento desse sistema produz uma emulsão água em óleo que, imediatamente, sofre separação de fases.

A produção de emulsão envolve óleo, água, emulsificante e energia, geralmente, a mecânica que é aplicada com objetivo de aumentar a superfície de contato entre as fases e,

simultaneamente, permitir a difusão do emulsificante para a interface formada. As proteínas são os emulsificantes prioritários para a produção de emulsões alimentícias, especificamente, as de origem animal por desempenharem com excelência sua habilidade interfacial (ZAYAS, 1997). A habilidade emulsificante das cadeias polipeptídicas está diretamente associada à estrutura das proteínas, massa molecular, estabilidade conformacional, composição de aminoácidos (cadeias laterais carregadas ou não, hidrofóbicas ou hidrofílicas), solubilidade em água, hidrofobicidade superficial das biomoléculas e, também, a fatores físico-químicos incluído temperatura, pH e/ou força iônica (BESSADA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2019). As propriedades emulsificantes de proteínas dependem basicamente de dois efeitos, segundo Wani et al. (2014): (i) da considerável diminuição da energia interfacial devido à adsorção de proteínas na região interfacial óleo-água e (ii) das barreiras das energias eletrostática, estrutural e mecânica causadas pela camada interfacial que se opõem aos processo de desestabilização.

#### a) Propriedades emulsificantes de extratos proteicos de feijão

As avaliações das propriedades emulsificantes de extratos proteicos de feijão comum do gênero *Phaseolus* são realizadas, principalmente, através de parâmetros que descrevem as propriedades das proteínas alimentícias: índice da atividade emulsificante, da capacidade de emulsão, da distribuição dos tamanhos das gotículas formadas e/ou da estabilidade da emulsão. O índice de atividade emulsificante (EAI) corresponde à área interfacial criada por unidade de massa de proteína que, comumente, é estimado pelo método turbidimétrico (PEARCE; KINSELLA, 1978). A estabilidade da emulsão (ES), também estimada por método turbidimétrico (PEARCE; KINSELLA, 1978), fornece medida da estabilidade das emulsões ao longo de um período definido que retrata a capacidade das gotículas de permanecerem dispersas sem que desencadeiem os mecanismos de desestabilização de emulsões (DICKINSON, 1987; ZAYAS, 1997)

As globulinas são as proteínas de reserva predominantes entre variedades de feijão comum (DE LA FUENTE et al., 2011) e apresentam excelentes propriedades emulsificantes (HOJILLA-EVANGELISTA et al., 2018). Contudo, entre as proteínas globulares, a vicilina 7S possui propriedades emulsificantes melhores que a legumina 11S, provavelmente, porque exibe maiores solubilidade, hidrofobicidade de superfície e flexibilidade conformacional da vicilina (SHEN; TANG, 2014; TANG; SUN, 2011a; YIN et al., 2010). Ao comparar vicilinas extraídas de feijão comum, feijão vermelho e feijão Mung,

Shen & Tang (2014) confirmaram as boas habilidades emulsificantes das vicilinas. Sabe-se que o conjunto de técnicas de extração de proteínas tem o poder de selecionar as proteínas e tornar um extrato mais rico em vicilina ou não, fato que leva a considerar o processo de extração das proteínas como um fator tecnológico que pode ser testado, para que possa ser usado na produção de ingrediente proteico com a propriedade emulsificante desejável.

O perfil de solubilidade em função do pH é tida como relevante parâmetro para estimar as propriedades emulsificantes de extratos proteicos de variedades de feijão comum vermelho porque sabe-se que as propriedades EAI e ES são mínimas na região do ponto isoelétrico, característica intrínseca a variedade da semente, sendo também mínima a solubilidade das proteínas examinadas. Com base nessas informações, pesquisadores relatam que proteínas insolúveis não são bons agentes emulsificantes e, portanto, emulsões preparadas com tais proteínas não são resistentes aos mecanismos de instabilidade (TANG; SUN, 2011b; WANI et al., 2014). A Tabela 1.6 apresenta uma breve lista de resultados de recentes de investigações das propriedades emulsificantes de extratos proteicos nativos de variedades de feijão do gênero *Phaseolus*.

Tabela 1.6 – Propriedades emulsificantes de extratos proteicos nativos de feijões do gênero *Phaseolus*.

Variedade	Extração	Variáveis de extração	EAI (m <sup>2</sup> /g)	ES (min)	Referência
Comum preto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Solubilização alcalina e Precipitação isoelétrica Teor de proteína omitido	Dispersão em água (10 mL/g) pH 7,0 / 6 h e Precipitação pH 4,5.	1 mg/mL em <sup>1</sup> NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 pH 7,0 → 55 m <sup>2</sup> /g	1 mg/mL em <sup>1</sup> NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 pH 7,0 → 75%	He et al. (2018)
Comum preto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização salina e Precipitação aquosa Teor de proteína 81,8 %		10 mg/mL proteína <sup>1</sup> pH 2 → 108,6 m <sup>2</sup> /g pH 7 → 70,1 m <sup>2</sup> /g pH 10 → 387,8 m <sup>2</sup> /g	10 mg/mL proteína <sup>1</sup> pH 2 → 12,8 min pH 7 → 39,1 min pH 10 → 82,4 min	
Vermelho escuro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização salina e Precipitação aquosa Teor de proteína 79,1 %	Dispersão em 500 mM NaCl (pH 6,13), 45 °C por 3 h → Liofilização (3 dias) para concentração de sólidos →	10 mg/mL proteína <sup>1</sup> pH 2 → 112,2 m <sup>2</sup> /g pH 7 → 65,8 m <sup>2</sup> /g pH 10 → 378,8 m <sup>2</sup> /g	10 mg/mL proteína <sup>1</sup> pH 2 → 23,4 min pH 7 → 45,0 min pH 10 → 47,1 min	Hojilla- Evangelista et al. (2018)
Great Northern ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização salina e Precipitação aquosa Teor de proteína 80,8 %	Diálise 4 °C/1 semana → Liofilização	10 mg/mL proteína <sup>1</sup> pH 2 → 131,3 m <sup>2</sup> /g pH 7 → 51,8 m <sup>2</sup> /g pH 10 → 379,7 m <sup>2</sup> /g	10 mg/mL proteína <sup>1</sup> pH 2 → 13,4 min pH 7 → 52,0 min pH 10 → 43,7 min	
Comum Pinto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização salina e Precipitação aquosa Teor de proteína 82,4 %		10 mg/mL proteína <sup>1</sup> pH 2 → 139,8 m <sup>2</sup> /g pH 7 → 60,1 m <sup>2</sup> /g pH 10 → 384,5 m <sup>2</sup> /g	10 mg/mL proteína <sup>1</sup> pH 2 → 13,1 min pH 7 → 47,6 min pH 10 → 105,8 min	
Francês amarelo ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Solubilização alcalina e Precipitação isoelétrica Teor de proteína 76,96 %	Dispersão em água (4 mL/g) pH 10 por 1 h e precipitação pH 4,5	0,2 % proteína <sup>1</sup> pH 3: 19,16 m <sup>2</sup> /g pH 5: 8,24 m <sup>2</sup> /g pH 7: 48,92 m <sup>2</sup> /g	0,2 % proteína <sup>1</sup> pH 3: 12,84 min pH 5: 15,91 min pH 7: 19,03 min	Wani et al. (2014)

EAI: índice de atividade emulsificante; EC: capacidade emulsificante; ES: estabilidade emulsificante; <sup>1</sup>Método Pearce & Kinsella (1978).

Tabela 1.6 - Propriedades emulsificantes de extratos proteicos nativos de feijões do gênero *Phaseolus*. (Continuação)

Variedade	Extração	Variáveis de extração	EAI (m <sup>2</sup> /g) / EC (%)	ES (min) / (%)	Referência
Vermelho ( <i>Phaseolus angularis</i> )	Solubilização salina ácida (pH 3,5) e precipitação aquosa	Dispersão em 500 mM NaCl e 25 mM HCl (pH 3,5) por 2 h. Precipitação aquosa.	0,5 % proteína em NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 pH 3→~30 m <sup>2</sup> /g pH 5→~15 m <sup>2</sup> /g pH 7→~60 m <sup>2</sup> /g pH 9→~70 m <sup>2</sup> /g	0,5 % proteína em NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 pH 3→~27 min pH 5→~15 min pH 7→~30 min pH 9→~32 min	Tang & Sun (2011a)
Vermelho ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização salina (NaHPO <sub>4</sub> ) e Precipitação com saturação de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Dispersão em NaHPO <sub>4</sub> pH 8,0 (1:10 - m:v) a 4 °C / 2 h; Precipitação: 40 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> → 80 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> → Diálise → Albumina (sobrenadante) e Globulina (precipitado)	Albuminas: 12,5 % proteína pH 3→D <sub>3,2</sub> =20 nm pH 5→D <sub>3,2</sub> =18 nm pH 3→D <sub>3,2</sub> =22 nm pH 3→D <sub>3,2</sub> =20 nm  Globulinas: 12,5 % proteína pH 3→D <sub>3,2</sub> =17 nm pH 5→D <sub>3,2</sub> =17 nm pH 7→D <sub>3,2</sub> =16 nm pH 9→D <sub>3,2</sub> =15 nm	Albuminas: 12,5 % proteína pH 3→ ~35 % pH 5→ 50 % pH 7→ 40 % pH 9→ ~45 % t <sub>final</sub> = 60 min  Globulinas: 12,5 % proteína pH 3→ 80 % pH 5→ ~95 % pH 7→ 80 % pH 9→ ~90 % t <sub>final</sub> =60 min	Mundi & Aluko, (2012)

EAI: índice de atividade emulsificante; EC: capacidade emulsificante; ES: estabilidade emulsificante; <sup>1</sup> Método de Pearce & Kinsella (1978).

As modificações estruturais das cadeias polipeptídicas são consideradas pela comunidade científica uma maneira para alcançar melhoria das propriedades emulsificantes e tais modificações, também, têm sido aplicadas às proteínas de feijões (SHARIF et al., 2018). Na Tabela 1.7 estão reunidos alguns exemplos de propriedades emulsificantes de proteínas modificadas de feijão comum do gênero *Phaseolus* publicadas na literatura.

A implicação de tratamento de alta pressão sobre as propriedades emulsificantes de extratos proteicos de feijão comum vermelho (*Phaseolus vulgaris* L) foi investigada por Yin et al. (2008). Os pesquisadores verificaram que o tratamento causou mudanças positivas nas habilidades emulsificantes: as proteínas tratadas com alta pressão apresentaram melhor atividade emulsificante comparadas às biomoléculas nativas. Os autores afirmaram que o tratamento promoveu o desdobramento da cadeia polipeptídica, aspecto que contribuiu para a melhoria observada. Esses resultados são semelhantes aos apresentados por Ahmed et al. (2018) após aplicação de alta pressão no extrato proteico de feijão comum vermelho (*Phaseolus vulgaris* L).

Outra opção de modificação estrutural dos extratos proteicos de feijão é a ação enzimática. Embora as proteínas de reserva sejam mais resistentes à ação das enzimas (MONTROYA et al., 2008), resultados demonstraram que os hidrolisados proteicos exibem melhores propriedades emulsificantes comparados às proteínas nativas. De acordo com Wani, Sogi & Gill (2015) e Wani et al. (2014), os hidrolisados de proteicos de feijões comuns (*Phaseolus vulgaris* L.) e de feijões *Gram black* (*Phaseolus mungo* L.) obtidos pela ação da papaína apresentaram melhores propriedades emulsificantes comparado às propriedades do extrato proteico nativo. Os estudiosos associaram as diferenças, principalmente, ao aumento da solubilidade dos hidrolisados proteicos promovido pelo desenovelamento estrutural da cadeia polipeptídica, o que causou exposição de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos. Evangelho et al. (2017) compararam os efeitos das modificações enzimáticas (pepsina e alcalase) sobre as propriedades emulsificantes (óleo/água) de extratos proteicos de feijão comum preto (*Phaseolus vulgaris* L.). Os autores verificaram que não houve separação de fases na emulsão preparada com os hidrolisados proteicos obtidos via alcalase ao longo do armazenamento (30 dias, temperatura ambiente). Por outro lado, detectaram separação de fases na emulsão preparada com os hidrolisados obtidos via pepsina já no primeiro dia de armazenamento. Em outras palavras, a emulsão obtida com os hidrolisados produzidos pela ação da alcalase exibiu maior estabilidade cinética. Esse resultado foi relacionado pelos autores à maior hidrofobicidade superficial observada nos hidrolisados obtidos pela alcalase, quando comparados aos obtidos por pepsina (EVANGELHO et al., 2017).

Tabela 1.7 – Propriedades emulsificantes de extratos de proteínas modificados de feijões do gênero *Phaseolus*.

Variedade	Extração	Método da modificação	EAI (m <sup>2</sup> /g)	ES (min)	Referência
Comum ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Solubilização alcalina (pH 8) e Precipitação isoeletrica (pH 4,5) Teor de proteína 80,82 %	Modificação física: Alta pressão Aplicação de pressão: 400 MPa por 15 min	0,5 % proteína em NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 <sup>1</sup> Nativo → 24,2 m <sup>2</sup> /g 400 MPa → 40,4 m <sup>2</sup> /g	0,5 % proteína em NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 <sup>1</sup> Nativo → 68,3 min 400 MPa → 142,3 min	Ahmed et al. (2018)
Comum preto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 7,0) e Precipitação isoeletrica (pH 4,5). Teor de proteína omitido	Modificação Química: Conjugação proteína + mPEG-SC*:	1 mg/mL em NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 <sup>1</sup> Nativo → ~55 m <sup>2</sup> /g Conjugado → ~60 m <sup>2</sup> /g	1 mg/mL em NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 <sup>1</sup> Nativo → ~75 min Conjugado → ~82 min	He et al. (2018)
Black gram, Cultivar Mash 1-1 ( <i>Phaseolus mungo</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 10) e Precipitação isoeletrica (pH 4,5). Teor de proteína 83,3 %	Modificação enzimática: • Papaína, 37 °C pH 8,0 por 30 min	0,2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 3 → 10,1 m <sup>2</sup> /g pH 5 → 4,8 m <sup>2</sup> /g pH 7 → 15,0 m <sup>2</sup> /g Hidrolisado: pH 3 → 21,3 m <sup>2</sup> /g pH 5 → 10,5 m <sup>2</sup> /g pH 7 → 30,8 m <sup>2</sup> /g	0,2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 3 → 17,1 min pH 5 → 32,0 min pH 7 → 22,2 min Hidrolisado: pH 3 → 18,9 min pH 5 → 42,0 min pH 7 → 20,0 min	Wani, Sogi & Gill (2015)
Black gram, Cultivar PU-19 ( <i>Phaseolus mungo</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 10) e Precipitação isoeletrica (pH 4,5). Teor de proteína 86,3 %	Modificação enzimática: • Papaína, 37 °C pH 8,0 por 30 min	0,2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 3 → 13,8 m <sup>2</sup> /g pH 5 → 6,1 m <sup>2</sup> /g pH 7 → 20,5 m <sup>2</sup> /g Hidrolisado: pH 3 → 20,4 m <sup>2</sup> /g pH 5 → 9,4 m <sup>2</sup> /g pH 7 → 40,4 m <sup>2</sup> /g	0,2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 3 → 18,3 min pH 5 → 75,4 min pH 7 → 21,8 min Hidrolisado: pH 3 → 21,1 min pH 5 → 89,0 min pH 7 → 15,8 min	Wani, Sogi & Gill (2015)

\*mPEG-SC: monometoxipoli(etilenoglicol) – carbonato succinimidil; <sup>1</sup>Método Pearce & Kinsella (1978).

Tabela 1.7 - Propriedades emulsificantes de extratos de proteínas modificados de feijões do gênero *Phaseolus*. (Continuação)

Variedade	Extração	Método da modificação	EAI (m <sup>2</sup> /g)	ES (min)	Referência
Comum Vermelho ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 10) e Precipitação isoelétrica (pH 4,5). Teor de proteína 80,04 %	Modificação enzimática: • Papaína, 37 °C pH 8,0 por 30 min	0,2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 3→7,88 m <sup>2</sup> /g pH 5→ 4,15 m <sup>2</sup> /g pH 7→27,91 m <sup>2</sup> /g Hidrolisado: pH 3→29,25 m <sup>2</sup> /g pH 5→19,92 m <sup>2</sup> /g pH 7→50,74 m <sup>2</sup> /g	0,2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 3→12,13 min pH 5→ 15,26 min pH 7→ 13,35 min Hidrolisado: pH 3→12,93 min pH 5→ 19,67 min pH 7→13,78 min	Wani et al. (2014)
Comum Contendor ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 10) e Precipitação isoelétrica (pH 4,5). Teor de proteína 83,96 %	Modificação enzimática: • Papaína, 37 °C pH 8,0 por 30 min	0,2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 3→6,45 m <sup>2</sup> /g pH 5→ 5,30 m <sup>2</sup> /g pH 7→15,71 m <sup>2</sup> /g Hidrolisado: pH 3→20,13 m <sup>2</sup> /g pH 5→ 17,55 m <sup>2</sup> /g pH 7→ 61,01m <sup>2</sup> /g	0,2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 3→19,77 min pH 5→ 14,33 min pH 7→ 18,53 min Hidrolisado: pH 3→19,60 min pH 5→ 20,71 min pH 7→ 15,45 min	Wani et al. (2014)
Comum vermelho ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 8) e Precipitação isoelétrica (pH 4,6). Teor de proteína 92,2 %	Tratamento térmico: 95 °C por 30 min	0,25 % em NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 <sup>1</sup> Nativo→ ~18 m <sup>2</sup> /g 95 °C→ ~30 m <sup>2</sup> /g	-	Tang, Sun & Yin, (2009)
Vermelho ( <i>Phaseolus angularis</i> )	Solubilização alcalina (pH 8) e Precipitação isoelétrica (pH 4,6). Teor de proteína 89,3 %	Tratamento térmico: 95 °C por 30 min	0,25 % em NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 <sup>1</sup> Nativo→ ~15 m <sup>2</sup> /g 95 °C → ~29 m <sup>2</sup> /g	-	Tang, Sun & Yin, (2009)

<sup>1</sup>Método Pearce & Kinsella (1978).

Tabela 1.7 - Propriedades emulsificantes de extratos de proteínas modificados de feijões do gênero *Phaseolus*. (Continuação)

Variedade	Extração	Método da modificação	EAI (m <sup>2</sup> /g)	ES (min)	Referência
Mung ( <i>Phaseolus aureus</i> )	Solubilização alcalina (pH 8) e Precipitação isoelétrica (pH 4,6). Teor de proteína 93,9 %	Tratamento térmico: 95 °C por 30 min	0,25 % em NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 <sup>1</sup> Nativo → ~20 m <sup>2</sup> /g 95 °C → ~37 m <sup>2</sup> /g	-	Tang, Sun & Yin (2009)
Comum vermelho ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Solubilização alcalina (pH 8) e Precipitação isoelétrica (pH 4,6). Teor de proteína omitido	Reticulação enzimática: 1 % MTGase, pH 7,4 por 30 min	0,1 % em NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 <sup>1</sup> Nativo → ~19,5 m <sup>2</sup> /g MTGase → ~15,5 m <sup>2</sup> /g	0,1 % em NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 <sup>1</sup> Nativo → ~33 min MTGase → ~30 min	Tang et al. (2008)
Comum vermelho ( <i>Phaseolus vulgaris</i> . L)	Solubilização alcalina (pH 8) e Precipitação isoelétrica (pH 4,6). Teor de proteína omitido	Modificação física: Alta pressão Aplicação de pressão: 400 MPa	0,1 % em pH 7,0 <sup>1</sup> Nativo → ~28 m <sup>2</sup> /g 400 → ~32 m <sup>2</sup> /g	0,1 % em pH 7,0 <sup>1</sup> Nativo → ~60 min 400 → ~175 min	Yin et al. (2008)

<sup>1</sup>Método Pearce & Kinsella (1978).

### 2.3.2 - Espumas

As espumas são semelhantes às emulsões do tipo óleo em água porque ambas são dispersões de um fluido hidrofóbico em um líquido hidrofílico (DAMODARAN et. al., 2010). A espuma líquida consiste de uma fase gasosa dispersa na forma de bolhas em uma fase aquosa, como é o caso de espumas de bebidas. Embora menos comentada, as espumas sólidas existem e trata-se de uma dispersão de uma fase descontínua de ar em uma fase contínua de sólido, como é o caso de pães e bolos (WALSTRA, 1989).

As espumas são sistemas cuja formação não é espontânea, em outras palavras, é necessária a aplicação de energia para dispersar o ar no líquido e, assim, criar as bolhas (HILL; EASTOE, 2017). Uma espuma pode ser preparada de duas maneiras: (i) por saturação de um líquido com gás, dissolvendo o gás sob pressão e depois liberando a pressão (como nos refrigerantes), ou (ii) por forças mecânicas, por exemplo, por agitação ou batimento, método escolhido para o processamento industrial (DAMODARAN et. al., 2010; WALSTRA, 1989).

As espumas são sistemas termodinamicamente instáveis devido à quantidade de interações intermoleculares desfavoráveis que existem na região superficial de contato. A estabilidade cinética da espuma é possível de ser alcançada, contudo, depende da presença de tensoativo, que é usado para reduzir a tensão interfacial e, conseqüentemente, formar um filme resistente à ruptura (HILL; EASTOE, 2017; WALSTRA, 1989). A estabilização das espumas alimentícias, comumente, é realizada usando proteínas como tensoativos, devido à comprovada habilidade de adsorverem na interface ar/água e formarem filme com maior viscoelasticidade que tensoativos de baixa massa molecular, atributo que potencializa a estabilidade cinética (BOS; VLIET, 2001; PHILIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994).

Durante a formação da espuma, uma sucessão de eventos ocorre: as proteínas solúveis, na conformação entropicamente governada pelas interações favoráveis proteína-água, atingem a interface ar/água por difusão, adsorvem, desenovelam parcialmente, concentram e reduzem a tensão interfacial (PHILIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994). A formação e estabilidade das espumas depende de vários fatores intrínsecos a proteína: tamanho molecular, carga elétrica líquida, taxa de difusão, flexibilidade molecular (taxa de desenovelamento) e proporção de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos (PHILIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994). Para ser considerada bom agente espumante, a proteína deve rapidamente difundir até a interface e adsorver, possuir boa flexibilidade para sofrer desenovelamento e interagir com as proteínas vizinhas na interface ar-água favoravelmente para formar um filme fino e coeso (DAMODARAN, 1990; HILL; EASTOE, 2017).

a) Propriedade espumante de proteínas de feijão

As propriedades espumantes das proteínas de feijão comum do gênero *Phaseolus* são, geralmente, descritas na literatura em termos de dois parâmetros: capacidade espumante e estabilidade cinética de espuma. A capacidade de espuma (*foam capacity* - FC) refere-se à área interfacial (ar/água) criada pela proteína, ou seja, descreve a capacidade de formar uma película fina e resistente na interface ar/água, de modo que grandes quantidades de bolhas de gás possam ser incorporadas e estabilizadas (DAMODARAN et. al., 2010). Já a estabilidade de espuma (*foam stability* – FS) refere-se à habilidade da proteína de estabilizar a espuma frente às forças gravitacionais e mecânica, ou seja, representa a porcentagem volumétrica de espuma que permanece após um período de tempo em relação ao volume inicial (DAMODARAN et. al., 2010).

Segundo estudos comparativos entre albuminas e globulinas de sementes de feijões, as albuminas apresentam melhores propriedades espumantes (GHUMMAN; KAUR; SINGH, 2016; MUNDI; ALUKO, 2012). As menores propriedades espumantes das globulinas são associadas às reduzidas solubilidade e habilidade das proteínas globulares de se desovelarem na superfície, características que limitam a habilidade de retenção do ar dentro das bolhas. A capacidade espumante da proteína está intimamente relacionada à concentração de proteína solúvel, porque as proteínas solúveis podem reduzir a tensão superficial na interface entre as bolhas de ar e o líquido circundante, e podem se desdobrar e interagir umas com as outras para formar filmes de proteínas multicamadas com maior flexibilidade na interface (WANI et al., 2014). Logo, a propriedade espumante das proteínas de reserva de feijão comum pode apresentar dependência do pH, uma vez que a solubilidade proteica está atrelada ao desempenho das habilidades espumantes das cadeias polipeptídicas. Interpretação que pode ser conferida ao analisar alguns resultados de pesquisas sobre as propriedades espumantes de feijão comum do gênero *Phaseolus* (TABELA 1.8).

Hojilla-Evangelista et al. (2018) relataram que o aumento do pH não favoreceu a capacidade espumante das proteínas solúveis de feijões comuns, embora as diferenças entre os extratos proteicos não fossem significativas. Contudo, as espumas eram altamente estáveis: 86 – 96 % do volume permaneceram estáveis após 15 min, independente do pH. Esse resultado é contrário aos relatados por outros pesquisadores, porém, Hojilla-Evangelista et al. (2018) acreditaram que havia repulsões eletrostáticas suficientes para evitar interações proteína-proteína que levam à formação e estabilidade das espumas (KINSELLA, 1976).

As propriedades espumantes de extrato proteico de feijão comum *Ganxet* em função do pH foram determinadas por Lafarga et al. (2018) e, ao contrário encontrado por

Hojilla-Evangelista et al. (2018), os autores verificaram aumento significativo da capacidade espumante das proteínas em pH 10, porém, a maior capacidade espumante detectada durante o estudo foi no pH ácido (pH 2, FC = 65 %). As maiores capacidades espumantes nos pH ácido e alcalino, segundo Lafarga et al. (2018), foram causadas pelo aumento das cargas elétricas líquidas das proteínas, o que enfraqueceu as interações hidrofóbicas, mas, por outro lado, intensificou a flexibilidade molecular das proteínas do feijão comum.

Tabela 1.8 – Propriedades espumantes de extratos proteicos nativos de feijão do gênero *Phaseolus*.

Variedade de feijão	Extração	Variáveis de extração	FC (mL) / (%)	FS (min ou h) / (%)	Referência
Comum Preto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Solubilização alcalina / Precipitação isoelétrica Teor de proteína omitido	Dispersão em água (10 mL/g) pH 7,0, agitação por 6 h, Precipitação pH 4,5	10 % proteína, 10 mM NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 → 7,5 mL	10 % proteína, 10 mM NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 → 30 % t <sub>final</sub> =10 min	He et al. (2018)
Comum Preto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização salina e Precipitação aquosa Teor de proteína 81,8 %		10 mg/mL proteína pH 2 → 126 mL pH 7 → 115 mL pH 10 → 111 mL	10 mg/mL proteína pH 2 → 88 % pH 7 → 97 % pH 10 → 78 % t <sub>final</sub> =15 min	
Vermelho escuro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização salina e Precipitação aquosa Teor de proteína 79,1 %	Dispersão em 500 mM NaCl (pH 6,13), 45 °C por 3 h → Liofilização (3 dias) para concentração de sólidos →	10 mg/mL proteína pH 2 → 127 mL pH 7 → 114 mL pH 10 → 139 mL	10 mg/mL proteína pH 2 → 91 % pH 7 → 86 % pH 10 → 85 % t <sub>final</sub> =15 min	Hojilla- Evangelista et al. (2018)
Great Northern ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização salina e Precipitação aquosa Teor de proteína 80,8 %	Diálise 4 °C/1 semana → Liofilização	10 mg/mL proteína pH 2 → 113 mL pH 7 → 119 mL pH 10 → 110 mL	10 mg/mL proteína pH 2 → 94 % pH 7 → 87 % pH 10 → 88 % t <sub>final</sub> =15 min	
Pinto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização salina e Precipitação aquosa Teor de proteína 82,4 %		10 mg/mL proteína pH 2 → 124 mL pH 7 → 123 mL pH 10 → 129 mL	10 mg/mL proteína pH 2 → 94 % pH 7 → 87 % pH 10 → 88 % t <sub>final</sub> =15 min	

Tabela 1.8 - Propriedades espumantes de extratos proteicos nativos de feijão do gênero *Phaseolus*. (Continuação)

Variedade de feijão	Extração	Variáveis de extração	FC (mL)/(%)	FS	Referência
Ganxet ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. Ganxet)	Solubilização alcalina + sonicação e Precipitação isoelétrica Teor de proteína omitido	Dispersão em 400 mM NaOH (pH 12), homogeneização (14 000 rpm/30 s), sonicação (4 °C, 40 kHz, 250 W/1 h) e precipitação pH 5,5.	1,5 % proteína pH= 2→ 65 % pH= 4→ 35 % pH= 6→ ~35 % pH= 8→ ~30 % pH=10→ ~47 %	1,5 % proteína: pH= 2→ ~75 % pH= 4→ ~68 % pH= 6→ ~50 % pH= 8→ ~20 % pH=10→ ~70 % t <sub>final</sub> =30 min	Lafarga et al., (2018)
Comum francês ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Solubilização alcalina e Precipitação isoelétrica Teor de proteína 76,96 %	Dispersão em água (4 mL/g) pH 10 por 1 h; Precipitação pH 4,5	2 % proteína pH 2: 113,46 % pH 6: 102,00 % pH 10: 102,00 %	2 % proteína pH 2: 8,72 h pH 6: >12 h pH 10: 3,99 h	Wani et al. (2014)
Feijão vermelho ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização NaHPO <sub>4</sub> e Precipitação (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Teor de proteína 41,00 %	Dispersão em NaHPO <sub>4</sub> pH 8,0 (1:10 g:v) a 4 °C / 2 h; Precipitação: 40 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> → 80 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> → Diálise → Albumina (sobrenadante) e Globulina (precipitado)	Albuminas: 0,4 % proteína pH 3→ ~55 % pH 5→ ~35 % pH 7→ ~50 % pH 9→ ~80 %	Albuminas: 0,4% proteína pH 3→ ~37 % pH 5→ ~20 % pH 7→ ~40 % pH 9→ ~60 % t <sub>final</sub> = 30 min	Mundi & Aluko, (2012)
	Solubilização NaHPO <sub>4</sub> e Precipitação (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Teor de proteína 91,50 %		Globulinas: 0,4 % proteína pH 3→ ~50 % pH 5→ ~30 % pH 7→ ~45 % pH 9→ ~62 %	Globulinas: 0,4 % proteína pH 3→ ~50 % pH 5→ ~30 % pH 7→ ~45 % pH 9→ ~65 % t <sub>final</sub> = 30 min	

Nos últimos anos, pesquisas voltadas para avaliação de propriedades funcionais de extratos proteicos estruturalmente modificados de feijão apresentaram resultados importantes sobre as propriedades espumantes (TABELA 1.9). Recentemente, o efeito da aplicação de altas pressões foi averiguado sobre as propriedades espumantes de feijão comum (AHMED et al., 2018). A aplicação de alta pressão levou a diminuição da capacidade e estabilidade de espumas do extrato proteico porque causou desenovelamento molecular da proteína, o que afetou a propriedade espumante.

A modificação estrutural das proteínas de feijão comum também foi investigada por He et al. (2018) que avaliaram a implicação de conjugar proteínas a monometoxipoli(etilenoglicol) (mPEG). As proteínas conjugadas exibiram melhores propriedades espumantes comparadas às proteínas nativas. O aumento da capacidade espumante foi relacionado à ampliação da solubilidade e a maior quantidade de proteínas desenovelada na interface ar/água, já a melhoria da estabilidade espumante foi relacionada ao efeito de blindagem eletrostática provocada pelas cadeias de mPEG (HE et al., 2018).

A hidrólise proteolítica foi o tratamento de modificação estrutural estudado por Wani, Sogi & Gill (2015) e Wani et al. (2014), que avaliaram dos efeitos sobre as propriedades espumantes, respectivamente, dos extratos proteicos de feijões *Black Gram* e comum vermelho. Os dois estudos mostraram que a hidrólise enzimática promoveu melhoria das propriedades espumantes dos extratos proteicos modificados e apontam que o desempenho dessas propriedades apresentam relação com o pH. Wani, Sogi & Gill (2015) e Wani et al. (2014) verificaram que a maior estabilidade espumante das proteínas hidrolisadas ocorreu na região do ponto isoelétrico em função da redução das interações repulsivas, o que promoveu aumento quantitativo de proteínas na interface e intensificação das interações proteínas-proteínas, fatos que proporcionaram a formação de uma camada ou filme molecular estável na interface ar/água.

Tabela 1.9 - Propriedades espumantes de extratos proteicos modificados de feijão de gênero *Phaseolus*.

Variedade	Extração	Método da modificação	FC (mL) / (%)	FS (%)	Referência
Comum ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Solubilização alcalina (pH 8) e Precipitação isoelétrica (pH 4,5) Teor de proteína 80,82 %	<b>Modificação física:</b> <b>Alta pressão</b> Aplicação de pressão: 400 MPa por 15 min	Concentração proteína <i>omitida</i> Nativo → 76,7 % 400 MPa → 42,1 %	Concentração proteína <i>omitida</i> Após 60 min Nativo → 54,5 % 400 MPa → 41 %	Ahmed et al. (2018)
Comum preto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 7,0) e Precipitação isoelétrica (pH 4,5). Teor de proteína 83,3 %	<b>Modificação Química:</b> Conjugação proteína + mPEG-SC:	10 mg/mL em NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 <sup>1</sup> Nativo → ~7,5 mL Conjugado → ~8,5 mL	10 mg/mL em NaHPO <sub>4</sub> pH 7,0 <sup>1</sup> Nativo → ~30 % Conjugado → ~35 %	He et al. (2018)
Black gram, Cultivar Mash 1-1 ( <i>Phaseolus mungo</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 10) e Precipitação isoelétrica (pH 4,5). Teor de proteína 83,3 %	<b>Modificação enzimática:</b> • Papaína, 37 °C pH 8,0 por 30 min	2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 2 → 144,6 % pH 6 → 134,0 % pH 10 → 153,9 % Hidrolisado: pH 2 → 166,8 % pH 6 → 158,0 % pH 10 → 160,0 %	2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 2 → 30 min pH 6 → > 12 h pH 10 → > 12 h Hidrolisado: pH 2 → 3,2 h pH 6 → > 12 h pH 10 → 11,5 h	Wani, Sogi & Gill (2015)
Black gram, Cultivar PU-19 ( <i>Phaseolus mungo</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 10) e Precipitação isoelétrica (pH 4,5). Teor de proteína 86,3 %	<b>Modificação enzimática:</b> • Papaína, 37 °C pH 8,0 por 30 min	2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 2 → 140,2 % pH 6 → 132,0 % pH 10 → 177,8 % Hidrolisado: pH 2 → 158,9 % pH 6 → 148,0 % pH 10 → 156,0 %	2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 2 → 1 h pH 6 → > 12 h pH 10 → 5 h Hidrolisado: pH 2 → 11,2 h pH 6 → > 12 h pH 10 → 9,4 h	Wani, Sogi & Gill (2015)

Tabela 1.9 - Propriedades espumantes de extratos de proteínas maodificados de feijões do gênero *Phaseolus*. (Continuação)

Variedade	Extração	Método da modificação	FC (mL)/(%)	FS (min ou h)/(%)	Referência
Comum Vermelho ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 10) e Precipitação isoelétrica (pH 4,5). Teor de proteína 80,04 %	<b>Modificação enzimática:</b> • Papaína, 37 °C pH 8,0 por 30 min	2 % proteína Nativo: pH 2→111,47 % pH 6→ 76,0 % pH 10→ 108,0 % Hidrolisado: pH 2→100,0 % pH 6→ 76,12 % pH 10→ 92 %	2 % proteína Nativo: pH 2→> 12 h pH 6→ > 12 h pH 10→ 7,04 h Hidrolisado: pH 2→> 12 h pH 6→ > 12 h pH 10→ 8,16 h	Wani et al., (2014b)
Comum Contendor ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Solubilização alcalina (pH 10) e Precipitação isoelétrica (pH 4,5). Teor de proteína 83,96 %	<b>Modificação enzimática:</b> • Papaína, 37 °C pH 8,0 por 30 min	0,2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 2→109,34 % pH 6→ 84,00 % pH 10→ 116,0 % Hidrolisado: pH 2→100,00 % pH 6→ 82,23 % pH 10→ 104,0 %	0,2 % proteína <sup>1</sup> Nativo: pH 2→> 12 h pH 6→ > 12 h pH 10→ 5,41 h Hidrolisado: pH 2→3,64 h pH 6→ > 12 h pH 10→ 8,61 h	Wani et al., (2014b)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, J. et al. Effect of high pressure treatment on functional, rheological and structural properties of kidney bean protein isolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, n. November 2017, p. 191–197, 2018.

AJIBOLA, C. F. et al. Polypeptide composition and functional properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) albumin, globulin and protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 189–200, 2016.

AROGUNDADE, L. A. et al. Nutrition, gelation rheology and gel microstructure of isoelectric and ultrafiltered/diafiltered African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) protein isolates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P1, p. 1018–1024, 2014.

BESSADA, S. M. F.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. **Trends in Food Science and Technology**, v. 93, n. 228, p. 53–68, 2019.

BLAIR, M. W. Mineral biofortification strategies for food staples: The example of common bean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 35, p. 8287–8294, 2013.

BODZON-KULAKOWSKA, A. et al. Methods for samples preparation in proteomic research. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 849, n. 1–2, p. 1–31, 2007.

BOS, M. A.; VLIET, T. V. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layer and surfactants: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 91, p. 437–471, 2001.

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

BROWN, J. W. S. et al. Genetic variation in the subunits of globulin-1 storage protein of French bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 59, n. 2, p. 83–88, 1981.

CARBONARO, M. et al. Solubility-Digestibility Relationship of Legume Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3387–3394, 1997.

CELLENO, L. et al. A dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract influences body composition of overweight men and women. **International Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 45–52, 2007.

CHAGAS, E. P.; SANTORO, L. G. Globulin and albumin proteins in dehulled seeds of three *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 51, n. 1, p. 17–26, 1997.

DAMODARAN, S. Interfaces, protein films and foam. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 34, p. 1–79, 1990.

DAMODARAN, S. In: DAMODARAN, S. PARKIN, L. K.; FENNEMA, O. R.; **Química de Alimentos de Fennema**. 4<sup>a</sup>ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, cap. 5, p. 179-163.

DANIELSSON, C. E. Seed globulins of the Gramineae and Leguminosae. **The Biochemical journal**, v. 44, n. 4, p. 387–400, 1949a.

DANIELSSON, C. E. Investigations of vicilin and legumin. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 3, p. 41–49, 1949b.

DE LA FUENTE, M. et al. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 2, p. 262–267, 2011.

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

DICKINSON, E. **Food Emulsions and Foams**. England: Woodhead Publishing Limited, 1987.

DICKINSON, E. Structure and composition of adsorbed protein layers and the relationship to emulsion stability. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 88, n. 20, p. 2973–2983, 1992.

DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: Protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, v. 53, n. 1–3, p. 31–45, 1997.

EVANGELHO, J. A. . et al. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food Chemistry**, v. 214, p. 460–467, 2017.

EVANS, R. J. .; KERR, M. H. . Extraction and Precipitation of Nitroge-. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 26–29, 1963.

FANTINI, N. et al. Reducing effect of a *Phaseolus vulgaris* dry extract on food intake, body weight, and glycemia in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9316–9323, 2009.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/> . Acesso em 21 de fevereiro de 2020 às 15:30.

FEYZI, S.; MILANI, E.; GOLIMOVAHED, Q. A. Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.) Protein Isolate: The Effect of Extraction Optimization and Drying Methods on the Structure and Functional Properties. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 187–196, 2018.

FUENTE, M. D. L. et al. In-Depth Characterization of the Phaseolin Protein Diversity of Common Bean ( *Phaseolus vulgaris* L. ) Based on Two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry. v. 50, n. 3, p. 315–325, 2012.

GHUMMAN, A.; KAUR, A.; SINGH, N. Functionality and digestibility of albumins and globulins from lentil and horse gram and their effect on starch rheology. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 843–850, 2016.

GRAHAM, P. H.; RANALLI, P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, v. 53, n. 1–3, p. 131–146, 1997.

GUEGUEN, J. et al. Dissociation and aggregation of pea legumin induced by pH and ionic strength. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 44, n. 2, p. 167–182, 1988.

HARADA, T.; MIYAIRI, K.; MURAI, N. Trimeric glycoproteins of bean seed storage protein phaseolin were purified from baculovirus-infected insect Sf9 cells for use of structural study. **Plant Science**, v. 179, n. 1–2, p. 123–132, 2010.

HE, Q. . et al. PEGylation of black kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate with potential functional properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 164, p. 89–97, 2018.

HENNIG, M.; SCHLESIER, B. Crystallization of seed globulins from legumes. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 50, n. 4, p. 627–631, 1994.

HILL, C.; EASTOE, J. Foams: From nature to industry. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 247, n. March, p. 496–513, 2017.

HOJILLA-EVANGELISTA, M. P. et al. Composition and Functional Properties of Saline-Soluble Protein Concentrates Prepared from Four Common Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, n. 8, p. 1001–1012, 2018.

ISHINO, K.; ORTEGA D., M. L. Fractionation and Characterization of Major Reserve Proteins from Seeds of *Phaseolus vulgaris*. v. 23, n. 3, p. 1937–1938, 1975.

JARPA-PARRA, M. et al. LWT - Food Science and Technology Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 461–469, 2014.

JARPA-PARRA, M. et al. Impact of pH on molecular structure and surface properties of lentil legumin-like protein and its application as foam stabilizer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 132, p. 45–53, 2015.

KARACA, A. C.; LOW, N.; NICKERSON, M. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2742–2750, 2011.

KINSELLA, J. E. Functional properties of proteins in foods: A survey. **C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 219–280, 1976.

KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 56, n. 3, p. 242–258, 1979.

KOENIG, R. L.; SINGH, S. P.; GEPTS, P. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* Fabaceae). **Economic Botany**, v. 44, n. 1, p. 50–60, 1990.

LAFARGA, T. . et al. Characterization of functional properties of proteins from Ganxet beans (*Phaseolus vulgaris* L. var. Ganxet) isolated using an ultrasound-assisted methodology. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 98, n. July, p. 106–112, 2018.

LAWRENCE, M. C. et al. Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution: implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 238, p. 748–776, 1994.

LIU, B. et al. Chemical composition, in vitro starch digestibility and amino acid analysis of an underexplored kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in Chongqing, China. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 3, p. 527–532, 2013.

LÓPEZ-PEDROUSO, M. et al. Evaluating two-dimensional electrophoresis profiles of the protein phaseolin as markers of genetic differentiation and seed protein quality in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 29, p. 7200–7208, 2014.

MAKRI, E. A.; DOXASTAKIS, G. I. Emulsifying and foaming properties of *Phaseolus vulgaris* and *coccineus* proteins. **Food Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 558–568, 2006.

MARINIELLO, L. et al. Synthesis and resistance to in vitro proteolysis of transglutaminase cross-linked phaseolin, the major storage protein from *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4717–4721, 2007.

MARQUEZI, M. et al. Chemical and functional properties of different common Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, n. 0, 2017.

MARSHALL, J. J. .; LAUDA, C. M. . Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **The Journal of biological chemistry**, v. 250, n. 20, p. 8030–8037, 1975.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques**. 2<sup>a</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.

MEJIA, E. G. et al. Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 60, n. 3, p. 137–145, 2005.

MENG, G. T.; MA, C. Y. Thermal properties of *Phaseolus angularis* (red bean) globulin. **Food Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 453–460, 2001.

MOHAMMAD, A. W. et al. Ultrafiltration in Food Processing Industry: Review on Application, Membrane Fouling, and Fouling Control. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 4, p. 1143–1156, 2012.

MONTOYA, C. A. et al. Susceptibility of phaseolin to in vitro proteolysis is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2183–2191, 2008.

MONTOYA, C. A. et al. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 443–449, 2010.

MÜHLING, M.; GILROY, J.; CROY, R. R. D. Legumin proteins from seeds of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 150, n. 4, p. 489–492, 1997.

MUNDI, S.; ALUKO, R. E. Physicochemical and functional properties of kidney bean albumin and globulin protein fractions. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 299–306, 2012.

OOMAH, B. D. .; MAZZA, G. .; CUI, W. . Optimization of protein extraction from flaxseed meal. **Food Research International**, v. 27, n. 4, p. 355–361, 1994.

OSBORNE, T. B. **The vegetable proteins**. 1<sup>a</sup> ed. London: Longmans, Green, and Co, 1909.

PAPALAMPROU, E. M. et al. Influence of preparation methods on physicochemical and gelation properties of chickpea protein isolates. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 337–343, 2009.

PEARCE, K. N. .; KINSELLA, J. E. . Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 716–723, 1978.

PHILIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. **Structure-Function Properties of Food Proteins**. [s.l: s.n.].

RAHMATI, N. F. et al. Introducing Speckled sugar bean (*Phaseolus vulgaris*) protein isolates as a new source of emulsifying agent. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 498–508, 2018.

RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A. K. et al. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. **Food Chemistry**, v. 161, p. 254–260, 2014.

RUI, X. et al. Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2497–2504, 2011.

RUIZ, G. A. et al. Effect of extraction pH on heat-induced aggregation, gelation and microstructure of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). **Food Chemistry**, v. 209, p. 203–210, 2016.

SEIDU, K. T. et al. Amino acid composition, mineral contents and protein solubility of some lima bean (*Phaseolus lunatus* L. Walp) seeds coat. **Food Research International**, v. 73, p. 130–134, 2015.

SHARIF, H. R. et al. Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants – A review. **Food Hydrocolloids**, v. 76, p. 2–16, 2018.

SHEN, L.; TANG, C. H. Emulsifying properties of vicilins: Dependence on the protein type and concentration. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 278–286, 2014.

STONE, A. K. et al. Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. **Food Research International**, v. 76, n. P1, p. 31–38, 2015.

SUBIRADE, M.; GUEGUEN, J.; SCHWENKE, K. D. Effect of dissociation and conformational changes on the surface behavior of pea legumin. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 152, n. 2, p. 442–454, 1992.

SUN, S. M. et al. Reversible and Irreversible Dissociation of Globulins from *Phaseolus vulgaris* Seed. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 7, p. 2118–2121, 1974.

TAN, E.-S.; NGOH, Y.-Y.; GAN, C.-Y. A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation. **Food Chemistry**, v. 152, p. 447–455, 2014.

TANG, C.-H.; SUN, X.; YIN, S.-W. Physicochemical, functional and structural properties of vicilin-rich protein isolates from three *Phaseolus* legumes: Effect of heat treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1771–1778, 2009.

TANG, C. H. et al. Transglutaminase-induced cross-linking of vicilin-rich kidney protein isolate: Influence on the functional properties and in vitro digestibility. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 941–947, 2008.

TANG, C. H.; SUN, X. Structure–physicochemical function relationships of 7S globulins (vicilins) from red bean (*Phaseolus angularis*) with different polypeptide constituents. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 536–544, 2011a.

TANG, C. H.; SUN, X. A comparative study of physicochemical and conformational properties in three vicilins from *Phaseolus* legumes: Implications for the structure-function relationship. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 315–324, 2011b.

THARANATHAN, R. N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes - A boon to human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, n. 12, p. 507–518, 2003.

WALSTRA, P. **Foams: Physics, Chemistry and Structure**. New York: Springer, 1989.

WANI, I. A. et al. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. **Food Research International**, v. 76, n. P1, p. 11–18, 2014.

WANI, I. A.; SOGI, D. S.; GILL, B. S. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolysed protein isolates from Indian black gram (*Phaseolus mungo* L.) cultivars. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 848–854, 2015.

WILCOX, E. R.; WHITAKER, J. R. Structural features of red kidney bean  $\alpha$ -amylase inhibitor important in binding with  $\alpha$ -amylase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 8, n. 3, p. 189–213, 1984.

YADA, R. Y. **Proteins in foods processing**. 1<sup>a</sup> ed. Abington: Woodhead Publishing Limited, 2004.

YAO, Y. . et al. Comparisons of phaseolin type and  $\alpha$ -amylase inhibitor in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in China. **The Crop Journal**, v. 4, n. 1, p. 68–72, 2016.

YIN, S. W. et al. Functional properties and in vitro trypsin digestibility of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate: Effect of high-pressure treatment. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 938–945, 2008.

YIN, S. W. et al. Functional and conformational properties of phaseolin (*Phaseolus vulgaris* L.) and kidney bean protein isolate: A comparative study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 4, p. 599–607, 2010.

YIN, S. W. . et al. Conformational and thermal properties of phaseolin, the major storage protein of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 1, p. 94–99, 2011.

ZAYAS, J. F. **Functionality of Proteins in Food**. 1<sup>a</sup> ed. New York: Springer, 1997.

## CAPITULO 2 - EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA E CARACTERIZAÇÃO DA FASEOLAMINA DE FEIJÃO COMUM BRANCO (*Phaseolus vulgaris*).

Lucidarce Martins da MATTA<sup>a1</sup>, Eduardo Basílio de OLIVEIRA<sup>a</sup>, Márcia Cristina Teixeira Ribeiro VIDIGAL<sup>a</sup>, Ana Clarissa dos Santos PIRES<sup>a</sup>,  
Valéria Paula Rodrigues MINIM<sup>a</sup>, Luís Antônio MINIM<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Avenida P.H. Rolfs Campus Universitário, Viçosa-MG, Brasil, CEP: 36570-000.

### RESUMO

Os efeitos de duas variáveis do processo da extração proteica do feijão comum branco por solubilização salina (NaCl), proporção solvente (NaCl<sub>aq</sub>)/farinha desengordurada (Far<sub>des</sub>) e temperatura, sobre a atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ IA) e a purificação da faseolamina por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) foram avaliados. Apenas a proporção NaCl<sub>aq</sub>/Far<sub>des</sub> exibiu efeito sobre a  $\alpha$ IA e o isolado proteico extraído ISO<sub>NAT</sub> (3,9 mL<sub>NaCl<sub>aq</sub></sub>/g<sub>Far<sub>des</sub></sub> e 27,5 °C) exibiu 93,48±1,78% de proteínas,  $\alpha$ IA=5274,03±86,67 U.g<sub>iso</sub><sup>-1</sup>, ponto isoelétrico e o perfil eletroforético na condição redutora obtido exibiu bandas de 97 kDa, 48 – 43 kDa, ~35 kDa e 20 – 18 kDa. Observou-se através da eletroforese que as duas frações proteicas produzidas na purificação cromatográfica por HIC não eram constituídas por proteínas isoladas e, sim por mais de duas unidades proteicas. Porém, foi possível notar melhoria no processo de purificação quando foram comparadas as amostras purificadas e a farinha desengordurada. A fração de maior massa apresentou a menor  $\alpha$ IA comparada à atividade da outra, resultado que sugere que a faseolamina contribui na inibição total

<sup>1</sup> Autores correspondentes

Lucidarce M. da Matta, telefone: +55 (62) 99910-9790, e-mail: [lucidarcedamatta@gmail.com](mailto:lucidarcedamatta@gmail.com)

Luís Antônio Minim, telefone: +55 (31) 3612-6713, e-mail: [lminim@ufv.br](mailto:lminim@ufv.br)

Co-autores:

Eduardo B. Oliveira, telefone: +55 (31) 3612-6751, e-mail: [eduardo.basilio@ufv.br](mailto:eduardo.basilio@ufv.br)

Márcia C. T. R. Vidigal, telefone: +55 (31) 3612-6718, e-mail: [marcia.vidigal@ufv.br](mailto:marcia.vidigal@ufv.br)

Ana Clarissa S. Pires, telefone: +55 (31) 3612-6720, e-mail: [ana.pires@ufv.br](mailto:ana.pires@ufv.br)

Valéria P. R. Minim, telefone: +55(31) 3612-6714, e-mail: [yprm@ufv.br](mailto:yprm@ufv.br)

desenvolvida pelo isolado proteico de feijão comum branco produzido por solubilização salina. A proporção média das estruturas secundárias do ISO<sub>NAT</sub> foi 12,23 % de estruturas agregadas, 27,80 % de folha- $\beta$ , 21,13 % de  $\alpha$ -hélice, 25,61 % de *random coil* e 13,23 % de *turns*.

Palavras-chave: Faseolamina. Atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase. Estruturas secundárias. folha- $\beta$ .  $\alpha$ -hélice. Random coil. Eletroforese. Ponto isoelétrico.

## 1 - INTRODUÇÃO

O feijão do gênero *Phaseolus* é uma das leguminosas mais consumida nos países em desenvolvimento (FAO, 2020), como China e países da América Latina e África, pois, trata-se de uma fonte de carboidratos, de proteínas, de fibras e de sais minerais. Além da qualidade nutricional (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010; EVANGELHO et al., 2017), resultados de estudos epidemiológicos *in vitro* e *in vivo* denotam ao feijão propriedades benéficas à saúde ao vincular a ingestão da farinha ou extratos proteicos de feijão à prevenção do câncer e à redução dos riscos de doenças cardiovasculares, como propriedade anti-aterosclerótica e o controle da diabetes. A última propriedade está relacionada à habilidade biológica de certas proteínas de defesa do feijão de inibir a  $\alpha$ -amilase. A inibição leva a redução da quantidade de alimento ingerida, do nível de glicose na corrente sanguínea e do ganho do peso corporal (ALVES et al., 2016; GARCÍA-LAFUENTE et al., 2014; RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015).

O feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*) é foco da atenção de pesquisadores interessados em explorar a atividade biológica supracitada, pois, é atribuída a essa variedade maior atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ IA) comparada às demais variedades de feijão (FANTINI et al., 2009; UDANI; TAN; MOLINA, 2018). É relatado que esta variedade possui a maior concentração da proteína de reserva denominada faseolamina, que se acredita ser hábil na inibição da  $\alpha$ -amilase de mamíferos e de insetos (PUEYO; HUNT; CHRISPEELS, 1993; YAO et al., 2016). A faseolamina ou vicilina 7S possui arranjo quaternário compacto (100 – 150 kDa) composto de duas a três subunidades polipeptídicas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) com massas

moleculares que variam de 43 kDa a 53 kDa e pontos isoelétricos de 5,0 a 5,5 (FUENTE et al., 2012; LÓPEZ-PEDROUSO et al., 2014; MONTOYA et al., 2010).

Vários pesquisadores produziram extratos proteicos de feijão por solubilização alcalina e precipitação isoelétrica, e averiguaram a  $\alpha$ IA em paralelo ao perfil eletroforético de proteínas. A purificação da vicilina 7S a partir dos extratos foi realizada por técnicas cromatográficas, como de fase reversa (ALLI, GIBBS, OKONIEWSKA, KONISHI & DUMAS, 1993), de exclusão molecular (CHEL-GUERRERO et al., 2007; MUNDI; ALUKO, 2013) ou, majoritariamente, de troca aniônica (LEE; GEPTS; WHITAKER, 2002; MENG; MA, 2002; TANG; SUN, 2011a, 2011b). Entretanto, nenhum estudo foi encontrado com relatos sobre a avaliação da produção de extrato proteico de feijão comum branco por solubilização salina (NaCl) com o propósito de maximizar a  $\alpha$ IA. Foi localizado apenas um estudo cuja separação proteica de extrato proteico de feijão por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) foi avaliada combinada às técnicas de troca aniônica e exclusão molecular (FRELS; RUPNOW, 1984).

Considerando o potencial de aplicação tecnológica da faseolamina de feijão branco purificada, o objetivo geral desse estudo foi produzir isolado proteico do feijão branco por solubilização salina visando maximizar a atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase, purificar por cromatografia de interação hidrofóbica e caracterizar a faseolamina do isolado.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 - Material**

O feijão comum branco foi adquirido no comércio de Viçosa (MG). Os padrões de proteínas (albumina do soro bovino BSA, ovotransferrina, ovoalbumina e lisozima), a acrilamida (AAm, 99 %), o N,N'-metileno-bis-acrilamida (MBAAm), o alil glicidil éter (AGE), o persulfato de amônio (APS), o N, N, N', N'-tetrametilenodiamino (TEMED, 99 %),  $\beta$ -mercaptoetanol, ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), ácido trifluoracético (TFA), acetonitrila, tripsina (T6567) e a  $\alpha$ -amilase pancreática suína (Tipo IV-B) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os reagentes químicos usados exibiam grau de pureza analítico PA-ACS.

## 2.2 - Produção da farinha desengordurada de feijão branco

O feijão comum branco foi, inicialmente, imerso em água destilada a 8 °C por 8 h para remoção manual do revestimento. Os cotilédones foram desidratados (50 °C por 8 h), triturados em processador doméstico e a farinha foi armazenada a -18 °C sob vácuo. As análises físico-químicas da farinha dos cotilédones indicaram umidade 10,47 %, lipídios 1,19 % (base seca - bs), proteína 21,53 % (bs), cinzas 4,60 % (bs), carboidratos 72,68 % (bs) e tamanho de partícula < 500 µm (*mesh* 32). A farinha foi desengordurada ( $Far_{des}$ ) usando hexano na proporção 1:6 (m:v) em extrator Soxhlet por 6 h de recirculação, seguida da evaporação do solvente por 8 h em capela com exaustão de gases.

## 2.3 - Delineamento experimental

Os isolados proteicos de feijão comum branco foram produzidos por solubilização salina (NaCl). Foram estudados efeitos de duas variáveis de processo da etapa de enriquecimento de proteínas através do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) inteiramente casualizado, na ordem  $2^2$  com três repetições no ponto central e mais quatro pontos axiais. A Proporção tampão salino ( $NaCl_{aq}$ )/farinha desengordurada ( $Far_{des}$ ) e a temperatura foram as variáveis independentes avaliadas e a atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase dos isolados proteicos foi a variável resposta mensurada (TABELA 2.1). A variável resposta (Y) foi analisada em função das variáveis independentes no modelo matemático de segunda ordem:

$$Y = \beta_0 + \sum_i^2 \beta_i X_i + \sum_i^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j = 1}^2 \sum_{j=1}^2 \beta_{ij} X_i X_j + e \quad \text{Equação 2.1}$$

Em que Y é a resposta,  $\beta$  é o coeficiente de regressão,  $X_i$  e  $X_j$  são as variáveis independentes, e é o erro puro.

Tabela 2.1 - Delineamento do estudo do processo de produção de extrato proteico de feijão comum branco por solubilização salina: valores reais e codificados das variáveis de independentes.

Ensaio	Variável real		Variável codificada	
	Proporção NaCl <sub>aq</sub> /Far <sub>des</sub> (mL/g) X <sub>1</sub>	Temperatura (°C) X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	10,0	30,0	+1	+1
2	10,0	25,0	+1	-1
3	5,0	30,0	+1	+1
4	5,0	25,0	+1	-1
5	7,5	27,5	0	0
6	7,5	27,5	0	0
7	7,5	27,5	0	0
8	7,5	31,0	0	+1,414
9	7,5	23,9	0	-1,414
10	11,0	27,5	+1,414	0
11	3,9	27,5	-1,414	0

A significância dos efeitos dos fatores lineares ( $L$ ), quadráticos ( $Q$ ) e da interação foi avaliada pelo teste  $t$  ao nível de confiança de 95 %. As significâncias do modelo de regressão e da falta de ajuste a um nível de confiança de 95 % verificadas por análise de variância utilizando o teste  $F$ . O modelo matemático ajustado para  $\alpha IA$  foi utilizado para estimar a condição de processo de máxima  $\alpha IA$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando *Statistical Analysis System*® versão 9.0 (SAS Institute Inc., EUA).

O isolado preparado nessa condição (ISO<sub>NAT</sub>) foi analisado quanto ao teor de proteínas por Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949), perfil eletroforético SDS-PAGE, ponto isoelétrico médio e encaminhado ao processo de purificação da faseolamina por cromatografia HIC.

#### a) Produção do isolado proteico de feijão comum branco

A  $\text{Far}_{\text{des}}$  foi misturada ao tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 8,0) contendo 600 mM NaCl na proporção ( $X_1$ ), previamente equilibrado na temperatura ( $X_2$ ). A mistura foi mantida em agitação magnética (60 min) e centrifugada (7000 xg por 40 min, 4 °C). O sobrenadante foi dialisado (12,4 kDa *cut-off*) contra água ultrapura (Milli-Q, Milipore, EUA) a 4 °C por 7 dias. O conteúdo dialisado foi centrifugado (9000 xg por 40 min, 4 °C) e o precipitado lavado com água ultrapura, centrifugado (9000 xg por 40 min, 4 °C) e liofilizado (-30 °C e 0,37 mbar) (AJIBOLA et al., 2016). Os isolados produzidos foram armazenados a -18 °C protegidos da luz até serem submetidos às análises de quantificação de proteína total por Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949) e de  $\alpha$ IA.

## 2.4 - Captura cromatográfica da faseolamina

A cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) foi utilizada para captura e purificação da faseolamina a partir do  $\text{ISO}_{\text{NAT}}$ . Os experimentos foram conduzidos em cromatógrafo preparativo (AKTA pure 25, GE Healthcare, Suécia) acoplado ao coletor automático de frações (F9-R, GE Healthcare, Suécia) usando uma coluna de vidro 5/100 (Pharmacia Biotech) empacotada com resina Fenil *Streamline* (GE Healthcare, Suécia) cujo volume de coluna (VC) era de 1,92 mL. As soluções foram preparadas com água ultrapura, previamente, filtrada com membrana de PVDF 0,47  $\mu\text{m}$ .

Inicialmente, a coluna foi equilibrada com 10 VC de tampão de adsorção (20 mM fosfato de sódio pH 8,0) com 3 M sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  na vazão de 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Nesta vazão, a captura das proteínas foi realizada bombeando 5 VC da solução do isolado proteico ( $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), preparada em tampão de adsorção contendo 3 M  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  pela coluna e, em seguida, foi realizada a lavagem da coluna com 8 VC do tampão de adsorção contendo 3 M  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ . Mantendo a vazão, as proteínas foram eluídas com 8VC de tampão de adsorção contendo 1,5 M  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  e, em seguida, mais 8 VC a 0 % do tampão de adsorção isento de  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ . Proteínas fortemente ligada foram eluídas com 5 VC de 500 mM NaOH. A fase estacionária foi regenerada com 10 VC de tampão de adsorção. Os ensaios de adsorção foram realizados em triplicata e os eluídos foram monitorados por detector UV a 280 nm. Para serem resolvidas em eletroforese e analisadas quanto ao teor de proteínas (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949), as frações coletadas foram diafiltradas em célula de

ultrafiltração (Amicon modelo 8200, Merck Millipore, EUA) com membrana 10 kDa *cut-off* usando 20 mM fosfato de sódio pH 8,0. E, para serem caracterizadas quanto a  $\alpha$ IA e ponto isoelétrico, as frações foram dialisadas (12,4 kDa *cut-off*) contra água ultrapura a 4 °C por 4 dias e o conteúdo dialisado foi submetido a liofilização (-30 °C e 0,37 mbar). A conformação das estruturas secundárias do isolado solubilizado no tampão de adsorção (ISO<sub>TRAT</sub>) da cromatografia HIC foi caracterizada usando espectrofotometria FTIR-ATR tendo o isolado nativo (ISO<sub>NAT</sub>) como controle. A fim de identificar as proteínas da fração 1 observadas no gel SDS-PAGE (maior em massa obtida na purificação), as bandas de maior intensidade foram extraídas e analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF.

## 2.5 - Caracterização dos isolados e frações proteicas

### a) Eletroforese (SDS-PAGE)

A eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi feita conforme Laemmli (1970) com modificações. Foram preparados géis de empilhamento (500 mM Tris-HCl pH 6,8) e de resolução (1,5 M Tris-HCl pH 8,9) nas concentrações de poliacrilamida de 4 % (m/v) e 10 % (m/v), respectivamente. Alíquotas de 200  $\mu$ L dos eluídos de etapa cromatográfica foram misturados a 400  $\mu$ L de solução desnaturante (500 mM Tris-HCl pH 6,8 com 10 % SDS, 10 % glicerol, 5 %  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,1 % azul de bromofenol) e incubados a 90 °C por 10 min. A mesma proporção foi empregada para preparar a amostra destinada para condição não desnaturante (sem  $\beta$ -mercaptoetanol). Efetuou-se a resolução das proteínas (alíquotas de 20 – 30  $\mu$ L) usando solução tampão Tris-Glicina SDS (25 mM, pH 8,9) e voltagem de 100 V. As proteínas fixadas no gel foram coradas com azul de Coomassie (0,2 % - m/v) dissolvido em etanol 50 % contendo 12 % de ácido acético. A descoloração do gel foi realizada empregando etanol 50 % contendo 12 % de ácido acético. A estimativa da massa molecular foi realizada usando as proteínas ovotransferrina (74,6 kDa), BSA (66,4 kDa), ovoalbumina (44,3 kDa) e lisozima (14,3 kDa).

### b) Atividade de inibição de $\alpha$ -amilase *in vitro*

A  $\alpha$ IA foi medida mediante a incubação dos isolados ou frações proteicas (inibidor) com a  $\alpha$ -amilase e, posterior, avaliação da atividade remanescente. A atividade da  $\alpha$ -amilase pancreática suína sobre o amido modificado foi mensurada usando o reagente DNS,

metodologia de Bernfeld (1955) acrescida das modificações propostas por Tanizaki & Lajolo (1984) usando acetato de sódio (50 mM, pH 5,5) contendo NaCl (20 mM), CaCl<sub>2</sub> (10 mM) e BSA (3 mg.mL<sup>-1</sup>). A maltose foi usada como padrão para construção da curva de calibração para expressar uma unidade de atividade enzimática (U), ou seja, expressada em termos de 1 μmol de maltose em 3 min em 20 °C por 1 mL de solução de enzima.

A αIA foi determinada conforme metodologia descrita por Tanizaki & Lajolo (1984) com alterações nas alíquotas e a eliminação do CaCl<sub>2</sub> (cofator) e da BSA do meio durante a incubação. Alíquotas de 250 μL da α-amilase (600 μg.mL<sup>-1</sup>) e do inibidor (0,8 – 4 mg.mL<sup>-1</sup>) dissolvidos em acetato de sódio (50 mM, pH 5,5) contendo NaCl (20 mM) foram incubadas a 37 °C por 30 min. À mistura enzima:inibidor foram adicionados, nessa ordem, 250 μL do tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,5) contendo NaCl (20 mM), CaCl<sub>2</sub> (10 mM) e BSA (3 mg.mL<sup>-1</sup>) e 250 μL de amido modificado 1 % dissolvido em fosfato de potássio (40 mM, pH 6,9) contendo NaCl (50 mM). A mistura foi incubada a 20 °C por 3 min. A reação foi interrompida com a adição de 500 μL do reagente de DNS. Os tubos foram aquecidos a 90 °C por 15 min, resfriados antes da adição de 4 mL de água destilada. A leitura da absorvância foi realizada em 540 nm. O branco e o controle foram preparados seguindo o protocolo descrito, porém, sem a adição da α-amilase e do inibidor, respectivamente. Uma unidade inibitória foi definida como a quantidade de inibidor de α-amilase que inibiu completamente a atividade de uma unidade (U) da enzima.

#### c) Ponto isoelétrico médio (pI<sub>médio</sub>)

As medidas de potencial zeta foram realizadas em analisador de partícula (Zetasizer Nano Malvern, Malvern Instruments Ltd., UK) acoplado ao titulador automático universal (MPT-2 Zetasizer Nano Malvern, Malvern Instruments Ltd., UK). As amostras foram preparadas com água ultra pura, pH 9 foi ajustado e centrifugadas (9000 x g por 20 min, 20 °C). O sobrenadante foi submetido à titulação automática variando o pH de 10 a 2 usando 100 mM HCl e 100 mM NaOH sob agitação magnética. As medidas foram feitas usando as células DTS 1070C (Malvern Instruments Ltd., UK) sob 25 °C. Expressou-se o resultado como média de quintuplicatas.

#### d) Espectrofotometria no Infravermelho FTIR-ATR

Os espectros no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos usando amostras de isolados liofilizados (ISO<sub>NAT</sub> e ISO<sub>TRAT</sub>) em espectrofotômetro FTIR (Varian FT-IR 660, EUA) com sistema de Reflexão Total Atenuada (ATR), realizando varredura de 4000 cm<sup>-1</sup> a 400 cm<sup>-1</sup>. A resolução das medidas foi 4 cm<sup>-1</sup> e as iterações foram executadas 16 vezes. A deconvolução da banda espectral amida I (1700 – 1600 cm<sup>-1</sup>) foi realizada no software *PeakFit* versão 4.12.

#### e) Espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF

Foram selecionadas duas bandas em cada gel (não redutor – LN2 e FN2; redutor – LR2 e FR2) (FIGURA 2A e 2B) para serem submetidas à digestão enzimática com tripsina (SHEVCHENKO et al., 2007). Em resumo, as bandas foram extraídas do gel e descoloridas usando solução de bicarbonato de amônio (25 mM) contendo 50 % acetonitrila. A redução foi realizada usando ditioneitol (65 mM) a 56 °C por 30 min e a alquilação foi feita com iodoacetamida (200 mM) à temperatura ambiente por 30 min. Os peptídeos trópticos foram obtidos por digestão com tripsina (37 °C por 20 h) (T6567, Sigma Aldrich) solubilizada em bicarbonato (40 mM) contendo 10 % acetonitrila. A digestão foi interrompida com solução de ácido fórmico 5 % contendo 50 % acetonitrila. Após isso, os peptídeos trópticos foram, nesta ordem, liofilizados (-30 °C e 0,37 mbar) (Alpha 2-4 LD plus, Martin Christ, Alemanha), dessalinizados (ZipTip, Millipore, EUA) e aplicados junto à matriz o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico na proporção 1:1 na placa de aço polida (MTP 384 SP, Bruker Daltonics, Alemanha).

A espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF foi realizada em espectrômetro de massa modelo Ultraflex III (Bruker Daltonics GMBH, Bremen, Alemanha). A calibração do método foi conduzida usando o Peptídeo Padrão de Calibração II (Bruker Daltonics, Alemanha). O espectrômetro operou com o FlexControl (versão 3.3, Bruker Daltonics, Alemanha), os espectros das análises de MS e MS/MS foram processados no FlexAnalysis (versão 3.3, Bruker Daltonics, Alemanha) e a lista de picos de MS/MS foi obtida no Formato Mascote Genérico usando o BioTools (versão 3.2, Bruker Daltonics, Alemanha). A identificação dos peptídeos foi confirmada usando o MASCOT (versão 2.4.0, Matrix Science, Londres, UK) de encontro ao subconjunto de dados da família *Fabaceae* do UNIPROT. Acertos significativos para o MASCOT foram definidos usando valor-p<0,05 para peptídeos que mostraram correspondência na pesquisa de íons MS/MS. Esses foram validados

estatisticamente utilizando o Scaffold (versão 3.6.4, Proteome Software Inc., Portland, OR, EUA) usando os algoritmos *Peptide Prophet* (KELLER et al., 2002) e *Protein Prophet* (NESVIZHSKII et al., 2003) para peptídeos e proteínas, respectivamente. Os critérios foram: 90 % de probabilidade de identificação pra ambos e a presença de pelos menos um peptídeo único para cada proteína identificada.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Extração de proteínas de feijão comum branco

A Tabela 2.2 apresenta os resultados de rendimento de extração, teor proteico, rendimento específico e  $\alpha$ IA dos isolados proteicos. As condições de extração por solubilização salina conduziram a rendimentos de produção que variaram entre 110,00 - 132,06  $\text{mg}_{\text{ext}} \cdot \text{g}_{\text{Far}_{\text{des}}}^{-1}$ , valores maiores comparados aos relatados na literatura. Tan, Ngoh & Gan (2014) verificaram rendimento de aproximadamente 54,8  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  após extrair proteína de feijão pinto usando  $\text{NaHPO}_4$  100 mM pH 8,0. Os isolados proteicos obtidos neste estudo apresentaram teor proteico que variaram entre 90,48 - 97,85 %, valores semelhantes aos relatados por outros autores na produção de isolados de feijão vermelho (90,58 %) extraído por solubilização salina com NaCl 1 M (MENG; MA, 2002), de feijão mung (93,4 %) extraído por solubilização alcalina em pH 8,0 (TANG, 2008), de feijão comum (92,2 %) extraído por solubilização alcalina em pH 8,0 (ZHANG et al., 2010).

As condições de processo avaliadas conduziram a valores de extração entre 43,24 - 52,53 % das proteínas da  $\text{Far}_{\text{des}}$ , valores maiores que os relatados por Wani et al., (2014a), que produziram extrato proteico de feijão por solubilização alcalina (pH 10) e obtiveram rendimentos específicos entre 16,89 - 20,50 %, e por Yin, Tang, Wen & Yang (2010), que apresentaram rendimento específico de 32 % de extrato proteico de feijão comum produzido por solubilização salina ácida (500 mM NaCl pH 3,5).

Tabela 2.2 - Delineamento do estudo do processo de produção do extrato proteico de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*) por solubilização salina: valores reais e codificados das variáveis independente e resposta: rendimentos, teor de proteína e atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ IA).

Ensaio	Variável real*		Variável codificada		Variável resposta			
	X <sub>1</sub> (mL/g)	X <sub>2</sub> (°C)	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Rendimento <sup>1</sup> (mg <sub>ext</sub> ·g <sub>Fardes</sub> <sup>-1</sup> )	Proteína <sup>2</sup> (%)	Rendimento <sub>esp</sub> <sup>3</sup> (%)	$\alpha$ IA <sup>4</sup> (U·g <sub>iso</sub> <sup>-1</sup> )
1	10,0	30,0	+1	+1	114,28	95,91	48,18	3740,39
2	10,0	25,0	+1	-1	132,06	90,48	52,53	4242,10
3	5,0	30,0	+1	+1	109,62	96,46	46,47	5196,30
4	5,0	25,0	+1	-1	110,00	92,75	44,74	5321,37
5	7,5	27,5	0	0	116,58	95,75	49,06	4743,37
6	7,5	27,5	0	0	115,56	95,24	48,35	4327,32
7	7,5	27,5	0	0	119,33	95,98	50,34	5521,34
8	7,5	31,0	0	+1,414	115,25	96,24	48,75	4664,21
9	7,5	23,9	0	-1,414	111,09	97,57	47,63	4491,34
10	11,0	27,5	+1,414	0	114,81	95,85	48,36	3717,98
11	3,9	27,5	-1,414	0	100,52	97,85	43,24	5536,56

\*X<sub>1</sub> – Proporção NaCl<sub>aq</sub>/Far<sub>des</sub> (mL/g); X<sub>2</sub> – Temperatura (°C)

<sup>1</sup>Rendimento de extração (massa<sub>iso</sub>/massa<sub>Fardes</sub>)

<sup>2</sup>Base úmida (bu)

<sup>3</sup>Rendimento de proteína extraída [(massa<sub>prot iso</sub>/massa<sub>prot farinha desengordurada</sub>) \*100]

<sup>4</sup>Atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase (Controle) = 19,88±1,61U

Os resultados encontrados para  $\alpha$ IA (TABELA 2.2) variaram entre 3717,98 - 5536,56 U·g<sub>iso</sub><sup>-1</sup>, valores semelhantes aos relatados por Yao et al. (2016) que avaliaram a  $\alpha$ IA de isolados proteicos de feijões de 40 acessos amostrados ao redor do mundo (Ásia, Américas do Norte e Sul, Europa e África) produzidos por solubilização alcalina (pH 9,5) e precipitação isoelétrica (pH 4,5). Os autores apresentaram  $\alpha$ IA variando de 1485,8 U·g<sub>iso</sub><sup>-1</sup> para o feijão preto a 5776,7 U·g<sub>iso</sub><sup>-1</sup> para feijão branco

As significâncias dos efeitos das variáveis independentes foram avaliadas através do teste t (TABELA 2.3) e, dentro dos limites avaliados, apenas o efeito linear da variável X<sub>1</sub> (proporção NaCl<sub>aq</sub>/Far<sub>des</sub>) exibiu efeito negativo significativo pelo teste t (Pr<0,05) sobre a  $\alpha$ IA. Os efeitos lineares ou quadrático da variável X<sub>2</sub> (temperatura) não foram significativos pelo teste t (Pr>0,05), sequer a interação entre as variáveis independentes. A não significância da temperatura sobre a resposta avaliada pode ser atribuída ao curto intervalo entre os níveis

de temperatura avaliados e, para futuros estudos cujo propósito seja semelhante ao deste, sugere-se ampliar o intervalo da variável temperatura.

Tabela 2.3 - Efeito estimado, erro padrão, valor t e grau de significância para cada fator do modelo codificado para atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase.

<b>Fatores<sup>1</sup></b>	<b>Efeito</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t<sub>cal</sub></b>	<b>Pr &gt; (t)</b>
Média	5025,11	169,6	29,62	<0,0001
Proporção X <sub>1</sub> (L)	-609,10	103,9	-5,86	0,0020
Temperatura X <sub>2</sub> (L)	-54,476	103,9	-0,52	0,6225
Proporção X <sub>1</sub> (Q)	-215,36	123,6	-1,74	0,1421
Temperatura X <sub>2</sub> (Q)	-75,239	146,9	-0,51	0,6304
Proporção (X <sub>1</sub> ) X Temperatura (X <sub>2</sub> )	-189,19	123,7	-1,53	0,1867
R <sup>2</sup>	0,8865			

<sup>1</sup>Fatores são significativos ao nível de Pr<0,05; (L) – efeito linear; (Q) – efeito quadrático;

Fatores não significativos foram eliminados, as significâncias do modelo de regressão e da falta de ajuste a um nível de confiança de 95 % verificadas por análise de variância utilizando o teste *F* (TABELA 2.4).

Tabela 2.4 - Análise de variância do modelo ajustado para a atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Valor F</b>	<b>Pr&gt;F<sup>1</sup></b>
Regressão	1	2 967 603	2 967 603	31.88	0,0003
Resíduos da regressão	9	837 886	93 098		
Lackfit	7	466 273	66 610	0,36	0,8714
Erro puro	2	371 613	185 807		
Tratamentos	8	3 433 876	429 234	2,31	0,3370
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>3 805 490</b>			

\*Fontes significativas ao nível de (Pr≤0,05)

Após analisar os resultados, verificou-se que a regressão do modelo de primeira ordem é significativa (Pr<0,05 e R<sup>2</sup>=0,8642), enquanto a falta de ajuste foi não significativa ao nível de confiança estabelecido de probabilidade (Pr<0,05). Portanto, o modelo de primeira

ordem codificado (EQUAÇÃO 2.2) se ajusta a resposta  $\alpha IA$  dentro dos limites da variável independente ( $X_1$ ) do processo de enriquecimento proteico:

$$\alpha IA = 4730.9 - 609,1 X_1 \quad \text{Equação 2.2}$$

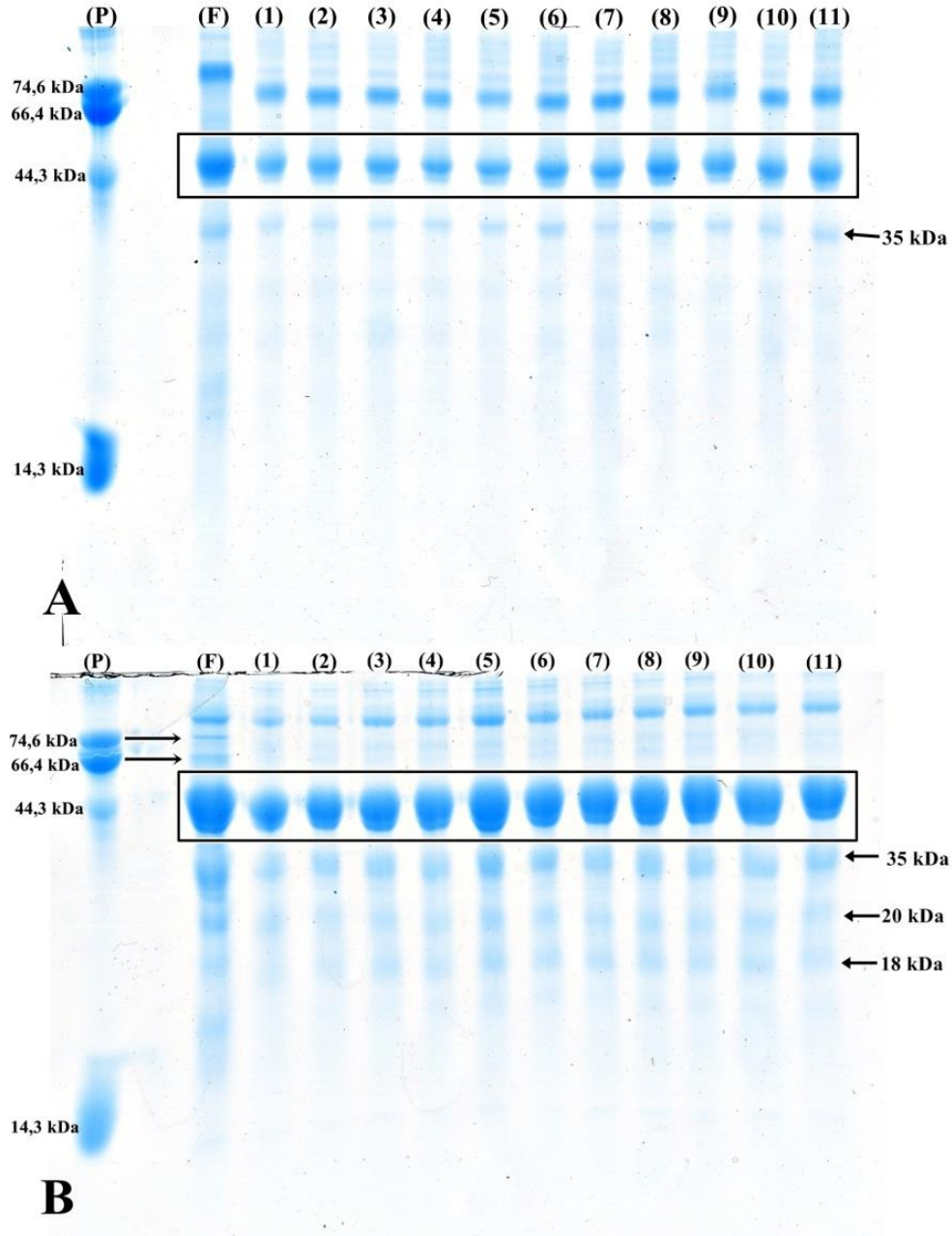
Em que  $X_1$  é a variável codificada para Proporção  $\text{NaCl}_{\text{aq}}/\text{Far}_{\text{des}}$

De acordo com a Equação 2.2, foram realizados novos experimentos com valores decrescentes da proporção  $\text{NaCl}_{\text{aq}}/\text{Far}_{\text{des}}$  a 27,5 °C a fim alcançar a maximização da  $\alpha IA$ . Todavia, devido a problemas de solubilização da farinha desengordurada na solução salina, o menor nível possível foi  $X_1 = -1,414$  (3,9  $\text{mL}_{\text{NaCl}_{\text{aq}}}/\text{g}_{\text{Far}_{\text{des}}}$ ), levando a um isolado contendo  $93,48 \pm 1,78$  % (base úmida – bu) de proteína e  $\alpha IA = 5274,03 \pm 86,67 \text{ U} \cdot \text{g}_{\text{iso}}^{-1}$ . O erro entre o valor observado e previsto foi de apenas 5,7 %, demonstrando a boa qualidade de predição do modelo.

#### a) Eletroforese

Os perfis eletroforéticos unidimensionais dos isolados proteicos produzidos foram obtidos na ausência e presença de  $\beta$ -mercaptoetanol (FIGURA 2.1). Na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol (FIGURA 2.1A), o perfil proteico exibiu predominância das bandas 74,6 kDa, 47-43 kDa e 35 kDa. Após comparar esse perfil eletroforético com dados da literatura, sugere-se tratar, nessa ordem, das proteínas legumina 11S, vicilina 7S e fitohematoaglutinina ou lectina (PHA).

Figura 2.1 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na ausência (A) e presença (B) de  $\beta$ -mercaptoetanol da farinha desengordurada (Faixa F) e dos isolados de proteínas (Faixa 1-11 correspondem a cada ensaio do delineamento) de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*). Faixa (P) corresponde ao padrão de proteínas: ovotransferrina (74,6 kDa), BSA (66,4 kDa), ovoalbumina (44,3 kDa) e lisozima (14,3 kDa).



Fonte: o Autor.

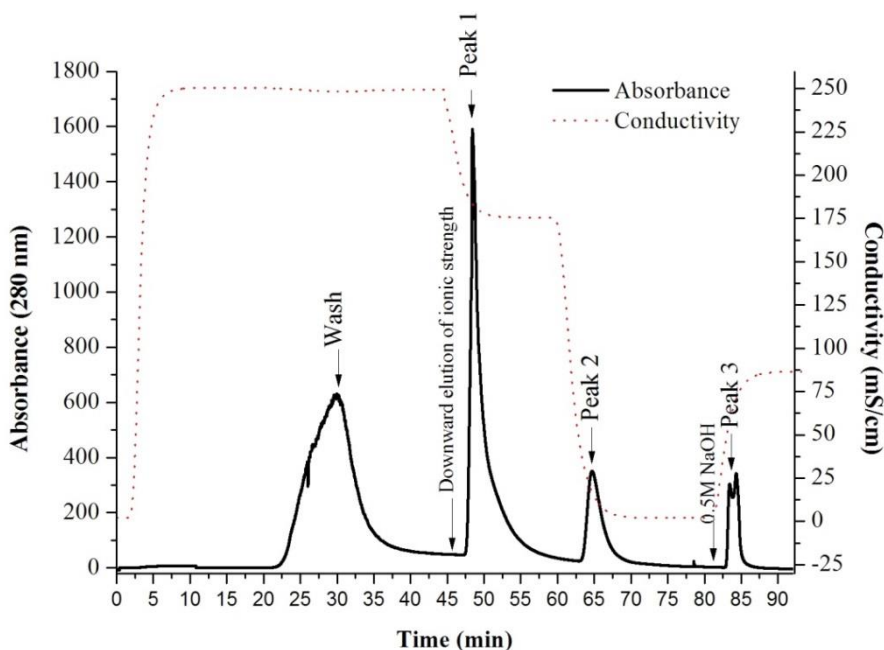
Na presença do  $\beta$ -mercaptoetanol (FIGURA 2.1B), observou-se a presença de duas bandas na farinha (Faixa F) (setas, 74,6 kDa e 66,4 kDa) que fracamente aparecem nos perfis dos isolados (Faixas 1-11), o que sugere que o enriquecimento salino promoveu seleção de proteínas durante a extração. Além disso, também foi notado no gel da condição redutora

(i) maior mobilidade das bandas nas Faixas 1-11 ao longo do gel, (ii) presença de bandas de alta massa molecular (~97 kDa) que pode se tratar lipoxigenase ( $pI=5,94$  e  $97,7$  kDa) (NATARAJAN et al., 2013), (iii) ausência da banda de  $74,6$  kDa, evento que geralmente na literatura é atribuído ao rompimento da ligação dissulfídica existente na legumina 7S, (iv) manutenção e aumento da intensidade das bandas  $48-43$  kDa, fato que favorece a hipótese dessas bandas serem a faseolamina (vicilina 7S), pois, as cadeias polipeptídicas dessa proteína não interagem via ligação dissulfídica (retângulo, FIGURA 2.1B), (v) aumento da intensidade na região das bandas  $35-30$  kDa, que se presume ser a PHA e (vi) aparecimento das bandas  $20-18$  kDa (setas, FIGURA 2.1B) que atribui ser de proteínas defensoras isoformas ( $\alpha$ -AI1 e  $\alpha$ -AI2) inibidoras da atividade da  $\alpha$ -amilase (LEE; GEPTS; WHITAKER, 2002).

### 3.2 - Captura cromatográfica do isolado proteico de feijão comum branco

A purificação cromatográfica HIC é baseada nas interações hidrofóbicas entre os resíduos da superfície de um analito, tal como uma proteína, e a fase estacionária (fenil, octil, por exemplo). A interação adsorativa matriz-proteína é alcançada usando fase móvel com alta concentração de sais cosmotrópicos que favorecem o aumento da entropia da água no sistema e a redução da concentração de sal na fase móvel promove a eluição da proteína (BAUMANN; BAUMGARTNER; HUBBUCH, 2015; CREASY et al., 2018). O cromatograma resultante das etapas de captura e de eluição da faseolamina a partir do isolado proteico está representado na Figura 2.2. Os picos resultantes após a eluição com  $(NH_4)SO_4$  apresentaram boa resolução e, semelhante ao relatado por Raymond, Azanza & Fotso (1981), que separaram proteínas de isolado de girassol por HIC, um terceiro pico foi obtido após a eluição de NaOH  $500$  mM e, neste trabalho, referido interpretado como “fração proteica fortemente ligada”. As proteínas dos picos 1 e 2 foram caracterizadas quanto ao perfil eletroforético, teor de proteínas, ponto isoelétrico,  $\alpha IA$  e, em função da natureza química alcalina da solução do terceiro pico, apenas o seu teor de proteínas foi mensurado.

Figura 2.2 - Cromatograma do fracionamento do isolado proteico de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*) por cromatografia de interação hidrofóbica na matriz Fenil *StreamLine* (5 mm x 10 cm).

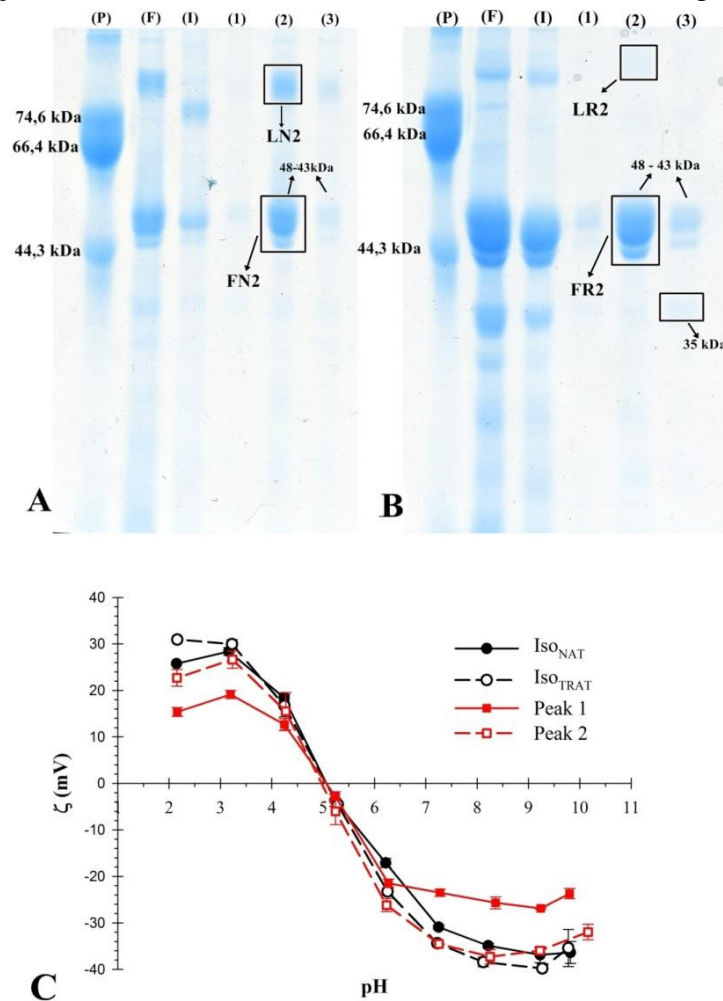


Fonte: o Autor

O progresso da purificação proteica pode ser ressaltada ao comparar os perfis eletroforético da  $Far_{des}$  (faixa F), do isolado (faixa I) e das frações (faixas 2-3) obtidas: bandas reveladas (80 kDa – 50 kDa) no perfil da farinha não apareceram nas demais amostras (FIGURA 2.3A-B). Na fração não adsorvida na etapa de captura (FIGURA 2.3A, Faixa 1) foi notada a presença discreta das bandas de massa molecular 48 – 43 kDa, neste trabalho atribuída à vicilina 7S, a faseolamina. Nas frações eluídas da fase estacionária, foi observada maior intensidade da banda de massa molecular 48 – 43 kDa no pico I na condição redutora e, além da vicilina 7S no pico II, foi notada a banda ~35 kDa que aponta ser a lectina (PHA) (FIGURA 2.3A). Além disso, no gel não redutor (FIGURA 2.3B), verificou-se a presença da banda ~80 kDa, que sugere ser a legumina 11S, uma proteína globular cuja estrutura quaternária hexamérica (330 – 410 kDa) é composta por unidades monoméricas compostas por duas cadeias polipeptídicas: uma ácida (60 – 40 kDa) e outra básica (35 – 20 kDa) que interagem via ligação dissulfídicas (LAWRENCE et al., 1994; MENG; MA, 2001). Após observação do gel da condição redutora (FIGURA 2.3B), verificou-se a ausência de duas bandas que indicassem as subunidades ácida e básica que compõem o monômero da legumina 11S. Diante disso, as bandas de maior intensidade presente na faixa do pico 1 foram avaliadas

por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF e os resultados obtidos serão apresentados mais adiante nesse artigo.

Figura 2.3 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na ausência (A) e presença (B) de  $\beta$ -mercaptoetanol: Faixa P representa o padrão de proteínas (ovotransferrina - 74,6 kDa, BSA - 66,4 kDa e ovoalbumina - 44,3 kDa), Faixa F representa a farinha desengordurada, Faixa 1 representa o conteúdo não adsorvido na coluna, Faixas 2 e 3 representam os picos I e II, respectivamente. (C) Medidas de potencial  $\zeta$  (mV) de soluções de isolados proteico de feijão comum branco nativo ( $ISO_{NAT}$ ) e do submetido a  $(NH_4)_2SO_4$  3 M ( $ISO_{TRAT}$ ), das frações coletadas (Picos 1 e 2) no fracionamento cromatográfico proteico.



Fonte: o Autor.

O potencial  $\zeta$  das proteínas em função pH foram obtidos para o  $ISO_{NAT}$ ,  $ISO_{TRAT}$  e para as frações proteicas dos picos 1 e 2 (FIGURA 2.3C). Verificou-se que o  $pI_{médio}$  do  $ISO_{TRAT}$  e das frações são muito próximos, respectivamente, 5,06, 5,06 e 4,95, inclusive do valor encontrado para o  $pI_{médio}$  do  $ISO_{NAT}$  (5,06). Esse resultado é o primeiro indício de

preservação estrutural das proteínas mesmo após serem submetidas à condição severa de *salting out* empregada no processo cromatográfico, pois, os  $pI_{\text{médio}}$  dos ISO<sub>NAT</sub> e ISO<sub>TRAT</sub> obtidos permanecem iguais.

A recuperação de proteínas pelo processo cromatográfico (TABELA 2.5) foi de 47,94% de proteínas em relação ao total injetado, sendo que 35,75±9,00% corresponde à proteica eluída sob o pico 1, 9,56±0,35 % do pico 2 e 2,64±0,12 % sob o terceiro pico. Após comparar a recuperação de proteínas obtida e o perfil eletroforético, percebe-se que houve perda de proteína durante o processo de purificação e pressupõe que isso tenha ocorrido durante o processo de troca de tampão via ultrafiltração por membrana. Diante disso, acredita-se que a minimização de etapas de manuseio das frações é uma recomendação valiosa para evitar perdas ao longo do processo de purificação. A  $\alpha$ IA das frações proteicas (pico 1 e 2) foram determinadas (TABELA 2.5) e verificou-se que a inibição foi maior para a fração do pico 2. Esse resultado contraria a hipótese esperada de se obter uma fração que exibisse a maior inibição, ou seja, rica em faseolamina (vicilina 7S) conforme prevê os dados relatados na literatura. Além da diferença da intensidade da banda 48–43 kDa, ao comparar os perfis eletroforéticos das duas frações, verifica-se a presença discreta da banda de ~35 kDa que acredita-se ser a PHA que, embora não exiba atividade inibitória, pertence à família constituída também pelas proteínas isoformas inibidoras da  $\alpha$ -amilase  $\alpha$ -AI1 e  $\alpha$ -AI2 (14 – 20 kDa).

Tabela 2.5 - Processo de separação das proteínas do isolado de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*) por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Fenil *Streamline*.

Amostra	Recuperação (%)	Proteína <sup>1</sup> (%)	$\alpha$ IA <sup>2</sup> (U.g <sub>iso</sub> <sup>-1</sup> )	$\alpha$ IA <sub>esp</sub> <sup>3</sup> (U.g <sub>prot</sub> <sup>-1</sup> )	Fator de purificação (%) <sup>4</sup>
ISO <sub>NAT</sub>	100	93,48±1,74	5274,24±86,67	5642,10	100
Pico I	35,75±9,00	87,91±2,30	1506,71±27,22	1713,92	28,57
Pico II	9,56±0,27	91,78±0,73	3522,49±58,20	3837,97	66,79
Pico III	2,64±0,12	-	-	-	-

<sup>1</sup>Teor de proteína expressos em base úmida (bu);

<sup>2</sup>Atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase do isolado proteico;

<sup>3</sup>Atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase da porção proteica presente na amostra;

<sup>4</sup>Fator de purificação=( $\alpha$ IA<sub>pico</sub>)/( $\alpha$ IA<sub>ISO</sub>);

Após fracionamento usando fase estacionária de troca aniônica (DEAE-Sephadex), Frels & Rupnow (1984) usaram a cromatografia HIC (Fenil *Streamline*) para purificar as proteínas que não adsorveram e obtiveram biomoléculas inibidoras da  $\alpha$ -amilase de feijão preto. Os autores mostraram resultados semelhantes aos alcançados neste estudo: a



Na região  $4000 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ , registrou-se os estiramentos da ligação O-H participantes das ligações de hidrogênio das interações intra e intermolecular das proteínas ( $3800 \text{ cm}^{-1}$  a  $3200 \text{ cm}^{-1}$ ) e da ligação C-H dos hidrocarbonetos insaturados ou aromáticos de lipídios ( $3000 \text{ cm}^{-1}$  a  $2800 \text{ cm}^{-1}$ ) (TAN; NGOH; GAN, 2014). Na região espectral entre  $1700 - 400 \text{ cm}^{-1}$ , observa-se a presença das bandas amida I ( $1600-1700 \text{ cm}^{-1}$ ), amida II ( $1500-1580 \text{ cm}^{-1}$ ) e amida III ( $1200-1400 \text{ cm}^{-1}$ ).

Sabendo que região da banda amida I ( $1600-1700 \text{ cm}^{-1}$ ) no espectro de proteínas é a que traduz a composição de estrutura secundária das biomoléculas, permitindo a estimativa da proporção de cada estrutura secundária (folha- $\beta$ , *random coil*,  $\alpha$ -hélice e *turn*), deconvolução da banda amida I foi realizada (FIGURAS 2.4B e 2.4C). Observando as bandas amida I ajustadas (*peakfit*) dos ISO<sub>NAT</sub> e ISO<sub>TRAT</sub>, verifica-se a presença de cinco curvas Gaussianas centradas em  $1607 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1625 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1642 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1662 \text{ cm}^{-1}$  e  $1683 \text{ cm}^{-1}$  que indicam se tratar, respectivamente, de estruturas agregadas, folha- $\beta$ , *random coil*,  $\alpha$ -hélice e *turn* (CARBONARO et al., 2008; SHEVKANI et al., 2015).

Neste estudo, a proporção média das estruturas secundárias do ISO<sub>NAT</sub> de feijão branco foi 12,23 % de estruturas agregadas ( $1607 \text{ cm}^{-1}$ ), 27,80 % de folha- $\beta$  ( $1625 \text{ cm}^{-1}$ ), 21,13 % de  $\alpha$ -hélice ( $1662 \text{ cm}^{-1}$ ), 25,61 % de *random coil* ( $1642 \text{ cm}^{-1}$ ) e 13,23 % de *turns* ( $1683 \text{ cm}^{-1}$ ) enquanto do ISO<sub>TRAT</sub> era 12,91 % de estruturas agregadas ( $1607 \text{ cm}^{-1}$ ), 29,64 % de folha- $\beta$  ( $1625 \text{ cm}^{-1}$ ), 19,7 % de  $\alpha$ -hélice ( $1662 \text{ cm}^{-1}$ ), 25,7 % de *random coil* ( $1642 \text{ cm}^{-1}$ ) e 12,05 % de *turns* ( $1683 \text{ cm}^{-1}$ ). Verifica-se que houve aumento e diminuição, respectivamente, nos conteúdos das estruturas folha- $\beta$  e  $\alpha$ -hélice do ISO<sub>TRAT</sub> em relação ISO<sub>NAT</sub>, entretanto, essa informação não é suficiente para inferir sobre significativo aumento do enovelamento estrutural devido à condição severa de *salting out*, sendo necessário realizar análise mais precisa, como o dicroísmo circular. Além disso, quando se compara os resultados supracitados aos outros obtidos por FTIR de outras variedades de feijão apresentados na literatura, observa-se semelhança entre as proporções médias de estruturas secundárias. Shevkani, Singh, Kaur & Rana, (2015) relataram proporção média do feijão comum equivalente a 38,6% de folha- $\beta$  paralela, 22,8% de  $\alpha$ -hélice, 20,1% de *turns*, 8,4% de folha- $\beta$  antiparalela e 12,6% de estruturas aglomeradas. Já Meng & Ma (2003) mencionam proporção média do feijão vermelho igual a 36 % de folha- $\beta$ , 19 % de  $\alpha$ -hélice, 17% de  $\beta$ -*turns* e 28 % *random coil*.

#### b) Espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF

A partir da espectrometria MALDI-TOF/TOF das bandas selecionadas no gel de eletroforese unidimensional, foram identificadas quatro proteínas ambas como faseolamina (TABELA 2.7). Conforme os resultados da espectrometria de massa foram identificados dez peptídeos na banda LN2 e nove na FN2 (FIGURAS 2.3A).

Embora as bandas recortadas do gel na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol apresentassem massas moleculares diferentes, segundo o *Mascot*, os peptídeos identificados são homólogos ao monômero  $\alpha$ -faseolamina, mesmo na banda LN2 onde se esperava haver legumina 11S, resultado que justifica a ausência de bandas de menores massas moleculares no gel (FIGURA 2A). As proteínas identificadas no *Mascot* foram validadas no *Scaffold* com *Threshold* > 90% e, no mínimo, 2 peptídeos em homologia com a proteína do banco de dados, ou seja, a homologia do peptídeos é significativa na identificação da  $\alpha$ -faseolamina.

As respostas encontradas para as outras duas bandas analisadas do gel redutor (LR2 e FR2) (FIGURA 2.3B) não são muito diferentes. Segundo *Mascot*, foram identificados quatro peptídeos homólogos aos monômeros  $\alpha$ - e  $\beta$ -faseolaminas na banda LR2. Entretanto, essa identificação não foi validada no *Scaffold* devido ao baixo *score*. Na banda FR2 foram identificados cinco peptídeos homólogos ao monômero  $\alpha$ -faseolamina, resultados validados pelo *Scaffold*, seguindo os mesmos parâmetros estatísticos supramencionados.

Mesmo diante da validação significativa que coincide com a composição predominante de faseolamina, acredita-se que a informação ainda é deficiente para propor uma composição proteína majoritária presente na fração obtido no pico 1 pela purificação em cromatografia HIC. É necessário empreender novos estudos que substituam a eletroforese uni por bidimensional para obtenção de mais *spots* que, junto à espectrometria de massa MALDI TOF/TOF, levariam a uma informação mais contundente sobre a composição proteica, conforme realizado por Natarajan et al. (2013) e De La Fuente et al. (2011) que identificaram  $\alpha$ - e  $\beta$ -faseolaminas, legumina, lectina e as isoformas inibidoras da  $\alpha$ -amilase, além de proteínas envolvidas no metabolismo das sementes.

Tabela 2.6 - Peptídeos encontrados em proteínas homólogas segundo *Mascot* e *Scaffold* para as bandas do gel não redutor (N) e redutor (R).

Banda	MM <sub>obs</sub> (Da)	Peptídeo <sup>1</sup>	Proteína Homóloga MASCOT	Proteína Homóloga SCAFFOLD <sup>2</sup>	UnitProt (2018)
LN2	807,4996	FEEINR(V)	X5CHW3 X5CN36 Q41115	X5CN36	$\alpha$ -faseolamina
	887,4299	<i>NQYGHIR(V)</i>			
	1050,6488	<i>LQNLEDYR(L)</i>			
	1061,6868	<i>TDNVISSIGR(A)</i>			
	1173,6759	<i>ETLEFESYR(A)</i>			
	1206,7700	<i>RLQNLEDYR(L)</i>			
	1410,8661	<i>EGALFVPHYYSK(A)</i>			
	1645,0734	<i>IPAGTIFYLVNPDPK(E)</i>			
	2025,1431	<i>ATSNVNFTGFGINANNNR(N)</i>			
	2333,2966	<i>SQPETLLLPQQADAELLVVR(S)</i>			
FN2	807,3982	FEEINR(V)	X5CN36 X5CHV9	X5CN36	$\alpha$ -faseolamina
	887,4481	<i>NQYGHIR(V)</i>			
	1050,6239	<i>LQNLEDYR(L)</i>			
	1061,6600	<i>TDNVISSIGR(A)</i>			
	1173,6549	<i>ETLEFESYR(A)</i>			
	1206,7418	<i>RLQNLEDYR(L)</i>			
	1472,8304	<i>GNKETLEFESYR(A)</i>			
	2025,1006	<i>ATSNVNFTGFGINANNNR(N)</i>			
2333,3076	<i>SQPETLLLPQQADAELLVVR(S)</i>				

MM<sub>obs</sub> = massa molecular observada<sup>1</sup>Os peptídeos escritos em Itálico foram validados no *Scaffold* com Thresold > 90 %.<sup>2</sup>As proteínas identificadas foram validadas no *Scaffold* com Thresold > 90% e, no mínimo, 2 peptídeos em homologia com a proteína do banco de dados.

Tabela 2.7 - Peptídeos encontrados em proteínas homólogas segundo *Mascot* e *Scaffold* para as bandas do gel não redutor (N) e redutor (R). (Continuação)

<b>Banda</b>	<b>MM<sub>obs</sub> (Da)</b>	<b>Peptídeo<sup>1</sup></b>	<b>Proteína Homóloga MASCOT</b>	<b>Proteína Homóloga SCAFFOLD<sup>2</sup></b>	<b>UnitProt (2018)</b>
LR2	887,5682	NQYGHIR(V)			
	1050,5004	LQNLEDYR(L)	X5CHW3		α-faseolamina
	1173,6890	ETLEFESYR(A)	X5CN36	-	
	1206,7755	RLQNLEDYR(L)	Q41115		
	887,5682	NQYGHIR(V)			
	1050,5004	LQNLEDYR(L)	A0A0A0P203		β-faseolamina
	1173,6890	ETLEFESYR(A)	P02853	-	
	1206,7755	RLQNLEDYR(L)			
FR2	807,3945	FEEINR(V)			
	887,5447	<i>NQYGHIR(V)</i>			
	1050,6360	<i>LQNLEDYR(L)</i>	X5CHV9	X5CN36	α-faseolamina
	1173,6708	ETLEFESYR(A)	X5CN36		
	1206,6278	RLQNLEDYR(L)			

MM<sub>ob</sub> = massa molecular observada

<sup>1</sup>Os peptídeos escritos em Itálico foram validados no *Scaffold* com Thresold > 90 %.

<sup>2</sup>As proteínas identificadas foram validadas no *Scaffold* com Thresold > 90% e, no mínimo, 2 peptídeos em homologia com a proteína do banco de dados.

#### 4 - CONCLUSÃO

O processo de produção de extrato proteico de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*) por solubilização salina (NaCl) leva a produção de isolados (>90% proteína). Dentro dos limites das variáveis independentes da etapa de enriquecimento de proteínas, a variável Proporção  $\text{NaCl}_{\text{aq}}:\text{Farinha}_{\text{des}}$  possui efeito linear negativo significativo sobre a capacidade de inibir a  $\alpha$ -amilase do isolado proteico, enquanto que a temperatura não exibe efeito significativo sobre a mesma resposta. Os resultados do processo de separação das proteínas via cromatografia HIC, usando fase móvel constituída de 3,0 de sulfato de amônio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ , sugerem não conduzir ao fracionamento onde amostra proteica de alta pureza seja pura, sobretudo, de vicilina 7S. Além disso, sugere-se que a vicilina não é responsável pela maior parcela de inibição da  $\alpha$ -amilase e, sim, atua na defesa do tecido vegetal em conjunto com outras proteínas inibidoras do tipo lecitina denominadas isoformas inibidoras da  $\alpha$ -amilase. A composição média das estruturas secundárias do isolado proteico de feijão comum branco tem a estrutura folha- $\beta$  com predominância. E, mesmo os resultados de espectrometria de massa indiquem predominância do monômero  $\alpha$ -faseolamina, presume-se serem ínfimos os argumentos que reforçam a predominância da vicilina 7S na maior fração produzida por cromatografia HIC, sendo necessárias mais avaliações para tal confirmação.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a FAPEMIG pelo apoio financeiro a esta pesquisa, ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) na UFV pelas avaliações de espectrometria MALDI TOF/TOF e obtenção das imagens de gel eletroforético (*ImageScanner*).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJIBOLA, C. F. et al. Polypeptide composition and functional properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) albumin, globulin and protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 189–200, 2016.

ALLI, I. et al. Identification and characterization of phaseolin polypeptides in a crystalline protein isolated from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1830–1834, 1993.

ALVES, N. E. G. . et al. Digested protein isolate from fresh and stored Carioca beans reduced markers of atherosclerosis in oxidized LDL-induced THP-1 macrophages. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 97–111, 2016.

BAUMANN, P.; BAUMGARTNER, K.; HUBBUCH, J. Influence of binding pH and protein solubility on the dynamic binding capacity in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1396, p. 77–85, 2015.

BERNFELD, P. Amylases, alpha and beta. **Methods in enzymology I**, v. I, n. 540, p. 149–158, 1955.

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

CARBONARO, M. et al. Application of Fourier transform infrared spectroscopy to legume seed flour analysis. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 361–368, 2008.

CHEL-GUERRERO, L. et al. Physicochemical and structural characterization of Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) globulins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 9, p. 1537–1544, 2007.

CREASY, A. et al. Gradient elution behavior of proteins in hydrophobic interaction chromatography with U-shaped retention factor curves. **Journal of Chromatography A**, v. 1547, p. 53–61, 2018.

DE LA FUENTE, M. et al. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 2, p. 262–267, 2011.

EVANGELHO, J. A. . et al. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food Chemistry**, v. 214, p. 460–467, 2017.

FANTINI, N. et al. Reducing effect of a Phaseolus vulgaris dry extract on food intake, body weight, and glycemia in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9316–9323, 2009.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/>. Acesso em 21 de fevereiro de 2020 às 15:30.

FRELS, J. M.; RUPNOW, J. H. Purification and partial characterization of two  $\alpha$ -amylase inhibitors from black bean. **Journal of Food Biochemistry**, v. 8, n. 4, p. 281–301, 1984.

FUENTE, M. D. L. et al. In-Depth Characterization of the Phaseolin Protein Diversity of Common Bean (Phaseolus vulgaris L.) Based on Two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry. v. 50, n. 3, p. 315–325, 2012.

GARCÍA-LAFUENTE, A. et al. In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. **Food Chemistry**, v. 161, p. 216–223, 2014.

GLASSFORD, S. E.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S. G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 12, p. 2849–2858, 2013.

GORNALL, A. G. .; BARDAWILL, C. J. .; DAVID, M. M. . Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 177, n. 2, p. 751–766, 1949.

HE, Q. . et al. PEGylation of black kidney bean (Phaseolus vulgaris L.) protein isolate with potential functional properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 164, p. 89–97, 2018.

JAFFÉ, W. G. .; HANNIG, K. . Fractionation of Proteins Beans (Phaseolus vulgaris). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 109, p. 80–91, 1965.

KELLER, A. . et al. Empirical statistical model to estimate by accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 17, p. 5383–2392, 2002.

LAWRENCE, M. C. et al. Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution: implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 238, p. 748–776, 1994.

LEE, S.-C. .; GEPTS, P. L. .; WHITAKER, J. R. . Protein structures of common bean (Phaseolus vulgaris) alpha-amylase inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6618–6627, 2002.

LÓPEZ-PEDROUSO, M. et al. Evaluating two-dimensional electrophoresis profiles of the protein phaseolin as markers of genetic differentiation and seed protein quality in common

bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 29, p. 7200–7208, 2014.

MENG, G. T.; MA, C. Y. Thermal properties of *Phaseolus angularis* (red bean) globulin. **Food Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 453–460, 2001.

MENG, G. T.; MA, C. Y. Characterization of globulin from *Phaseolus angularis* (red bean). **Food Research International**, v. 35, n. 4, p. 687–695, 2002.

MENG, G. T.; MA, C. Y. Raman spectroscopic study of globulin from *Phaseolus angularis* (red bean). **Food Chemistry**, v. 81, n. 3, p. 411–420, 2003.

MONTOYA, C. A. et al. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 443–449, 2010.

MUNDI, S.; ALUKO, R. E. Effects of NaCl and pH on the structural conformations of kidney bean vicilin. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 624–630, 2013.

NATARAJAN, S. S. et al. Proteomic Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. **Journal of basic and applied sciences**, v. 9, p. 424–437, 2013.

NESVIZHSHKII, A. I. et al. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646–4658, 2003.

OOMAH, B. D. .; MAZZA, G. .; CUI, W. . Optimization of protein extraction from flaxseed meal. **Food Research International**, v. 27, n. 4, p. 355–361, 1994.

PUEYO, J. J. .; HUNT, D. C. .; CHRISPPEELS, M. J. . Activation of Bean (*Phaseolus vulgaris*)  $\alpha$ -amylase inhibitor requires proteolytic processing of the proprotein. **Plant Physiol.**, v. 101, p. 1341–1348, 1993.

RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A. K. . et al. Potential role of bioactive compounds of *Phaseolus vulgaris* L. on lipid-lowering mechanisms. **Food Research International**, v. 76, n. P1, p. 92–104, 2015.

RAYMOND, J.; AZANZA, J. L.; FOTSO, M. Hydrophobic interaction chromatography: new method for sunflower protein fractionation. **Journal of Chromatography**, v. 212, p. 199–209, 1981.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2007.

SHEVKANI, K. et al. Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 679–689, 2015.

SUN, S. M. et al. Reversible and Irreversible Dissociation of Globulins from Phaseolus vulgaris Seed. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 7, p. 2118–2121, 1974.

TAN, E.-S.; NGOH, Y.-Y.; GAN, C.-Y. A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation. **Food Chemistry**, v. 152, p. 447–455, 2014.

TANG, C. H. Thermal denaturation and gelation of vicilin-rich protein isolates from three Phaseolus legumes: A comparative study. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 1380–1388, 2008.

TANG, C. H.; SUN, X. Structure–physicochemical function relationships of 7S globulins (vicilins) from red bean (Phaseolus angularis) with different polypeptide constituents. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 536–544, 2011a.

TANG, C. H.; SUN, X. A comparative study of physicochemical and conformational properties in three vicilins from Phaseolus legumes: Implications for the structure-function relationship. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 315–324, 2011b.

TANIZAKI, M. M. .; LAJOLO, F. . Kinetics of the interaction of pancreatic alfa-amylase with a kidney bean (Phaseolus vulgaris) - amylase inhibitor. **Journal of Food Biochemistry**, v. 9, n. 1985, p. 71–89, 1984.

UDANI, J.; TAN, O.; MOLINA, J. Systematic Review and Meta-Analysis of a Proprietary Alpha-Amylase Inhibitor from White Bean (Phaseolus vulgaris L.) on Weight and Fat Loss in Humans. **Foods**, v. 7, n. 4, p. 63, 2018.

WANI, I. A. et al. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (Phaseolus vulgaris L.) protein isolates. **Food Research International**, v. 76, n. P1, p. 11–18, 2014.

YAO, Y. . et al. Comparisons of phaseolin type and  $\alpha$ -amylase inhibitor in common bean (Phaseolus vulgaris L.) in China. **The Crop Journal**, v. 4, n. 1, p. 68–72, 2016.

YIN, S. W. et al. Functional and conformational properties of phaseolin (Phaseolus vulgris L.) and kidney bean protein isolate: A comparative study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 4, p. 599–607, 2010.

ZHANG, Y. H. et al. Thermal aggregation and gelation of kidney bean (Phaseolus vulgaris L.) protein isolate at pH 2.0: Influence of ionic strength. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 266–274, 2010.

### **CAPITULO 3 - ESTUDO DO EFEITO DO pH E CONCENTRAÇÃO DE NaCl SOBRE AS PROPRIEDADES TENSOATIVAS SUPERFICIAL DAS PROTEÍNAS GLOBULARES DE FEIJÃO COMUM BRANCO (*Phaseolus vulgaris*).**

Lucidarce Martins da MATTA<sup>a1</sup>, Eduardo Basílio de OLIVEIRA<sup>a</sup>, Márcia Cristina Teixeira Ribeiro VIDIGAL<sup>a</sup>, Valéria Paula Rodrigues MINIM<sup>a</sup>, Luís Antônio MINIM<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Avenida P.H. Rolfs Campus Universitário, Viçosa-MG, Brazil, CEP: 36570-000

#### **RESUMO**

Os efeitos da variação do pH e da concentração de NaCl sobre as propriedades reológicas superficiais do isolado proteico de feijão comum branco (IFB) foram avaliados pelo método da gota pendente. O estudo foi realizado por meio de experimentos fatoriais 3<sup>2</sup> em delineamento inteiramente casualizado tendo pH (3, 5 e 7) e concentração de NaCl (0 %, 1,5 % e 3,0% - m/v) como fatores. As medidas da tensão interfacial ( $\sigma$ ) foram realizadas por três horas e, sem seguida, investigadas as propriedades dilatacionais dos filmes mediante oscilações harmônicas. Verificou-se a diminuição da  $\sigma$  do filme interfacial ao longo do tempo em todos os tratamentos e que variação do pH e da concentração de NaCl podem afetar o desempenho da capacidade do IFB em reduzir a tensão interfacial. O IFB preparado em pH 5 sem NaCl apresentou a maior taxa de decaimento ( $k = 1,163$  ms) e o menor valor de tensão interfacial de equilíbrio ( $\sigma_{eq} = 9,173$  mN/m). A variação do pH e da concentração de NaCl não possuem efeito significativo ( $Pr > 0,05$ ) sobre os parâmetros de decaimento da  $\sigma$ . Os filmes superficiais apresentaram estrutura gélida com viscoelasticidade, a presença de baixas concentrações NaCl favoreceu o aumento do modulo viscoelástico (E) em qualquer pH, mas,

---

<sup>1</sup>Autores correspondentes.

Lucidarce M. da Matta, telefone: +55 (31) 99910-9790, e-mail: [lucidarcedamatta@gmail.com](mailto:lucidarcedamatta@gmail.com)

Luís Antônio Minim, telefone: +55 (31) 3612-6713, e-mail: [lminim@ufv.br](mailto:lminim@ufv.br)

Coautores:

Eduardo B. Oliveira, telefone: +55 (31) 3612-6751, e-mail: [eduardo.basilio@ufv.br](mailto:eduardo.basilio@ufv.br)

Márcia C. T. R. Vidigal, telefone: +55 (31) 3612-6718, e-mail: [marcia.vidigal@ufv.br](mailto:marcia.vidigal@ufv.br)

Valéria P. R. Minim, telefone: +55(31) 3612-6714, e-mail: [yprm@ufv.br](mailto:yprm@ufv.br)

os maiores valores do módulo E foram obtidos para amostras preparadas em pH 3, com ou sem sal. Portanto, concluiu-se que a variação do pH e da concentração de NaCl do meio não exibiriam efeitos significativos sobre os parâmetros de decaimentos da tensão interfacial obtidos no estudo das propriedades superficiais das proteínas do isolado de feijão comum branco. Por outro lado, tal variação gerou ganho ou perda de viscoelasticidade do filme.

Palavras-chaves: *Phaseolus vulgaris*, interface ar/água, solubilidade, tensão interfacial de equilíbrio, módulo viscoelástico.

## 1 - INTRODUÇÃO

O comportamento de consumo sustentável da população mundial com hábitos alimentares saudáveis e o contínuo crescimento da demanda por alimentos isentos de glúten, lactose e proteínas animais, têm impulsionado o crescimento da oferta de fontes proteicas vegetais. Atualmente, o uso das proteínas de sementes de leguminosas ainda é limitado porque o valor nutricional é menor comparado ao das proteínas animais, apresentam fatores antinutricionais e o desempenho das funcionalidades tecnológicas das proteínas vegetais ainda fica aquém das proteínas animais, sendo a proteína da soja a única proteína vegetal explorada em volumes significativos como ingrediente da dieta humana (RIZZO; BARONI, 2018). Embora, a proteína de soja seja considerada um bom ingrediente tecnológico, a comunidade científica busca por novas proteínas de leguminosas para serem lançadas no mercado de ingredientes alimentares.

O feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*) é uma leguminosa muito consumida nos países da América Latina e da Ásia porque é fonte de carboidratos, de proteínas, de fibras e de sais minerais (CARBONARO, 2006). Recentemente, o feijão comum branco vem recebendo muita atenção de pesquisadores interessados em tirar proveito da capacidade de inibitória da  $\alpha$ -amilase da leguminosa no tratamento da diabetes. A inibição da  $\alpha$ -amilase leva as reduções da quantidade de alimento ingerida, do nível de glicose na corrente sanguínea e do ganho do peso corporal (MA et al., 2018; PEREIRA et al., 2012; UDANI, TAN, & MOLINA, 2018).

Embora esteja frequentemente presente na nutrição humana, o feijão comum branco e outras variedades desse grão podem se tornar *commodities* agrícolas valorizadas.

Isso porque a proteína de feijão pode se tornar um ingrediente proteico vegetal seguro destinado à produção de alimentos industrializados, assim como ocorre com a proteína de soja. A parcela proteica do feijão é constituída, principalmente, por globulinas e albuminas. As globulinas são as proteínas de reserva predominantes no feijão e classificadas segundo o coeficiente de sedimentação em vicilina 7S e legumina 11S (CHAGAS; SANTORO, 1997; DANIELSSON, 1949a; DERBYSHIRE; WRIGHT; BOULTER, 1976; DURANTI; GIUS, 1997).

Nos últimos anos, foram publicadas pesquisas que mostraram que os extratos proteicos nativos de feijão, majoritariamente, extraídos por solubilização alcalina e precipitação isoelétrica apresentaram solubilidade dependente do pH, sendo mínima na faixa de  $4 < \text{pH} < 6$ , e que possuíam boa atividade tensoativa, podendo haver melhoria via modificação estrutural (GALVÁN et al., 2018; HE et al., 2018; JAFARI et al., 2015). A maioria dos estudos sobre a ação tensoativa das proteínas de feijão abordaram as propriedades emulsificantes. As poucas informações encontradas sobre as propriedades espumantes de proteínas de feijão mostraram boa habilidade de formar e estabilizar as interfaces ar/água, os dados relacionaram essa capacidade às características moleculares (tamanho, formato, carga elétrica líquida e massa) e a colocaram, diretamente, dependente da solubilidade (HOJILLA-EVANGELISTA et al., 2018; LAFARGA et al., 2018). Resultados de fluorescência mostram que as estruturas terciárias das proteínas de feijão comum são altamente enoveladas e compactas (EVANGELHO et al., 2017; MAKRI; DOXASTAKIS, 2006; SHEN; TANG, 2014; WANI et al., 2014), particularidades que podem influenciar o equilíbrio termodinâmico entre interações proteína-proteína e proteína-água que expressa à solubilidade da biomolécula.

Entre os resultados encontrados, sobre as propriedades espumantes das proteínas de feijão comum, não foram localizados relatos de informações sobre as propriedades reológicas de filmes na interface ar/água formados pela adsorção de proteínas de feijão comum. O estudo das propriedades reológicas interfaciais é considerado importante na compreensão do processo de formação e estabilização cinética de dispersões líquidas preparadas com tensoativo. A magnitude dessas propriedades fornece informações do processo adsorptivo das biomoléculas na interface através da dinâmica de redução da tensão interfacial ( $\sigma$ ) e inferências sobre a estabilidade cinética da dispersão por meio da reologia dilatacional do filme, em outras palavras, através da viscoelasticidade dos filmes formados na interface (BOS; VLIET, 2001; MILLER; LIGGIERI, 2009). Levando em consideração que não foram encontradas pesquisas sobre as propriedades reológicas dos filmes interfaciais formados por proteínas de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*) tampouco sobre o efeito

do pH e da concentração de NaCl sobre o desempenho da ação interfacial das biomoléculas citadas, o principal objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do pH e da concentração de NaCl sobre as propriedades superficiais de proteínas de feijão comum branco pelo método da gota pendente. As propriedades superficiais foram medidas por ensaios dinâmicos e oscilatórios/dilatacional da interface ar/água.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 - Material**

O feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*), adquirido no comércio de Viçosa (MG). A albumina sérica bovina (BSA) foi adquirida da marca Sigma – Aldrich e os demais reagentes usados foram de grau analítico.

### **2.2 - Produção do isolado proteico de feijão comum branco**

Os grãos foram imersos em água destilada a 8 °C por 8 h para remoção manual do revestimento. Os cotilédones foram desidratados (50 °C por 8 h), triturados em processador doméstico e a farinha foi armazenada a -18 °C sob vácuo. A farinha foi desengordurada (Far<sub>des</sub>) usando hexano na proporção 1:6 (m:v) em extrator Soxhlet por 6 h de recirculação. A Far<sub>des</sub> foi misturada na proporção 3,9 mL.g<sup>-1</sup> a 50 mM de fosfato de sódio (pH 8,0) contendo NaCl 600 mM, previamente equilibrado a 27,5 °C. A mistura foi mantida em agitação magnética por 60 min, depois centrifugada (7000 x g por 40 min, 4 °C). O sobrenadante foi dialisado (12,4 kDa *cut-off*) contra água ultrapura (Milli-Q, Milipore, EUA) a 4 °C por 7 dias. O conteúdo dialisado foi centrifugado (9000 x g por 40 min, 4 °C) e o precipitado lavado com água ultrapura, centrifugado (9000 x g por 40 min, 4 °C) e liofilizado (-34 °C e 0,25 mbar) (Alpha 2-4 LD plus, Martin Christ, Alemanha) (AJIBOLA et al., 2016; OOMAH; MAZZA; CUI, 1994; SUN et al., 1974). O teor de proteínas do isolado proteico de feijão comum branco (IFB) produzido foi mensurado pelo método do Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949) e armazenado a -18 °C e protegido da luz até ser avaliado quanto à solubilidade e às propriedades interfaciais.

### 2.3 - Solubilidade

O perfil de solubilidade em função do pH (2 – 10) foi determinado usando soluções do IFB (0,5 % - m/v) preparadas em água ultrapura (Milli-Q, Milipore, EUA) e em soluções de NaCl (100 mM e 500 mM). O pH foi ajustado usando 1 M HCl ou 1 M NaOH, em seguida, as soluções foram centrifugadas (7000 x g por 20 min, 20 °C). O teor de proteína no sobrenadante foi mensurado pelo método do Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949). A solubilidade (%) foi expressa em relação ao teor total de proteína.

### 2.4 - Estudo das propriedades reológicas superficiais

As propriedades superficiais do IFB foram estudadas por meio de experimentos fatoriais  $3^2$  em Delineamento Inteiramente Casualizado, em triplicatas, tendo como variáveis: pH e concentração de NaCl (TABELA 3.1). Os efeitos das variáveis foram avaliados por regressão usando o teste F e a comparação de médias foi realizada usando o teste Tukey, ambos ao nível de confiança ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas usando o software *Statistical Analysis System*® versão 9,0 (SAS Institute Inc., EUA).

Tabela 3.1 – Níveis das variáveis do estudo de avaliação das propriedades superficiais do filme contendo isolado proteico de feijão comum branco ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Variáveis reais	Variáveis codificadas	Níveis		
pH	$X_1$	3,0	5,0	7,0
NaCl (%)	$X_2$	0	1,5	3,0

Soluções estoques do IFB ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foram preparadas com tampão fosfato-citrato (50 mM, pH  $X_1$ ) contendo NaCl ( $X_2$  %) e deixadas em repouso (8h) para hidratação. Alíquotas foram diluídas no mesmo tampão para o preparo de soluções de IFB ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) destinadas as avaliações interfaciais. Azida sódica foi adicionada (0,1 % - m/v) como conservante no preparo dos tampões.

## 2.5 - Propriedades reológicas superficiais

As avaliações dinâmicas e dilatacionais do filme superficiais foram realizadas pelo método da gota pendente em tensiômetro (PAT-1M, Sinterface Technologies, Alemanha) usando software Profile Analyses Tensiometer (PAT-1M – versão 1.5.0.729). O volume da gota foi mantido constante (15 mm<sup>3</sup>), automaticamente, e a equação de Young-Laplace foi ajustada ao perfil da gota formada por meio da tensiometria analítica do perfil da gota para determinação da tensão interfacial. O método de calibração do equipamento foi o diâmetro do capilar. As medidas foram realizadas, em triplicata, usando um capilar de aço inox de 2 mm de diâmetro e uma cubeta vazia mantida em compartimento termostaticado por circulação de água a 25 °C ± 0,2 °C.

### 2.5.1 - Propriedades dinâmicas

A variação da tensão interfacial de cada sistema foi estimada durante três horas (t = 10 800 s) e o valor da tensão interfacial de equilíbrio ( $\sigma_{eq}$ ) foi determinado usando extrapolação ao longo do tempo do modelo exponencial de decaimento (EQUAÇÃO 3.1) empírico ajustado:

$$\sigma = \sigma_{eq} + A \cdot e^{-kt} \quad \text{Equação 3.1}$$

em que  $\sigma$  é a tensão interfacial (mN.m<sup>-1</sup>) no tempo t (s), A é a constante de ajuste (mN.m<sup>-1</sup>) e k é a constante relacionada a taxa de decaimento (s<sup>-1</sup>) de tensão até que alcance o valor de equilíbrio. A estimativa do instante  $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$  foi realizada usando na Equação 1 a ponderação  $\sigma - \sigma_{eq} = 0,005$ .

### 2.5.2 - Medidas reológicas dilatacionais

Os ensaios oscilatórios harmônicos da gota foram realizados ao fim das medidas de tensão interfacial ( $t_{final} = 10\ 800$  s), condição adotada como de equilíbrio. Uma varredura de frequência foi realizada para determinar a faixa de viscoelasticidade linear antes da realização dos ensaios. As oscilações foram realizadas no intervalo de frequência de 0,01 – 0,5 Hz com amplitude fixa de deformação (3 %) do volume da gota. Durante as perturbações, foram feitas

medidas da tensão interfacial harmônica. Estes resultados foram analisados usando transformação de Fourier para determinar parâmetros dilatacionais: módulo de viscoelasticidade ( $E$ ), componentes elástica ( $E'$ ) e viscosa ( $E''$ ). O módulo  $E$  foi obtido por meio da relação entre a variação da tensão interfacial ( $\sigma$ ) e a mudança da área superficial ( $A$ ) da gota:  $E = d\sigma/d \ln A$ . O módulo complexo  $E$  consiste dos componentes real (módulo elástico dilatacional superficial –  $E' = |E| \cos\theta$ ) e imaginário (módulo viscoso dilatacional superficial –  $E'' = |E| \sin\theta$ ) (EQUAÇÃO 3.2).

$$E = E' + iE'' \quad \text{Equação 3.2}$$

em que  $i = \sqrt{-1}$ .  $E'$ , variável do comportamento conservativo na interface.

Para um material perfeitamente elástico, o cisalhamento e a deformação estão na fase  $\varphi = 0$  e a componente de perda ou viscoso  $E''$  (imaginário) é zero. No caso de um material perfeitamente viscoso, o ângulo de fase  $\varphi = 90^\circ$  e o termo de armazenamento ou elástico  $E'$  (real) é zero (RUÍZ-HENESTROSA et al., 2007).

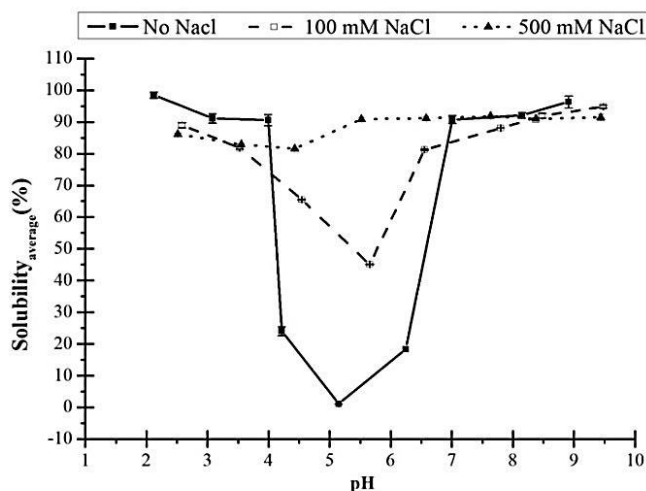
### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Solubilidade

O perfil de solubilidade média em água ultrapura do IFB (FIGURA 3.1) sugere que a propriedade é dependente do pH porque houve variação dos valores na faixa de pH 2 – 10: a solubilidade média do isolado na faixa de pH 4,2 – 6,5 foi inferior a 25 % (m/v) e, ao redor do pH 5,0 foi mínima. O formato “U” do perfil observado neste estudo é uma característica também relatada para extrato proteico de feijões comum (WANI et al., 2014; YIN et al., 2010), vermelho (TANG; SUN, 2011a, 2011b), preto (WANI; SOGI; GILL, 2015). A mínima solubilidade observada na faixa de pH 4,2 – 6,5 pode ser resultado, inicialmente, da prevalência de interações eletrostáticas atrativas proteína-proteína que geram a formação dos agregados e, posteriormente, a presença de interações hidrofóbicas proteína-proteína, que mantém os agregados preservados. A justificativa da mínima solubilidade observada é possível porque dentro da faixa de pH 4,2 – 6,5 está o  $pI_{\text{médio}}$  (5,06) do IFB,

condição na qual há neutralização de cargas elétricas e a estrutura terciária das vicilinas torna-se mais compacta (MUNDI; ALUKO, 2013).

Figura 3.1 - Solubilidade do isolado proteico de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*) em função da variação de pH. (■) Sem NaCl, (□) 1,5 % NaCl e (▲) 3,0 % NaCl.



Fonte: o Autor.

Ponderando que a presença de íons salinos afetaria as interações eletrostáticas proteína-proteína, determinou-se o perfil de solubilidade média do IFB em 100 mM e 500 mM de NaCl em função do pH (FIGURA 3.1). Observa-se que o aumento da concentração de NaCl causou um aumento na solubilidade média na faixa de pH 4,2 – 6,5 do IFB. A presença de íons salinos altera o balanço de cargas elétricas presentes no meio, modificando as cargas elétricas da superfície da proteína, podendo causar mudanças conformacionais das proteínas globulares. Este evento reduz as interações hidrofóbicas proteína-proteína e favorece as interações proteína-água (MUNDI; ALUKO, 2013), tidas como fundamentais para solubilidade da biomolécula.

## 3.2 - Propriedades superficiais do isolado proteico

### 3.2.1 - Tensão interfacial de equilíbrio

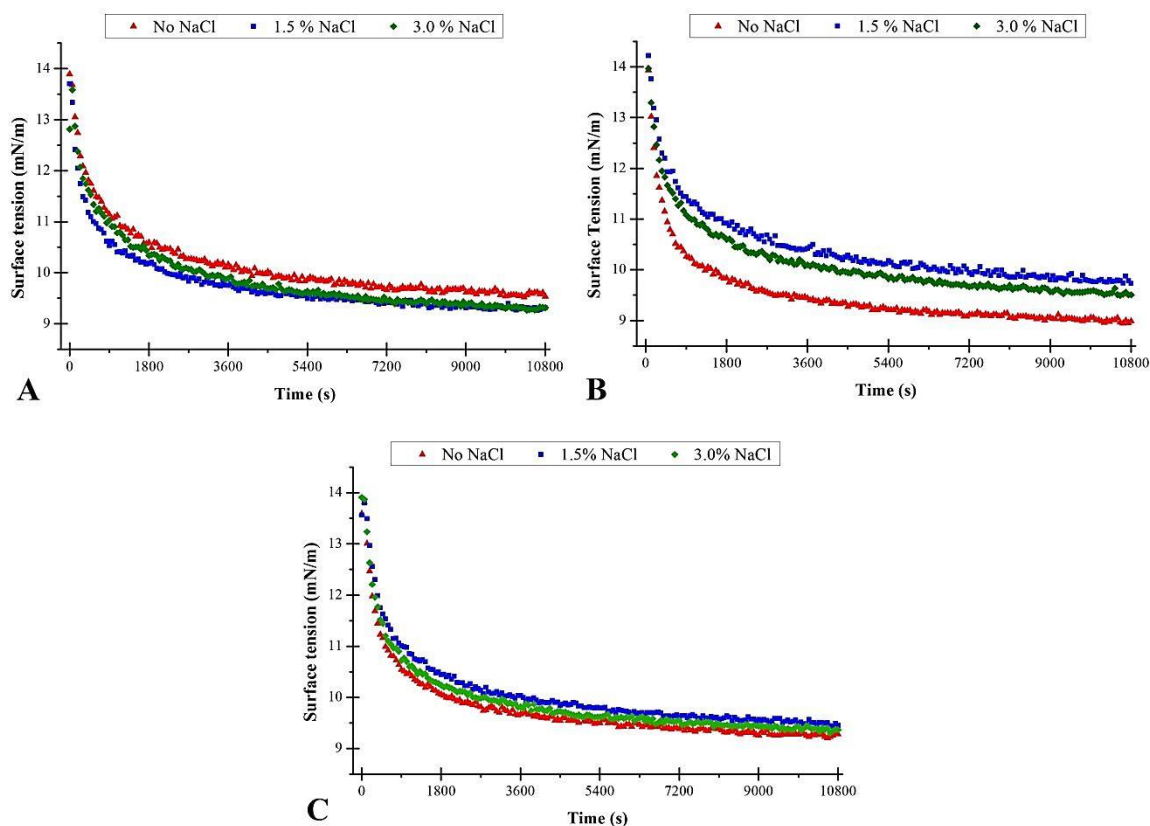
Os decaimentos da tensão interfacial ( $\sigma$ ) do filme contendo IFB preparado em diferentes condições de pH (3, 5 e 7) e concentração de NaCl (0 %, 1,5 % e 3,0 % - m/v) e os perfis estão apresentados na Figura 3.2. A diminuição da  $\sigma$  observada para os tratamentos

confirmam que as proteínas do IFB são capazes de adsorver na interface ar/água. A variação cinética da  $\sigma$  é associada ao processo termodinâmico de adsorção da proteína na interface que acontece em três etapas diferentes conforme descrito por MacRitchie (1989): difusão da proteína para a interface, adsorção, desenovelamento e rearranjo molecular na região interfacial.

Conforme foi verificado no teste de solubilidade (item 3.1), a presença e a concentração de NaCl pode interferir no desempenho das interações proteínas-água que regem a solubilidade das proteínas globulares do IFB na faixa de pH 4,0 – 7,0. E, avaliando os decaimentos mostrados na Figura 3.2, nota-se que a presença de NaCl também pode afetar o desempenho da capacidade do IFB em reduzir a  $\sigma$  na região superficial. Isso porque a variação do pH e da concentração de NaCl pode ter influenciado no processo de adsorção da proteína na região interfacial, provavelmente, por causar mudanças na organização estrutural, na flexibilidade e na capacidade de desenovelamento das cadeias polipeptídicas causadas por mudanças no balanço elétrico do meio (MUNDI; ALUKO, 2013). Consequentemente, interferindo no desempenho das interações proteína-proteína, essenciais para a formação e preservação de filmes interfaciais.

A Figura 3.2A apresenta as variações cinéticas da  $\sigma$  do IFB preparado no pH 3 na ausência e presença de NaCl. Analisando os perfis de redução, pode se observar que a presença do sal influenciou no decaimento da propriedade termodinâmica, pois, a variação cinética foi menor (13,893 – 9,533 mN/m) no meio sem NaCl. Após comparação dos valores da  $\sigma$  entre tratamentos no instante  $t = 1800$  s (FIGURA 3.2A), observou-se que o valor da  $\sigma$  foi menor na presença de 1,5 % (m/v) NaCl, evento que sugere que, nessa concentração salina, as proteínas do IFB desenvolveram sua propriedade de reduzir a  $\sigma$  com maior agilidade no pH 3.

Figura 3.2 - Perfil de decaimento cinético da tensão interfacial do filme superficial contendo  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IFB preparados em 50 mM fosfato-citrato ( $\blacktriangle$  0 % NaCl,  $\blacksquare$  1,5 % NaCl e  $\blacklozenge$  3,0 % NaCl): (A) pH 3, (B) pH 5 e (C) pH 7.



Fonte: o Autor.

Os perfis de decaimento da  $\sigma$  obtidos em pH 5 (Figura 3.2B) apontam que a presença do NaCl pode interferir negativamente no processo adsorptivo das proteínas globulares do IFB, pois, observou-se que esse sal pode retardar o processo de redução cinética da  $\sigma$ . O perfil obtido na ausência de NaCl apresentou a maior variação ( $13,951 - 8,987$  mN/m), seguido pela obtida em 1,5 % NaCl ( $13,716 - 9,713$  mN/m). Esse resultado contraria a informação encontrada na literatura de que a solubilidade é o requisito para haver bom desempenho da habilidade tensoativa superficial, pois, conforme verificado anteriormente (FIGURA 3.1), as proteínas globulares do IFB exibiram mínima solubilidade no pH 5, valor que se aproxima ao  $pI_{\text{média}}$  do isolado.

A Figura 3.2C apresenta os perfis de redução cinética da  $\sigma$  em pH 7 na ausência e presença de NaCl. Avaliando os resultados, verificou-se que novamente a presença do NaCl pode influenciar negativamente o processo de redução da  $\sigma$ . Isso porque, após comparar os valores da  $\sigma$  no instante  $t = 1800$  s (FIGURA 3.2C), foi possível verificar que a tensão obtida

na ausência de NaCl foi a menor (10,055 mN/m), seguida pela obtida em 3,0 % NaCl (10,234 mN/m) e, por última, a obtida em 1,5 % NaCl (10,444 mN/m).

Os valores de tensão interfacial de equilíbrio ( $\sigma_{eq}$ ), taxa de decaimento ( $k$ ) e do instante  $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$  foram estimados pela Equação 3.1 e estão na Tabela 3.2. Analisando os valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) verifica-se que os dados ajustam-se ao modelo exponencial usado: os valores de  $R^2$  foram maiores que 0,9. Os valores de  $\sigma_{eq}$  variaram de 9,173 - 9,959 mN/m, de taxa de decaimento variaram de 0,628 – 1,163 ms e do instante  $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$  variaram de 5 782 – 11 507 s. Avaliando os resultados do pH 3, observa-se que a média de  $\sigma_{eq}$  da solução proteica preparada com 1,5 % NaCl (T2) apresentou o menor valor, porém, sem diferir significativamente ( $Pr < 0,05$ ) da média obtida com 3,0% NaCl (T3). Além disso, verificou-se que o IFB preparado no pH 3 com 1,5% de sal (T2) apresentou a maior taxa de decaimento e alcançou a  $\sigma_{eq}$  porque apresentou o menor valor de  $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$ .

Entre os sistemas proteicos preparados no pH 5, observou-se que as médias de  $\sigma_{eq}$ ,  $k$  e  $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$ , estatisticamente, diferem entre si ao nível de probabilidade 0,05. Além disso, verificou-se que o isolado preparado nesse pH sem sal (T4) apresentou o melhor desempenho no decaimento da tensão porque apresentou a maior taxa de decaimento, atingiu mais rápido a  $\sigma_{eq}$  e ainda apresentou o menor valor de tensão interfacial de equilíbrio, contrariando a mínima solubilidade no pH 5 verificada anteriormente (FIGURA 3.1). Este resultado sugere que as proteínas globulares de feijão comum branco mantidas em pH 5 sem sal podem apresentar melhor propriedade adsorptiva na interface ar/água dentro dos níveis de pH e concentração de NaCl analisados.

Analisando os resultados do IFB preparado no pH 7, averiguou-se que a presença de NaCl pode ter interferido negativamente no processo de redução da tensão, pois, no perfil do IFB sem sal, notou-se que  $\sigma_{eq}$  foi alcançada em menor intervalo de tempo e que sua média foi a menor entre os demais tratamentos do pH neutro. Além disso, verificou-se que as médias de  $\sigma_{eq}$  dos tratamentos com 1,5 % e 3,0 % de sal não tiveram diferenças significativas ( $Pr < 0,05$ ) entre si, semelhante ao observado nos tratamentos com pH 3.

No mais, em geral, é possível sugerir que as proteínas do IFB podem desempenhar com mais agilidade sua atividade superficial no pH neutro do que no pH 3, seja na ausência ou presença de NaCl. Isto porque se notou que os valores de  $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$  determinado para as amostras preparadas no pH 7 são menores aos obtidos no pH 3.

Tabela 3.2 - Parâmetros do modelo exponencial de decaimento ajustado aos dados de tensão interfacial experimental ( $\sigma$ ) da superfície contendo 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IFB em função do pH (3, 5 e 7) e da concentração de NaCl (0 %, 1,5 % e 3,0 % - m/v).

TRAT	pH	NaCl (%)	Parâmetros ajustados: $\sigma = \sigma_{eq} + A \cdot e^{-kt}$				
			$\sigma_{eq}$ (mN/m)*	A (mN/m)	k (ms)*	$R_{REG}^2$	$t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$ (s)*
T1		0	9,698±0,056 <sup>BA</sup>	3,048±0,159	0,656±0,055 <sup>DC</sup>	0,952	9 859±737 <sup>BAC</sup>
T2	3	1,5	9,417±0,119 <sup>BC</sup>	2,804±0,083	0,756±0,029 <sup>BDC</sup>	0,936	8 396±365 <sup>BDC</sup>
T3		3,0	9,430±0,100 <sup>BC</sup>	3,073±0,071	0,628±0,028 <sup>D</sup>	0,955	10 242±483 <sup>BA</sup>
T4		0	9,173±0,099 <sup>C</sup>	3,792±0,106	1,163±0,127 <sup>A</sup>	0,924	5 782±607 <sup>D</sup>
T5	5	1,5	9,959±0,202 <sup>A</sup>	3,277±0,073	0,653±0,053 <sup>DC</sup>	0,941	11 507±1 274 <sup>A</sup>
T6		3,0	9,686±0,059 <sup>BA</sup>	3,188±0,077	0,697±0,023 <sup>DC</sup>	0,940	9 275±271 <sup>BAC</sup>
T7		0	9,428±0,078 <sup>BC</sup>	3,409±0,079	1,024±0,051 <sup>BA</sup>	0,925	6 388±306 <sup>D</sup>
T8	7	1,5	9,653±0,231 <sup>BAC</sup>	3,445±0,058	0,840 ±0,089 <sup>BDC</sup>	0,946	7 892±901 <sup>BDC</sup>
T9		3,0	9,536±0,095 <sup>BAC</sup>	3,424±0,178	0,933±0,130 <sup>BAC</sup>	0,937	7 171±1 050 <sup>DC</sup>

\*Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de  $\text{Pr}<0,05$ ;  $\sigma$  ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) = tensão interfacial no instante  $t$  (s),  $\sigma_{eq}$  ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) = tensão interfacial de equilíbrio,  $A$  ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) = constante de ajuste,  $k$  (ms) = taxa de decaimento exponencial da tensão interfacial e  $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$  (s) = instante em que  $\sigma - \sigma_{eq} = 0,005$ ;

A significância das variáveis sobre a tensão de equilíbrio, taxa de decaimento e instante em que  $\sigma - \sigma_{eq} = 0,005$  foram avaliadas por meio do teste F. A Tabela 3.3 apresenta a análise de variância (ANOVA) do modelo de regressão avaliado sobre tensão interfacial de equilíbrio. Após avaliação, foi verificado que o modelo de regressão não foi significativo ( $\text{Pr}>0,05$ ), ou seja, dentro dos níveis avaliados neste estudo, as variáveis pH e concentração de NaCl não apresentaram efeito significativo na variação do parâmetro.

Tabela 3.3 - ANOVA do modelo de regressão avaliado para tensão interfacial de equilíbrio.

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	$\text{Pr}>F^1$
Regressão	3	0,1702	0,0567	0,82	0.4987
Resíduos da regressão	23	1,6005	0,0696		
Lackfit	5	1,0510	0,2102	6,89	0.0009
Erro puro	18	0,5495	0,0305		
Tratamentos	8	1,2212	0,1526	5,00	0,0022
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>1.7707</b>			

A ANOVA do modelo de regressão avaliado sobre a taxa de decaimento da tensão interfacial está apresentada na Tabela 3.4. Após avaliação, embora o modelo de regressão fosse significativo ( $Pr < 0,05$ ), foi verificado que a falta de ajuste também foi significativa ao nível de confiança de probabilidade estabelecido ( $Pr < 0,05$ ). Portanto, o modelo de regressão não se ajustava à resposta taxa de decaimento dentro dos níveis avaliados neste estudo, ou seja, as variáveis pH e concentração de NaCl não apresentaram efeito significativo na variação da resposta medida.

Tabela 3.4 - ANOVA do modelo de regressão avaliado para taxa de decaimento.

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	Pr>F <sup>1</sup>
Regressão	3	0,4602	0,1534	6,15	0.0032
Resíduos da regressão	23	0,5740	0,0249		
Lackfit	5	0,3880	0,0776	7,51	0.0006
Erro puro	18	0,1860	0,0103		
Tratamentos	8	0,8482	0,1060	10,26	<0,0001
<b>TOTAL</b>	26	1,0342			

A Tabela 3.5 apresenta a ANOVA do modelo de regressão avaliado sobre o instante em que  $\sigma - \sigma_{eq} = 0,005$  ( $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$ ). Apesar de a regressão ser significativa ( $Pr < 0,05$ ), observou-se que a falta de ajuste também foi significativa ao nível de confiança de probabilidade estabelecido ( $Pr < 0,05$ ). Conseqüentemente, o modelo de regressão não se ajusta à resposta  $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$  dentro dos níveis avaliados, ou seja, as variáveis pH e concentração de NaCl também não apresentam efeito significativo na variação da resposta medida.

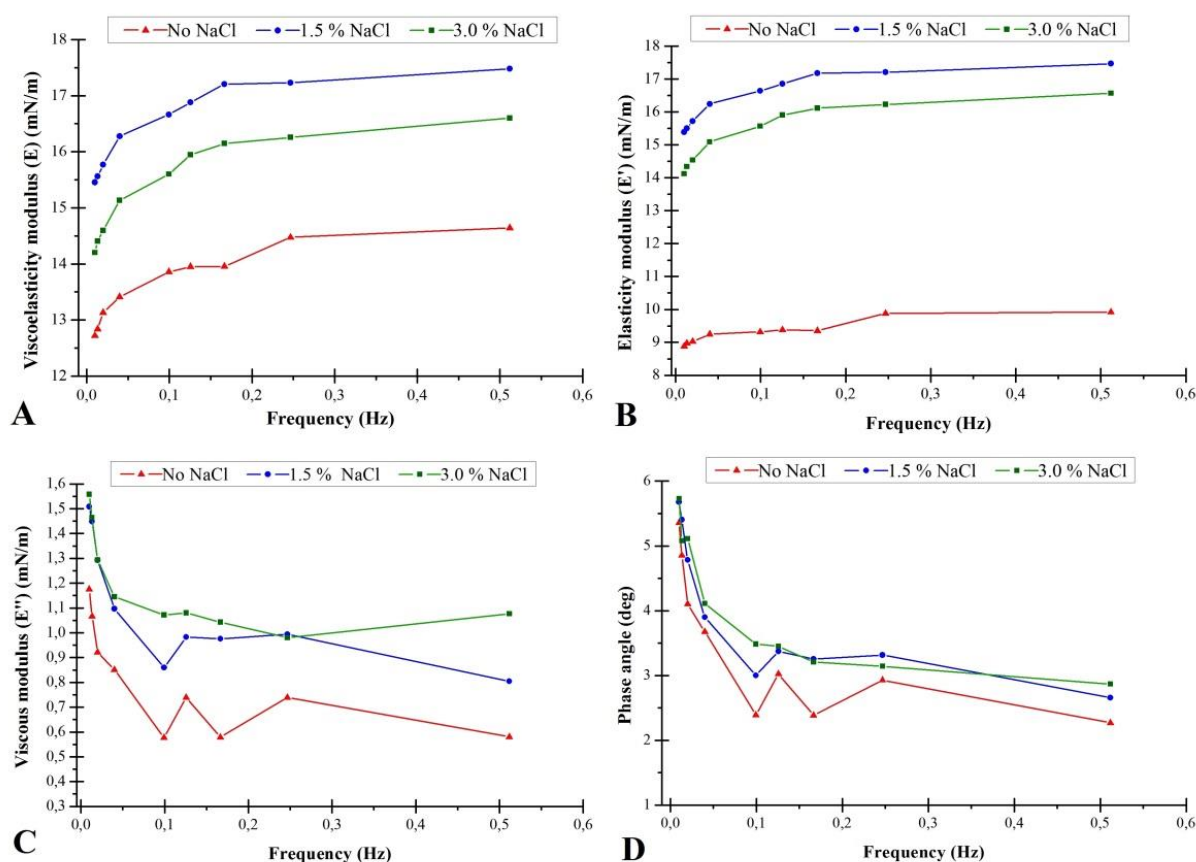
Tabela 3.5 - ANOVA do modelo de regressão avaliado para o instante em que  $\sigma - \sigma_{eq} = 0,005$ .

Fonte	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	Pr>F <sup>1</sup>
Regressão	3	35 794 804	11 931 601	4,05	0,0190
Resíduos da regressão	3	67 811 357	2 948 320		
Lackfit	5	49 763 130	9 952 626	9,93	0,0001
Erro puro	18	18 048 229	1 002 680		
Tratamentos	8	85 557 932	10 694 742	10,67	<0,0001
<b>TOTAL</b>	26	103 600 161			

### 3.2.2 - Propriedades reológicas dilatacionais

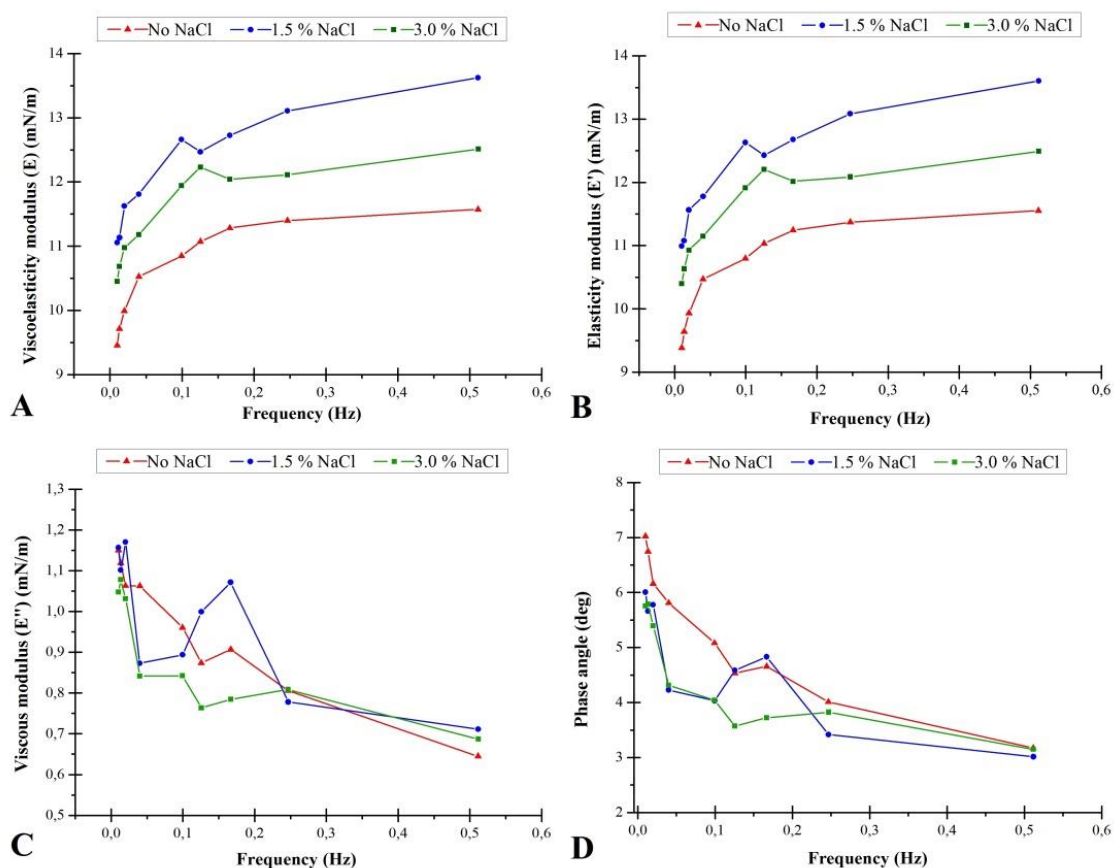
O comportamento viscoelástico do filme proteico de IFB formados na superfície foi avaliado em função das perturbações harmônicas aplicadas a gota na condição de equilíbrio do processo adsorvido adotada ( $t_{\text{final}} = 10\ 800\text{s}$ ). Os perfis dos parâmetros dilatacionais dos filmes proteicos do IFB adsorvidas nos pH 3, 5 e 7, na ausência e presença (1,5 % e 3,0 % m/v) de NaCl em função da frequência estão apresentados nas Figuras 3.3, 3.4 e 3.5. Ao analisar os dados dos perfis de todos os tratamentos, observa-se a confirmação de que todos os filmes formados exibiram comportamento viscoelástico e que os parâmetros são dependentes da intensidade das perturbações oscilatórias aplicadas. Essa dependência é um resultado consistente que pode confirmar a existência das interações proteína-proteína das biomoléculas adsorvidas na interface.

Figura 3.3 - Perfis dos parâmetros dilatacionais do filme superficial de  $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IFB preparado em 50 mM de fosfato-citrato em pH 3 ( $\blacktriangle$  sem NaCl,  $\bullet$  1,5 % NaCl e  $\blacksquare$  3,0 % NaCl): (A) Módulo viscoelástico (E), (B) módulo de elástico ( $E'$ ), (C) módulo viscoso ( $E''$ ) e (D) ângulo de fase ( $\varphi$ ).



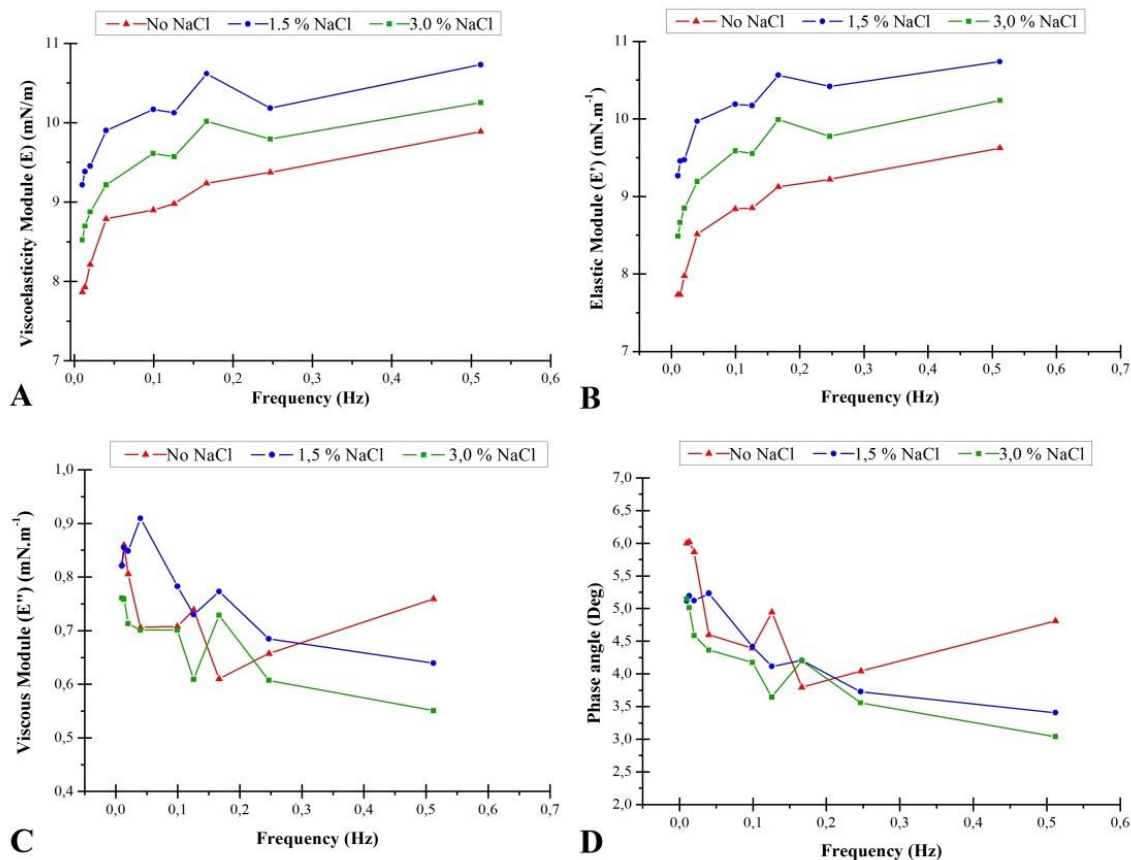
Fonte: o Autor

Figura 3.4 - Perfis dos parâmetros dilatacionais do filme superficial contendo  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IFB preparado em 50 mM de fosfato-citrato em pH 5 ( $\blacktriangle$  sem NaCl,  $\bullet$  1,5 % NaCl e  $\blacksquare$  3,0 % NaCl): (A) Módulo viscoelástico (E), (B) módulo de elástico ( $E'$ ), (C) módulo viscoso ( $E''$ ) e (D) ângulo de fase ( $\phi$ ).



Fonte: o Autor

Figura 3.5 - Perfis dos parâmetros dilatacionais do filme superficial contendo  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de IFB preparado em 50 mM de fosfato-citrato em pH 7 ( $\blacktriangle$  sem NaCl,  $\bullet$  1,5 % NaCl e  $\blacksquare$  3,0 % NaCl): (A) Módulo viscoelástico ( $E$ ), (B) módulo de elástico ( $E'$ ), (C) módulo viscoso ( $E''$ ) e (D) ângulo de fase ( $\varphi$ ).



Fonte: o Autor

Analisando as Figuras 3.3, 3.4 e 3.5, constatou-se que os parâmetros dilatacionais de todos os tratamentos apresentaram perfis semelhantes em função da frequência. As componentes elásticas exibiram os perfis de aumento enquanto as viscosas exibiram perfil redução em função do aumento da frequência das perturbações. Além disso, verifica-se que a componente elástica dos filmes interfaciais é predominante na composição do módulo  $E$  durante as perturbações de compressão e expansão realizadas no filme. Isto porque os valores da componente elástica são semelhantes aos obtidos para o módulo viscoelástico, enquanto, a contribuição da componente viscosa é pequena.

O ângulo de fase ( $\varphi$ ) é considerado como uma medida da viscoelasticidade relativa de filmes interfaciais (MARTÍNEZ et al., 2009) e os perfis obtidos estão apresentados nas Figuras 3.3D, 3.4D e 3.5D. Observou-se que os valores de  $\varphi$  exibiam dependência com a frequência das perturbações oscilatórias e relações indireta com frequência e os perfis do

módulo viscoelástico. Além disso, apesar de os filmes serem viscoelásticos, os baixos valores de  $\varphi$  obtidos neste estudo indicam que as interações proteína-proteína na região superficial produziu filme com características de rede gélica (MARTÍNEZ et al., 2009). Segundo Ruíz-Henestrosa et al. (2007), um material perfeitamente elástico é aquele que possui  $\varphi = 0^\circ$  e componente viscosa nula ( $E'' = 0$ ) enquanto que o perfeitamente viscoso exibe  $\varphi = 90^\circ$  e componente elástica nula ( $E' = 0$ ).

Os perfis do módulo de viscoelasticidade ( $E$ ) dos filmes mostraram relação direta com a intensidade das perturbações (frequência), circunstância também observada por Patino et al. (2003) ao avaliar o módulo  $E$  dos filmes de proteínas de reserva ( $\beta$ -conglucina 11S e glicina 7S) de soja adsorvidas na interface ar/água. Além disso, verificou-se que a presença de NaCl promoveu aumento da viscoelasticidade e que os filmes formados com IFB preparado com tampão contendo 1,5 % de NaCl exibiram o melhor perfil de viscoelasticidade em qualquer pH estudado. Entretanto, mediante análise dos resultados, pode se sugerir que o aumento da concentração salina leva a formação de interações proteína-proteínas na região interfacial que possam comprometer o ganho de viscoelasticidade interfacial.

Embora os decaimentos da tensão interfacial as proteínas globulares do IFB preparadas no pH 3 tenham sido mais lentas que aquelas preparadas no pH 7, ao analisar os perfis dos módulos de viscoelasticidade, observa-se que os filmes formados no pH 3 na ausência ou presença de NaCl apresentaram os maiores módulos de viscoelasticidade em função da frequência comparado aos demais tratamentos. Sugere-se que a maior viscoelasticidade possa ser resultado de desenovelamento molecular da cadeia polipeptídica adsorvida que favoreceu as interações intermoleculares proteína-proteína na região interfacial de modo a melhorar viscoelasticidade do filme, conseqüentemente, ganho de resistência mecânica. Mediante essa característica, pensando em futura aplicação, é possível sugerir que espumas preparadas no pH 3 podem apresentar maior estabilidade cinética.

#### **4 - CONCLUSÃO**

A solubilidade das proteínas do isolado proteico de feijão comum branco é dependente do pH, sendo mínima na região do  $pI_{\text{médio}}$  e a presença de íons salinos favorece a interação proteína-água levando ao aumento da solubilidade na região do  $pI_{\text{médio}}$  do isolado

proteico. Independente da condição de pH e concentração de NaCl, as proteínas globulares do feijão comum branco podem manter a propriedade tensoativa afinal foi observado decaimento cinético da tensão interfacial. Contrariando a condição de solubilidade mínima, a redução cinética da tensão interfacial ocorreu mais rapidamente em pH 5 sem sal, seguido pelas amostras preparadas no pH 7, com ou sem NaCl. Também se constatou que a presença do NaCl pode interferir negativamente no desempenho das proteínas do IFB de reduzir a tensão nos pH 5 e 7, uma vez que os valores dos parâmetros de decaimentos obtidos foram melhores nas amostras mantidas sem sal. Foi averiguado que a variação do pH e da concentração de NaCl não possuem efeito significativo sobre os parâmetros de decaimento da tensão interfacial das proteínas globulares de feijão comum branco extraídas por solubilização salina e precipitação aquosa. Observou-se que os filmes superficiais formados pelas proteínas globulares de feijão comum branco exibiam estrutura gélica com comportamento viscoelásticos, a presença de baixas concentrações NaCl favoreceu o aumento da viscoelasticidade em qualquer pH, mas, os maiores valores do módulo E foram obtidos para amostras preparadas na condição ácida (pH 3) salina ou não. Além disso, mediante perturbações mecânicas, verificou-se aumento da viscoelasticidade dos filmes interfaciais e que a componente elástica é responsável pela maior contribuição no comportamento viscoelástico dos filmes durante as perturbações. Embora a solubilidade em função do pH seja influenciada pela concentração de NaCl, a variação do pH e da concentração de NaCl não mostraram efeitos significativos sobre os parâmetros de decaimentos da tensão interfacial obtidos pelas proteínas do isolado de feijão comum branco. Por outro lado, tal variação pode influenciar no perfil do módulo E, podendo haver ganho ou perda de viscoelasticidade do filme interfacial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJIBOLA, C. F. et al. Polypeptide composition and functional properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) albumin, globulin and protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 189–200, 2016.

BARRET, M. L.; UDANI, J. K. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. **Nutrition Journal**, v. 10, n. 1, p. 24, 2011.

BOS, M. A.; VLIET, T. V. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layer and surfactants: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 91, p. 437–471, 2001.

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

CHAGAS, E. P.; SANTORO, L. G. Globulin and albumin proteins in dehulled seeds of three *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 51, n. 1, p. 17–26, 1997.

DANIELSSON, C. E. Seed globulins of the Gramineae and Leguminosae. **The Biochemical Journal**, v. 44, n. 4, p. 387–400, 1949.

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

DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: Protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, v. 53, n. 1–3, p. 31–45, 1997.

EVANGELHO, J. A. . et al. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food Chemistry**, v. 214, p. 460–467, 2017.

FANTINI, N. et al. Reducing effect of a *Phaseolus vulgaris* dry extract on food intake, body weight, and glycemia in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9316–9323, 2009.

GALVÁN, Z. R. N. et al. Rheological Properties of Aqueous Dispersions of Xanthan Gum Containing Different Chloride Salts Are Impacted by both Sizes and Net Electric Charges of the Cations. **Food Biophysics**, v. 13, n. 2, p. 186–197, 2018.

GORNALL, A. G. .; BARDAWILL, C. J. .; DAVID, M. M. . Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 177, n. 2, p. 751–766, 1949.

HE, Q. . et al. PEGylation of black kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate with potential functional properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 164, p. 89–97, 2018.

HOJILLA-EVANGELISTA, M. P. et al. Composition and Functional Properties of Saline-Soluble Protein Concentrates Prepared from Four Common Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, n. 8, p. 1001–1012, 2018.

JAFARI, M. et al. Physicochemical characterization of a navy bean (*Phaseolus vulgaris*) protein fraction produced using a Solvent-Free Method. **Food Chemistry**, v. 208, p. 35–41, 2015.

JAFFÉ, W. G. .; HANNIG, K. . Fractionation of Proteins Beans (*Phaseolus vulgaris*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 109, p. 80–91, 1965.

LAFARGA, T. . et al. Characterization of functional properties of proteins from Ganxet beans (*Phaseolus vulgaris* L. var. Ganxet) isolated using an ultrasound-assisted methodology. **Lwt- Food Science and Technology**, v. 98, n. July, p. 106–112, 2018.

MA, Y. et al. Effect of white kidney bean extracts on estimated glycemic index of different kinds of porridge. **Lwt- Food Science and Technology**, v. 96, n. March, p. 576–582, 2018.

MACRITCHIE, F. Protein adsorption/desorption at fluid interfaces. **Colloids and Surfaces**, v. 41, n. C, p. 25–34, 1989.

MAKRI, E. A.; DOXASTAKIS, G. I. Emulsifying and foaming properties of *Phaseolus vulgaris* and *coccineus* proteins. **Food Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 558–568, 2006.

MARTÍNEZ, K. D. et al. Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2149–2157, 2009.

MILLER, R.; LIGGIERI, L. **Progress in Colloid and Interface Science: Interfacial Rheology**. Leiden: Koninklijke Brill NV, 2009. v. 1

MUNDI, S.; ALUKO, R. E. Effects of NaCl and pH on the structural conformations of kidney bean vicilin. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 624–630, 2013.

OOMAH, B. D. .; MAZZA, G. .; CUI, W. . Optimization of protein extraction from flaxseed meal. **Food Research International**, v. 27, n. 4, p. 355–361, 1994.

PATINO, J. M. R. et al. Dynamic properties of soy globulin adsorbed films at the air-water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 268, n. 1, p. 50–57, 2003.

PEREIRA, L. L. S. et al. White bean flour (*Phaseolus vulgaris*): Therapeutic and toxicological research in Wistar rats. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 3, p. 1–7, 2012.

RIZZO, G.; BARONI, L. Soy, soy foods and their role in vegetarian diets. **Nutrients**, v. 10, n. 1, p. 1–51, 2018.

RUIZ-HENESTROSA, V. P. et al. Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 309, n. 1–3, p. 202–215, 2007.

SHEN, L.; TANG, C. H. Emulsifying properties of vicilins: Dependence on the protein type and concentration. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 278–286, 2014.

SUN, S. M. et al. Reversible and Irreversible Dissociation of Globulins from *Phaseolus vulgaris* Seed. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 7, p. 2118–2121, 1974.

TANG, C. H.; SUN, X. Structure–physicochemical function relationships of 7S globulins (vicilins) from red bean (*Phaseolus angularis*) with different polypeptide constituents. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 536–544, 2011a.

TANG, C. H.; SUN, X. A comparative study of physicochemical and conformational properties in three vicilins from *Phaseolus* legumes: Implications for the structure-function relationship. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 315–324, 2011b.

UDANI, J.; TAN, O.; MOLINA, J. Systematic Review and Meta-Analysis of a Proprietary Alpha-Amylase Inhibitor from White Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on Weight and Fat Loss in Humans. **Foods**, v. 7, n. 4, p. 63, 2018.

WANI, I. A. et al. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. **Food Research International**, v. 76, n. P1, p. 11–18, 2014.

WANI, I. A.; SOGI, D. S.; GILL, B. S. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolysed protein isolates from Indian black gram (*Phaseolus mungo* L.) cultivars. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 848–854, 2015.

YIN, S. W. et al. Functional and conformational properties of phaseolin (*Phaseolus vulgaris* L.) and kidney bean protein isolate: A comparative study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 4, p. 599–607, 2010.

**CAPITULO 4 - POLISSACARÍDEOS INFLUENCIAM AS PROPRIEDADES SUPERFICIAIS DAS PROTEÍNAS GLOBULARES DE FEIJÃO COMUM BRANCO (*Phaseolus vulgaris*).**

Lucidarce Martins da MATTA<sup>a1</sup>, Eduardo Basílio de OLIVEIRA<sup>a</sup>, Márcia Cristina Teixeira Ribeiro VIDIGAL<sup>a</sup>, Valéria Paula Rodrigues MINIM<sup>a</sup>, Luís Antônio MINIM<sup>a1</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Avenida P.H. Rolfs Campus Universitário, Viçosa-MG, Brasil, CEP: 36570-000

**RESUMO**

O efeito da presença de polissacarídeos (carboximetilcelulose CMC, goma arábica e a pectina LM) em meio ácido (pH 3) salino (1,5 % m/v NaCl) sobre as propriedades reológicas superficiais de isolado proteico de feijão comum branco (IFB) foram investigados pelo método da gota pendente em comparação com a ovoalbumina (ALB). O decaimento da tensão interfacial ( $\sigma$ ) e o módulo viscoelástico (E) foram monitorados durante a formação e envelhecimento (10 800s) do filme interfacial. As amostras possuem a habilidade de adsorverem na interface: o decaimento da  $\sigma$  foi menor na presença de ALB (9,7 – 8,0 mN/m) do que fora registrado para IFB (10,7 – 7,7 mN/m). A presença de polissacarídeos pode intensificar a redução da  $\sigma_{ALB}$ : a maior variação da tensão (9,5 – 7,2 mN/m) ocorreu na mistura contendo pectina LM. O mesmo não ocorreu nos sistemas contendo ISO: apenas a presença da goma arábica (11,5 – 7,17 mN/m) favoreceu a redução da  $\sigma$ . O desempenho tensoativo da ovoalbumina comparado ao do IFB, na ausência ou presença de polissacarídeos, foi melhor porque os valores de tensão interfacial de equilíbrio ( $\sigma_{eq}$ ) foram menores ( $7,378 \leq \sigma_{eq} \leq 7,898$  mN/m). Todos os filmes interfaciais avaliados exibiram comportamento viscoelástico, mas, predominaram os comportamentos elásticos. As proteínas globulares do IFB mostraram maior agilidade na adaptação (desenvolvimento) e a presença de

---

<sup>1</sup> Autores correspondentes.

Lucidarce M. da Matta, telefone: +55 (62) 99910-9790, e-mail: [lucidarcedamatta@gmail.com](mailto:lucidarcedamatta@gmail.com)

Luís Antônio Minim, telefone: +55 (31) 3612-6713, e-mail: [lminim@ufv.br](mailto:lminim@ufv.br)

Coautores:

Eduardo B. Oliveira, telefone: +55 (31) 3612-6751, e-mail: [eduardo.basilio@ufv.br](mailto:eduardo.basilio@ufv.br)

Márcia C. T. R. Vidigal, telefone: +55 (31) 3612-6718, e-mail: [marcia.vidigal@ufv.br](mailto:marcia.vidigal@ufv.br)

Valéria P. R. Minim, telefone: +55(31) 3612-6714, e-mail: [yprm@ufv.br](mailto:yprm@ufv.br)

polissacarídeos nesses sistemas pode promover aumento da viscoelasticidade filme interfacial. Logo, o ganho de viscoelasticidade dos filmes interfaciais contendo as proteínas de feijão comum branco pode indicar maior ganho de estabilidade cinética.

Palavras chaves: *Phaseolus vulgaris*, interface ar/água, tensão interfacial de equilíbrio, carboximetilcelulose, goma arábica, pectina LM.

## 1 - INTRODUÇÃO

O entendimento do comportamento dinâmico de interfaces fluídicas tem grande importância para processos naturais e tecnológicos das dispersões líquidas e ele pode ser alcançado por meio das propriedades reológicas interfaciais, em outras palavras, por meio da dinâmica de redução da tensão interfacial e das deformações da área ou volume do filme interfacial, perturbações características da reologia dilatacional (MILLER; LIGGIERI, 2009). As espumas são definidas como uma dispersão de gás em um líquido, semelhantes a estruturas celulares fechadas, cuja formação é não espontânea, sendo necessária aplicação de energia para dispersar o gás no líquido (WALSTRA, 1989). Trata-se de um sistema termodinâmico instável que tende a apresentar separação de fases ao longo do tempo sob a influência das forças de van der Waals e da gravidade (HILL; EASTOE, 2017). A estabilização cinética, como espuma e emulsão, depende da existência de surfactantes, substâncias que são capazes de interagir simultaneamente com moléculas das fases imiscíveis na interface. Durante o processo de agitação necessário para a formação das dispersões, o surfactante se difunde da fase contínua em direção à interface, adsorve e interage com outras moléculas surfactantes produzindo um filme que aprisiona o gás e fornece estabilidade cinética (PHILIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994; WALSTRA, 1989).

As espumas alimentícias podem ser produzidas com surfactantes de baixo peso molecular, contudo, preferencialmente, são estabilizadas com proteínas, como é o caso do chantilly e do merengue. Além de serem comestíveis, as proteínas são moléculas com habilidade superior de estabilizar uma dispersão porque o filme interfacial formado pelas cadeias polipeptídicas é mais viscoelástico e coeso (MACRITCHIE, 1989). Atualmente, as proteínas do ovo e do leite são os ingredientes espumantes mais empregados na produção de espumas alimentícias, em função das excelentes propriedades espumantes que as

biomoléculas possuem (HILL; EASTOE, 2017). Entretanto, a produção dessas proteínas é de alto custo além de insustentável, fatos que reforçam as avaliações das funcionalidades tecnológicas das proteínas vegetais, pois, são mais baratas e sustentáveis. No cenário atual de ingredientes, a proteína da soja é o ingrediente proteico de origem vegetal mais empregado na indústria de alimentos (RIZZO; BARONI, 2018), contudo, o panorama tende a mudar.

O feijão é uma leguminosa bastante consumida nos países da América Latina e da Ásia porque é fonte de carboidratos, de proteínas, de fibras e de sais minerais (HOJILLA-EVANGELISTA et al., 2018). Contudo, pode se tornar uma semente mais valorizada porque a sua proteína tem potencial de se tornar um ingrediente proteico vegetal seguro destinado à produção de dispersões alimentícias industrializadas, assim como as proteínas de soja. A porção proteica do feijão é composta, maiormente, por globulinas e albuminas. As proteínas de reserva globulares são predominantes no feijão e classificadas segundo o coeficiente de sedimentação em vicilina 7S e legumina 11S (CHAGAS; SANTORO, 1997; DANIELSSON, 1949a; DERBYSHIRE; WRIGHT; BOULTER, 1976; DURANTI; GIUS, 1997). As proteínas de feijão apresentam solubilidade dependente do pH, sendo mínima na faixa de 4,0 a 6,0 e as poucas informações sobre as propriedades espumantes de proteínas de feijão mostram boa habilidade superficial e apontam que essa capacidade está relacionada às características moleculares (tamanho, formato, carga elétrica líquida e massa) e, diretamente, dependente da solubilidade (GALVÁN et al., 2018; HE et al., 2018; HOJILLA-EVANGELISTA et al., 2018; LAFARGA et al., 2018).

Embora as proteínas tenham boas habilidades tensoativas, existem evidências de que a eficiência dessas habilidades pode ser influenciada pelas interações intermoleculares com outros ingredientes presentes nos alimentos, especialmente, com polissacarídeos e açúcares (NEVES et al., 2018; SIMIQUELI et al., 2019). A interação proteína-polissacarídeo (eletrostática, hidrofóbica, ligação de hidrogênio e exclusão estérica) causa implicações no processo adsorptivo das biomoléculas e nas propriedades reológicas interfaciais dos filmes (RODRIGUEZ PATINO; PILOSO, 2011). Não foram encontrados relatos sobre o efeito da presença de polissacarídeos sobre as propriedades reológicas superficiais de proteínas de feijão, tampouco da variedade branco, contudo existem relatos de estudos de proteínas animais e de soja. A adsorção de  $\beta$ -lactoglobulina na interface ar/água foi melhorada na presença de goma xantana porque houve aumento da pressão interfacial e o filme interfacial formado teve viscoelasticidade melhorada devido à incompatibilidade entre a proteína e a goma, provavelmente, o que intensificou as interações proteína-proteína (PEREZ et al., 2010). Os efeitos da presença de polissacarídeos solúveis de soja e goma arábica sobre as

propriedades reológicas superficiais por cisalhamento (anel Du Noüy) da  $\beta$ -conglucina foram examinados por Li et al. (2018). Os autores observaram diminuição da taxa de adsorção da proteína na presença de polissacarídeos atribuída ao aumento da viscosidade devido à interação proteína-polissacarídeo, contudo, houve efeito sinérgico entre proteína e polissacarídeo, pois, o filme apresentou maior viscoelasticidade.

Levando em conta que a presença e identidade do polissacarídeo possam interferir no desempenho das habilidades superficiais das proteínas (MIQUELIM; LANNES; MEZZENGA, 2010) e destacando a importância que essas informações adicionariam em futuros projetos de desenvolvimento de dispersões do tipo espuma, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da presença de polissacarídeos sobre as propriedades reológicas superficiais dinâmicas e dilatacionais de proteínas globulares de feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*). No Capítulo 3, foi verificado que o filme superficial formado pelas proteínas globulares do IFB preparado em 50 mM fosfato-citrato pH 3 com 1,5 % (m/v) NaCl exibiu a maior viscoelasticidade. Logo, esta investigação foi realizada usando o mesmo tampão e os polissacarídeos carboximetilcelulose, goma arábica e a pectina LM, tendo a ovoalbumina como modelo de proteína com propriedade superficial reconhecida pela comunidade científica (SIMIQUELI et al., 2019).

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 - Material**

O feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*) foi adquirido no comércio de Viçosa (MG), a albumina sérica bovina (BSA), ovoalbumina (ALB) e a carboximetilcelulose (CMC) ( $pK_a \approx 2,0$ ) foram adquiridas da Sigma-Aldrich, a pectina Genu® LM-101 AS ( $pK_a \approx 3,0$ ) foi doada pela CPKelco (Limeira, São Paulo, Brasil) e a goma arábica comercial pura ( $pK_a \approx 3,5$ ) foi adquirida da Dinâmica Química (Indaituba, São Paulo, Brasil). Os demais reagentes usados eram de grau analítico.

## 2.2 - Produção do isolado proteico de feijão comum branco

O feijão foi imerso em água destilada a 8 °C por 8 h para remoção manual do revestimento. Os cotilédones foram desidratados (50 °C por 8 h), triturados em processador doméstico e a farinha foi armazenada a -18 °C sob vácuo. A farinha foi desengordurada ( $Far_{des}$ ) usando hexano na proporção 1:6 (m:v) em extrator Soxhlet por 6 h de recirculação. A  $Far_{des}$  foi misturada na proporção 3,9 mL.g<sup>-1</sup> a 50 mM de fosfato de sódio (pH 8,0) contendo NaCl (600 mM), previamente equilibrado a 27,5 °C. A mistura foi mantida em agitação magnética por 60 min, depois centrifugada (7000 x g por 40 min, 4 °C). O sobrenadante foi dialisado (12,4 kDa *cut-off*) contra água ultrapura (Milli-Q, Milipore, EUA) a 4 °C por 7 dias. O conteúdo dialisado foi centrifugado (9000 x g por 40 min, 4 °C) e o precipitado lavado com água ultrapura, centrifugado (9000 x g por 40 min, 4 °C) e liofilizado (-34 °C e 0,25 mbar) (Alpha 2-4 LD plus, Martin Christ, Alemanha) (AJIBOLA et al., 2016; OOMAH; MAZZA; CUI, 1994; SUN et al., 1974). O isolado proteico foi armazenado a -18 °C e protegido da luz. O teor de proteínas foi mensurado pelo método do Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949) usando a BSA como padrão. No capítulo 2, foi determinado o ponto isoelétrico médio ( $pI_{médio} \approx 5,0$ ) do isolado e, também, constatado que perfil eletroforético é formado com predomínio de vicilina 7S.

## 2.3 - Preparo das soluções

As avaliações das propriedades reológicas superficiais foram realizadas usando solução de proteína e polissacarídeo em 50 mM fosfato-citrato pH 3 contendo 1,5 % (m/v) de NaCl. A azida sódica foi usada (0,2 % - m/v) como conservante no preparo do tampão. As amostras proteicas avaliadas foram a ovoalbumina (ALB) e o isolado proteico de feijão comum branco (IFB) e, os polissacarídeos foram a carboximetilcelulose (CMC), a pectina LM e a goma arábica. Soluções estoques individuais (5 mg.mL<sup>-1</sup>) de proteína e polissacarídeo, preparadas em fosfato-citrato (50 mM, pH 3 contendo 1,5 % NaCl), foram mantidas a 4 °C *overnight* para hidratação antes de serem usadas. Alíquota de 400 µL de cada solução estoque foi diluída no mesmo tampão (50 mM de fosfato-citrato pH 3 com 1,5 % NaCl) em agitação magnética por 5 min e o volume final foi ajustado para 10 mL. As soluções finais contendo proteína (200 µg.mL<sup>-1</sup>) e polissacarídeo (200 µg.mL<sup>-1</sup>) foram submetidas a medidas de

potencial zeta e de tamanho, avaliações interfaciais e reológicas de escoamento. O tratamento controle foi preparado da mesma forma, porém, sem a presença de polissacarídeo.

#### **2.4 - Distribuição de Tamanho e Medidas de Potencial Zeta**

O tamanho de partícula das frações proteicas foi determinado por espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* - DLS) usando um analisador de partícula (Zetasizer Nano Malvern, Malvern Instruments Ltd., UK). As amostras foram preparadas em fosfato-citrato (50 mM, pH 3) com 1,5 % (m/v) de NaCl, filtradas em filtros de seringa (PVDF 0,45  $\mu\text{m}$ ) e, em seguida, 1 mL de solução foi colocado na cubeta para ser desaerado em ultrassom por 5 min. As medidas foram efetuadas em quintuplicatas com ângulo de espalhamento de 173° para minimizar interferência sob 25 °C.

As medidas de potencial zeta das amostras foram realizadas no analisador de partícula (Zetasizer Nano Malvern, Malvern Instruments Ltd., UK). Alíquotas de 1 mL das amostras preparadas em fosfato-citrato (50 mM, pH 3) com 1,5 % (m/v) de NaCl foram colocadas no interior de células capilares equipadas com eletrodos de ouro (modelo DTS 1070C, Malvern Instruments Ltd., UK) que foram mantidas sob 25 °C. Tomou-se as medidas e expressas como média de quintuplicatas.

#### **2.5 - Propriedades superficiais**

As avaliações dinâmicas e as medidas reológicas dilatacionais dos filmes superficiais foram realizadas pelo método da gota pendente em tensiômetro (PAT-1M, Sinterface Technologies, Alemanha) usando software Profile Analyses Tensiometer (PAT-1M – versão 1.5.0.729) para manter constante o volume da gota (15 mm<sup>3</sup>) e ajustar o perfil experimental da gota a equação de Young-Laplace por meio da tensiometria analítica do perfil da gota para determinação dos valores da tensão interfacial ( $\sigma$ ). O método de calibração do equipamento foi o diâmetro do capilar. As medidas foram realizadas, em duplicata, usando capilar de aço inox de 2 mm de diâmetro e a cubeta vazia mantida em compartimento termostaticado por circulação de água a 25 °C  $\pm$  0,2 °C.

### 2.5.1 - Propriedades dinâmicas

O processo termodinâmico de variação da tensão interfacial foi monitorado por três horas ( $t = 10\ 800$  s) e o valor da tensão interfacial de equilíbrio ( $\sigma_{eq}$ ) foi determinado usando extrapolação ao longo do tempo do modelo exponencial de decaimento (EQUAÇÃO 4.1) empírico ajustado:

$$\sigma = \sigma_{eq} + A \cdot e^{-kt} \quad \text{Equação 4.1}$$

em que  $\sigma$  é a tensão interfacial ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) no tempo  $t$  (s),  $A$  é a constante de ajuste ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) e  $k$  é a constante relacionada a taxa de decaimento ( $\text{s}^{-1}$ ) de tensão até que alcance o valor de equilíbrio  $\sigma_{eq}$ . A estimativa do instante  $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$  foi realizada usando na Equação 4.1 a ponderação  $\sigma - \sigma_{eq} = 0,005$ .

### 2.5.2 - Medidas reológicas dilatacionais

As medidas reológicas dilatacionais foram realizadas mediante aplicação controlada de oscilações de baixa amplitude harmônicas e periódicas de expansão e compressão da gota durante a formação do filme. Varredura de frequência foi realizada para determinar a faixa de viscoelasticidade linear antes da realização dos ensaios. Partindo do volume inicial da gota ( $15 \text{ mm}^3$ ), realizou-se expansão e compressão da gota com amplitude de deformação fixa (3 %) a fim de garantir que os parâmetros sejam independentes da amplitude de deformação (BELLESI; RUIZ-HENESTROSA; PILOSOFF, 2014). As oscilações foram realizadas na frequência angular de 0,1 Hz e, cada perturbação consistiu de 5 ciclos oscilatórios seguidos de 5 min de volume fixo (repouso). As perturbações do volume levaram à determinação de valores de tensão interfacial harmônica, que foram usados para determinar os parâmetros dilatacionais por meio da transformação de Fourier: módulo de viscoelasticidade ( $E$ ), componentes de armazenamento ou elástico ( $E'$ ) e de perda ou viscoso ( $E''$ ) e o ângulo de fase ( $\varphi$ ). O módulo  $E$ , uma quantidade complexa viscoelástica, é obtida através da relação entre a variação da tensão interfacial ( $\sigma$ ) e a mudança da área superficial ( $A$ ) da gota:  $E = d\sigma/d \ln A$ . O módulo complexo  $E$  consiste das componentes real (módulo de armazenamento ou elástico dilatacional superficial –  $E' = |E| \cos \varphi$ ) e imaginária (módulo de perda ou viscoso dilatacional superficial –  $E'' = |E| \sin \varphi$ ) (EQUAÇÃO 4.2).

$$E = E' + iE'' \quad \text{Equação 4.2}$$

em que  $i = \sqrt{-1} \cdot E'$ , variável que indica o comportamento conservativo na interface.

Para um material perfeitamente elástico, o cisalhamento e a deformação estão na fase  $\varphi = 0$  e a componente de perda ou viscoso  $E''$  (imaginário) é zero. No caso de um material perfeitamente viscoso, o ângulo de fase  $\varphi = 90^\circ$  e o termo de armazenamento ou elástico  $E'$  (real) é zero (RUÍZ-HENESTROSA et al., 2007).

## 2.6 - Propriedades reológicas de escoamento da fase aquosa

As propriedades reológicas de escoamento das soluções proteína:polissacarídeo foram avaliadas em reômetro rotacional (Haake Mars, Thermo Electro Corp., Karlsruhe, Alemanha) acoplado ao banho termostático (Phoenix 2C03P, Thermo Electro Corp., Karlsruhe, Alemanha). As medidas foram realizadas em temperatura equilibrada ( $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ ) usando o sensor de duplo gap DG41 com gaps interno de 0,25 mm e externo de 0,30 mm. As medidas foram realizadas em duplicatas: três rampas contínuas de taxa de cisalhamento (crescente, decrescente e crescente) variando de 0,01 a  $100\text{ s}^{-1}$  foram aplicadas a amostra (6,5 mL). O comportamento de escoamento dos sistemas ALB e IFB foi estimado usando, respectivamente, os modelos da Lei de Potência (EQUAÇÃO 4.3) e de Newton (EQUAÇÃO 4.4) para ajustar os resultados obtidos na última rampa crescente.

$$\tau = k \dot{\gamma}^n \quad \text{Equação 4.3}$$

$$\tau = \mu \dot{\gamma} \quad \text{Equação 4.4}$$

em que  $\tau$  é a tensão de cisalhamento (Pa),  $k$  é o índice de consistência ( $\text{Pa} \cdot \text{s}^n$ ),  $\mu$  é a viscosidade,  $\dot{\gamma}$  é a taxa de cisalhamento ( $\text{s}^{-1}$ ) e  $n$  é o índice de comportamento (adimensional).

As viscosidades aparentes ( $\eta_{100}$ ) apresentadas referem-se aos valores obtidos sob a  $\dot{\gamma} = 100\text{ s}^{-1}$ , pois, essa deformação equivalente ao cisalhamento aplicado durante a mastigação e em processos industriais de escoamento/agitação.

## 2.7 - Análise estatística

Os resultados das propriedades de decaimento da tensão interfacial foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) e as diferenças de médias foram verificadas usando teste Tukey, ambos ao nível de confiança de  $Pr < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas usando o software *Statistical Analysis System*® versão 9,0 (SAS Institute Inc., EUA).

## 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 - Medidas de tamanho de partícula e potencial zeta

Os resultados de tamanho de partícula médio ( $Z$ ) e índice de polidispersidade (pDI) das partículas dispersas nas soluções aquosas contendo  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de proteína (ALB ou IFB) e  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de polissacarídeo (CMC, pectina LM ou goma arábica) são mostrados na Tabela 4.1. Quase todos os tratamentos exibiram distribuições de tamanho multimodal com índice de polidispersidade médio. A heterogeneidade de tamanho médio observada pode ser relacionada à presença de biomoléculas diferentes na solução. Os resultados de tamanho de partícula mostram que a presença de polissacarídeos na solução aquosa interferiu de forma positiva e negativa nos sistemas ALB e IFB, respectivamente.

Os tamanhos de partícula médio dos sistemas contendo ALB diferiram significativamente ( $Pr > 0,05$ ) entre si, variaram de 367,07 – 592,99 nm, sendo o menor tamanho do tratamento controle e o maior da solução ALB:pectina LM. O aumento do tamanho de partícula das soluções ALB-polissacarídeo no meio ácido (pH 3,0) salino (1,5 % m/v NaCl) sugere que houve agregação de biomoléculas, possivelmente, via interações eletrostáticas de natureza atrativa em função da diferença de carga elétrica líquida prevista entre a proteína e polissacarídeo.

Tabela 4.1 - Medidas de potencial zeta, tamanho médio e distribuição de tamanho de partículas das fases contínuas contendo proteínas (ovoalbumina – ALB ou isolado proteico de feijão comum branco – IFB) ou a mistura proteína-polissacarídeo preparadas em 50 mM fosfato-citrato pH 3 com 1,5 % (m/v) NaCl.

Proteína	Polímero	Potencial $\zeta$ (mV)	$Z_{\text{MÉDIO}}$ (nm)	pDI	PICO 1		PICO 2	
					d (nm)	Área (%)	d (nm)	Área (%)
ALB*	Controle	8,687±0,450 <sup>A</sup>	367,07±29,92 <sup>C</sup>	0,48±0,06	460,10±111,17	79,92±7,18	148,87±101,48	20,08±7,18
	CMC	-8,071±0,141 <sup>D</sup>	459,13±60,37 <sup>BC</sup>	0,37±0,05	463,47±100,50	93,62±6,38	573,99± 875,34	6,38± 6,38
	Arábica	4,738±1,192 <sup>B</sup>	513,373±95,51 <sup>AB</sup>	0,52±0,09	414,76±34,48	93,38±2,67	25,25±10,76	6,62±2,67
	Pectina	-6,845±0,293 <sup>C</sup>	592,99±66,29 <sup>A</sup>	0,36±0,05	508,89±34,21	98,93±1,43	13,36±17,81	1,07±1,43
IFB**	Controle	6,080±0,222 <sup>A</sup>	1018,13±50,74 <sup>A</sup>	0,35±0,05	878,67±84,38	100,00	-	-
	CMC	-7,766±0,255 <sup>D</sup>	351,17±110,40 <sup>C</sup>	0,36±0,07	391,76±38,06	87,42±8,40	541,72±618,39	12,58±8,40
	Arábica	2,310±0,494 <sup>B</sup>	664,17±100,00 <sup>B</sup>	0,54±0,06	723,67±80,86	86,75±1,50	35,02±14,54	13,25±1,50
	Pectina	-6,244±0,628 <sup>C</sup>	803,37±95,17 <sup>B</sup>	0,26±0,05	785,09±83,56	100,00	-	-

\*Médias com letras iguais na mesma coluna são significativamente diferentes segundo Tukey (Pr>0,05).

\*\*Médias com letras iguais na mesma coluna são significativamente diferentes segundo Tukey (Pr>0,05);

Os sistemas do IFB apresentaram faixa de tamanhos de partícula com maior amplitude entre os valores obtidos (351,17 – 1018,13 nm) sendo o menor tamanho da solução IFB:CMC e o maior do tratamento controle. Além disso, verificou-se que as médias de  $Z_{\text{médio}}$  dos tratamentos IFB:Arábica e IFB:Pectina não possuem diferenças significativas ( $Pr < 0,05$ ). Existem relatos na literatura de que a faseolamina (vicilina 7S), glicoproteína mais abundante no IFB, pode se oligomerizar em condições de  $pH \approx 3$  (SUN et al., 1974) e pode se verificar ao avaliar os resultados de tamanho do tratamento controle que, provavelmente, isso aconteceu neste estudo em virtude do tamanho de partícula medido (1018,13 nm). Entretanto, quando o IFB foi misturado aos polissacarídeos, provavelmente, a condição de não oligomerização foi favorecida em prol da realização das interações eletrostáticas entre proteínas e polissacarídeos.

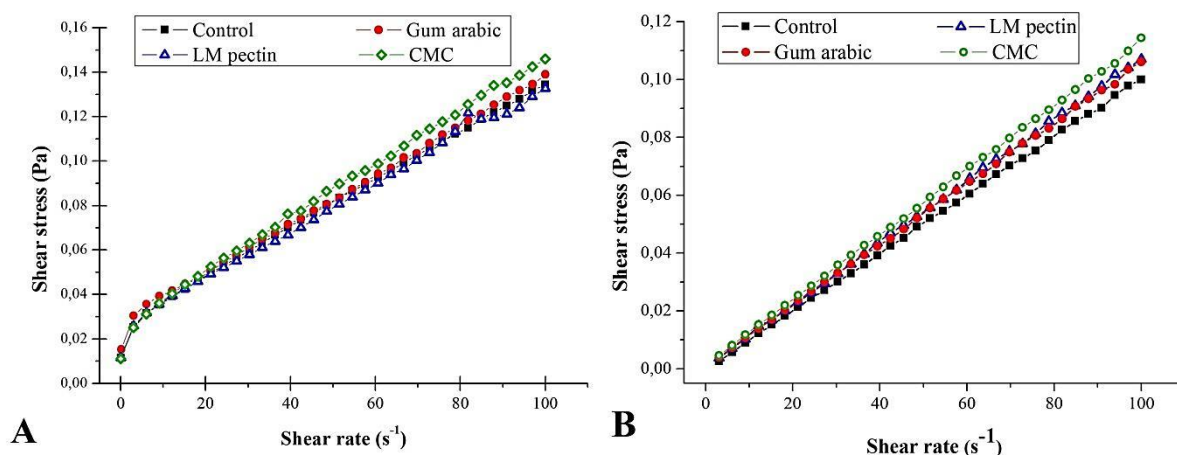
Outra propriedade que pode ser usada para avaliação de formação de agregados proteína-polissacarídeo é a natureza das cargas elétricas da superfície das partículas estimada por meio do potencial zeta  $\zeta$  (TABELA 4.1). Examinado os resultados observa-se que as soluções contendo apenas proteínas (controle) exibiram carga elétrica líquida positiva, característica prevista uma vez que o ponto isoelétrico ( $pI_e$ ) das amostras proteico é superior ao  $pH$  ácido escolhido para esta avaliação:  $pI_{e_{ALB}}$  varia de 4,7 – 4,9 (SIMIQUELI et al., 2019) e  $pI_{e_{IFB}} \approx 5,0$ . Além disso, pode visualizar que a carga elétrica superficial das partículas variou conforme a identidade do polissacarídeo. Em comum, pode-se verificar que os sistemas constituídos por CMC, goma arábica e pectina LM apresentaram cargas elétricas líquidas, respectivamente, negativa, positiva e negativa.

### 3.2 - Propriedades reológicas de escoamento

Os comportamentos de escoamento das soluções proteína-polissacarídeo são mostrados na Figura 4.1. Examinando as curvas dos sistemas ALB (FIGURA 4.1A) e IFB (FIGURA 4.1B), foram observadas diferenças entre os comportamentos de escoamento e ausência de tensão inicial. Além disso, verificou-se a presença de histerese entre as curvas ascendente e descendente da taxa de cisalhamento, o que indica que o escoamento das amostras é dependente do tempo, em outras palavras, evidencia o comportamento tixotrópico dos sistemas avaliados (dados não mostrados). Analisando as curvas de escoamento dos sistemas ALB, observou-se diminuição da viscosidade conforme a taxa de cisalhamento aumentava (dados não mostrados). Examinando as curvas de escoamento dos sistemas IFB,

notou-se a constância dos valores da viscosidade à medida que a taxa de cisalhamento aumentava (dados não mostrados).

Figura 4.1 - Curvas de escoamento das soluções contendo (A) ovoalbumina e (B) isolado proteico de feijão comum branco na presença de polissacarídeos.



Fonte: o Autor

Os modelos Lei de Potência ( $p < 0,05$ ) e Lei de Newton ( $p < 0,05$ ) foram usados para o ajuste da segunda curva ascendente de escoamento, respectivamente, dos sistemas ALB e IFB: os parâmetros reológicos de escoamento e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) são mostrados nas Tabelas 4.2 e 4.3. Analisando os parâmetros reológicos dos dois sistemas proteicos (ALB e IFB), observou-se que as soluções contendo ALB são mais viscosas que as preparadas com IFB. Acredita-se que essa diferença esteja relacionada ao grau de organização estrutural e ao desempenho das interações intermoleculares das cadeias polipeptídicas em meio ácido (pH 3) salino (1,5 % m/v NaCl) com cada polissacarídeo. Examinando os resultados das soluções ALB-polissacarídeo (TABELA 4.2) nota-se que são fluidos não newtonianos ( $n \neq 1$ ) classificados como pseudoplástico ( $n < 1$ ), característica que congrue com a relação indireta entre a viscosidade e a taxa de cisalhamento anteriormente observada. A presença de polissacarídeos não proporcionou mudanças significativas ( $Pr > 0,05$ ) nos valores médios de  $k$ ,  $n$  e  $\eta_{100}$  das misturas ALB-polissacarídeo. As amostras dos sistemas ALB apresentaram valores de  $k$  variando de 3,143 – 3,441 mPa.s<sup>n</sup> e de  $\eta_{100}$  variando de 1,338 – 1,460 mPa.s. Nota-se que a presença de polissacarídeo promoveu aumento da viscosidade das amostras, sendo que o polissacarídeo CMC foi o tratamento que apresentou o maior valor de viscosidade.

Tabela 4.2 – Parâmetros reológicos de escoamento das soluções contendo ovoalbumina (ALB) e um polissacarídeo.

<b>Proteína</b>	<b>Tratamento</b>	<b>k (mPa.s<sup>n</sup>)</b>	<b>n (-)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>η<sub>100</sub> (mPa.s)</b>
ALB*	Controle	3,143±0,022 <sup>A</sup>	0,820±0,001 <sup>A</sup>	0,996	1,338±0,027 <sup>A</sup>
	CMC	3,441±0,636 <sup>A</sup>	0,820±0,031 <sup>A</sup>	0,997	1,460±0,063 <sup>A</sup>
	Arábica	3,167±0,051 <sup>A</sup>	0,820±0,036 <sup>A</sup>	0,996	1,378±0,048 <sup>A</sup>
	Pectina LM	3,291±0,278 <sup>A</sup>	0,818±0,016 <sup>A</sup>	0,996	1,390±0,020 <sup>A</sup>

Dados foram ajustados pelo modelo da Lei da Potência; \*Médias com letras iguais na mesma coluna são significativamente diferentes segundo Tukey (Pr>0,05);

Avaliando os parâmetros reológicos de escoamento obtidos no ajuste segundo o modelo da Lei de Newton e o coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) (TABELA 4.3), verificou-se que as soluções contendo IFB são fluidos Newtoniano (n = 1), fluidos cuja viscosidade (μ) é constante para diferentes taxas de deformação e não varia com tempo.

Tabela 4.3 - Parâmetros reológicos de escoamento das soluções com isolado proteico de feijão comum branco (IFB) e um polissacarídeo.

<b>Proteína</b>	<b>Tratamento</b>	<b>μ (mPa.s)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
IFB*	Controle	1,007±0,014 <sup>A</sup>	0,999
	CMC	1,130±0,001 <sup>A</sup>	0,999
	Arábica	1,053±0,039 <sup>A</sup>	0,999
	Pectina LM	1,069±0,019 <sup>A</sup>	0,999

Dados foram ajustados pelo modelo da Lei de Newton; \*Médias com letras iguais na mesma coluna são significativamente diferentes segundo Tukey (Pr>0,05).

As soluções contendo o isolado proteico exibiram valores de μ variando de 1,007 – 1,130 mPa.s. A presença e a identidade de polissacarídeo nos sistemas IFB foram fontes de variação que não proporcionaram mudanças significativas (Pr>0,05) nos valores médios da viscosidade (μ). Analisando a magnitude dos valores médios, observou-se que a presença proporcionou espessamento da fase aquosa em virtude do aumento dos valores μ, sendo que a amostra IFB:CMC a que apresentou o maior valor.

### 3.3 - Propriedades reológicas interfaciais

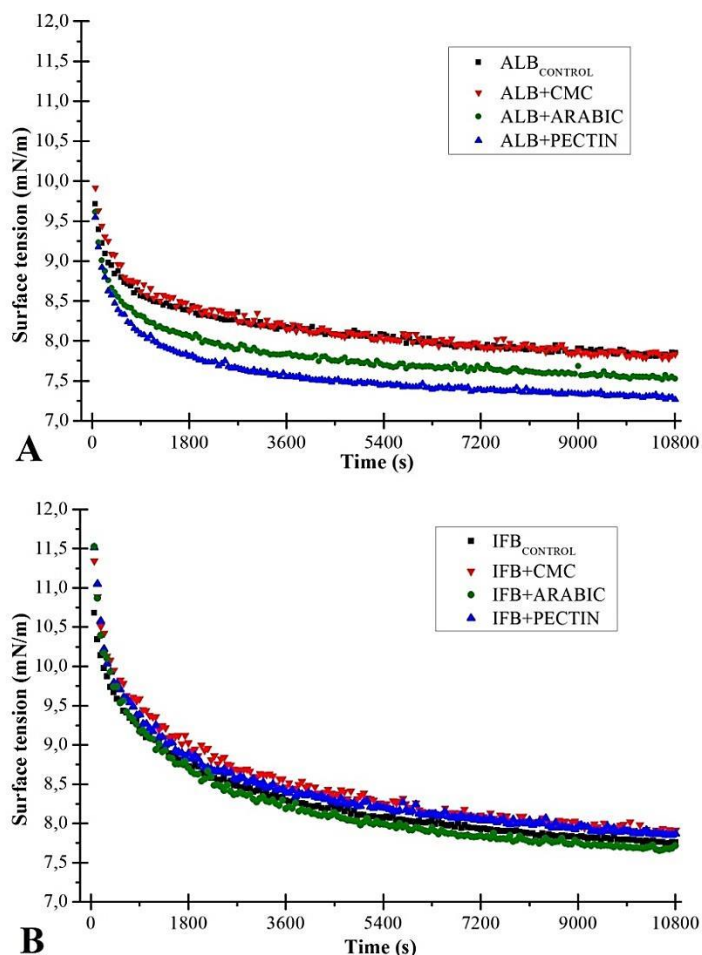
#### 3.3.1 - Tensão superficial de equilíbrio

A adsorção das proteínas do isolado proteico de feijão comum branco (IFB) na interface ar/água foi avaliada em condição ácida (pH 3) salina (1,5 m/v NaCl) na presença de polissacarídeo. Essa avaliação foi realizada usando a ovoalbumina (ALB) como modelo de ingrediente proteico com propriedade superficial para avaliação da potencialidade superficial do IFB. A ovoalbumina é reconhecida como uma das proteínas da clara de ovo responsável pela formação de espuma quando sua solução é submetida ao borbulhamento (aeração) (MIQUELIM; LANNES; MEZZENGA, 2010; SADAHIRA et al., 2014).

A Figura 4.2 ilustra as variações cinéticas da  $\sigma$  para os sistemas ALB (FIGURA 4.2A) e IFB (FIGURA 4.2B). Após observação dos perfis cinéticos obtidos, pode se confirmar que as proteínas testadas possuem a habilidade de adsorverem na interface ar/água porque houve decaimento cinético da tensão interfacial do filme formado. Os resultados obtidos são semelhantes aos dados da literatura obtidos também por tensiometria por meio do método da gota pendente para ovoalbumina (MIQUELIM; LANNES; MEZZENGA, 2010; SIMIQUELI et al., 2019) e para isolados proteicos de sementes leguminosas na interface ar/água (JARPA-PARRA et al., 2015; MARTÍNEZ et al., 2009; RUÍZ-HENESTROSA et al., 2007) ou óleo/água (JOSHI et al., 2012).

Ao comparar os dados obtidos para os filmes formados nos tratamentos controle (ALB e IFB), pode ser observado que a variação cinética da  $\sigma$  durante a construção dos filmes foi menor na presença de ALB (9,7 – 8,0 mN/m) do que fora registrado para as proteínas globulares do IFB (10,7 – 7,7 mN/m). Essa diferença pode ser associada às distintas habilidades de difusão das proteínas em direção à interface, adsorção, flexibilidade e, subsequente, desenovelamento das cadeias polipeptídicas. Além desses fatores, o desempenho das propriedades superficiais das proteínas também pode ser relacionado à hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, tamanho, distribuição de carga elétrica superficial ( $\zeta$ ) e propriedades estéricas (FAMEAU; SLONEN, 2014; PATINO et al., 2003).

Figura 4.2 - Perfil de decaimento da tensão superficial contendo  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de proteína e  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  polissacarídeo. As soluções foram preparadas em 50 mM fosfato-citrato (pH 3) com 1,5 % m/v NaCl. (A) Ovoalbumina ALB e (B) isolado proteico de feijão comum IFB.



Fonte: o Autor

Os perfis de decaimentos cinéticos da  $\sigma$  dos filmes formados nos sistemas proteína-polissacarídeo indicam que a presença de polissacarídeos na fase contínua pode interferir no processo de adsorção de proteínas na interface ar/água. Os resultados das misturas ALB:polissacarídeo (FIGURA 4.2A) evidenciam que a presença de polissacarídeos pode intensificar a redução da  $\sigma$  do filme na interface ar/água, provavelmente, devido a interação sinérgica entre as macromoléculas. A maior variação da tensão ( $9,5 - 7,2 \text{ mN/m}$ ) ocorreu na mistura contendo pectina LM e a menor naquela que havia carboximetilcelulose que, a propósito, mostrou ser semelhante ao perfil do tratamento Controle (ALB). A redução da  $\sigma$  observada neste estudo é semelhante à redução observada também por Miquelim, Lannes

& Mezzenga (2010) que avaliaram a mistura ovoalbumina e carragenana (pKa=2,0) preparada em pH 3 e sem sal.

Analisando dados de variação da  $\sigma$  obtidos para as misturas IFB:polissacarídeo (FIGURA 4.2B) pode-se notar que a presença de polissacarídeos não trouxe resultados tão satisfatórios sobre a redução, como os observados nos sistemas da ALB. Ao comparar os resultados com o sistema Controle IFB (10,6 – 7,76 mN/m), verifica-se que apenas a presença da goma arábica (11,5 – 7,17 mN/m) contribuiu para melhorar a redução da propriedade termodinâmica em discussão enquanto, nos demais sistemas a presença de polissacarídeos atrapalhou. As variações registradas durante a redução da tensão interfacial dos complexos IFB-pectina LM (11,5 – 7,87 mN/m) e IFB-CMC (11,3 – 7,91 mN/m) são bem próximas entre si, porém, com  $\sigma_{eq}$  acima da registrada no filme do sistema Controle IFB.

Os dados de  $\sigma$  experimentais foram ajustados pelo modelo exponencial (EQUAÇÃO 4.1) e os parâmetros obtidos estão reunidos na Tabela 4.4. A comparação dos perfis de decaimento da tensão interfacial entre os sistemas ALB e IFB confirma que o desempenho da ovoalbumina na ausência ou presença de polissacarídeos é melhor que o das proteínas globulares do IFB. Isto porque as tensões de equilíbrio e o instante  $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$  foram menores nos sistemas ALB.

Tabela 4.4 - Parâmetros do modelo exponencial de decaimento ajustado aos dados de tensão interfacial experimentais ( $\sigma$ ) da interface ar/água contendo 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de proteína e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de polissacarídeo, ambos preparados em 50 mM fosfato-citrato (pH 3) contendo 1,5 % (m/v) NaCl.

Proteína	Polissacarídeo	Adjusted parameters: $\sigma = \sigma_{eq} + A \cdot e^{-kt}$				
		$\sigma_{eq}$ (mN/m)	A (mN/m)	k (ms)	$R_{REG}^2$	Tempo [ $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$ ](s)
ALB*	Controle	7,885±0,090 <sup>A</sup>	1,266±0,041	0,473±0,029 <sup>A</sup>	0,935	11 752±794 <sup>A</sup>
	CMC	7,898±0,089 <sup>A</sup>	1,481±0,093	0,520±0,019 <sup>A</sup>	0,955	10 949±290 <sup>A</sup>
	Pectina LM	7,378±0,001 <sup>B</sup>	1,657±0,201	0,744±0,134 <sup>A</sup>	0,951	8 015±1 276 <sup>A</sup>
	Arábica	7,623±0,045 <sup>AB</sup>	1,425±0,091	0,648±0,039 <sup>A</sup>	0,939	8 761±622 <sup>A</sup>
IFB**	Controle	7,838±0,119 <sup>A</sup>	2,301±0,237	0,479±0,015 <sup>A</sup>	0,974	12 810±627 <sup>A</sup>
	CMC	7,987±0,197 <sup>A</sup>	2,540±0,244	0,468±0,047 <sup>A</sup>	0,964	13 431±1 143 <sup>A</sup>
	Pectina LM	7,993±0,193 <sup>A</sup>	2,574±0,049	0,569±0,037 <sup>A</sup>	0,951	11 012±678 <sup>A</sup>
	Arábica	7,789±0,055 <sup>A</sup>	2,758±0,022	0,596±0,067 <sup>A</sup>	0,958	10 728±1 191 <sup>A</sup>

$\sigma$  (mN.m<sup>-1</sup>) = tensão interfacial no instante t (s),  $\sigma_{eq}$  (mN.m<sup>-1</sup>) = tensão interfacial de equilíbrio, A (mN.m<sup>-1</sup>) = constante de ajuste, k (ms) = taxa de decaimento exponencial da tensão interfacial e  $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$  (s) = instante em que  $\sigma - \sigma_{eq} = 0,005$ ; \*Médias com letras iguais na mesma coluna são

significativamente diferentes segundo Tukey ( $Pr > 0,05$ ); \*\* Médias com letras iguais na mesma coluna são significativamente diferentes segundo Tukey ( $Pr > 0,05$ ).

Analisando os resultados dos sistemas constituídos pela ALB, observa-se que a  $\sigma_{eq}$  variou ( $7,378 \leq \sigma_{eq} \leq 7,898$  mN/m) conforme a presença e o tipo de polissacarídeo. O menor valor foi obtido para o sistema ALB:Pectina enquanto o maior foi obtida para solução com CMC que não diferiu significativamente ( $Pr < 0,05$ ) do tratamento controle. Os valores de taxa de decaimento exponencial (k) da  $\sigma$  do filme contendo ALB mostram que a presença de polissacarídeo não influenciou porque as médias não diferiram significativamente ( $Pr < 0,05$ ) entre si. Contudo, o menor valor encontrado (0,473 ms) refere-se ao tratamento Controle e o maior (0,744 ms) para o sistema contendo pectina LM. A taxa de decaimento observada para o sistema ALB:Pectina indica que tal sistema alcançou a estabilização da tensão interfacial mais rapidamente. Esse resultado reflete que a interação intermolecular ALB:ectina não retardou os processos de difusão, de adsorção e, posteriormente, a acomodação estrutural molecular na região interfacial, muito pelo contrário, permite propor que a pectina LM pode estar adsorvendo na interface juntamente com a ovoalbumina. Essa proposta de atividade superficial ativa da pectina LM surge com base nos resultados apresentados por Baldino et al. (2018) que comprovaram que a pectina LM exibe propriedade tensaotiva, inclusive superior à pectina alta metoxilação. Embora a goma arábica seja constituída por porção proteica, os resultados obtidos mostram que o filme formado na interface ar/água atinge equilíbrio depois do sistema ALB:pectina. Esse fato pode ser atribuído à letargia do movimento difusional até a interface, provavelmente, pela presença de aglomerados formados pelas interações intermoleculares ALB:arábica. A avaliação dos resultados obtidos para os sistemas contendo CMC mostram que o processo adsortivo de moléculas não sofre muita alteração uma vez que o perfil de decaimento e a tensão interfacial de equilíbrio do tratamento Controle são semelhantes aos do sistema contendo CMC.

Considerando os resultados dos sistemas formados pelas proteínas globulares do IFB (TABELA 4.4), observou-se que as médias de tensão interfacial de equilíbrio ( $7,838 \leq \sigma_{eq} \leq 7,993$  mN/m) e de taxa de decaimento da  $\sigma$  ( $0,479 \leq k \leq 0,596$  ms) não apresentaram diferenças significativas entre si, em outras palavras, a presença e a identidade do polissacarídeo não influenciaram nos valores de  $\sigma_{eq}$  e k. Contudo, verificou-se na metade dos tratamentos (CMC e pectina LM), a taxa de decaimento (k) foi maior comparado ao tratamento controle IFB. Apenas o sistema IFB:arábica alcançou  $\sigma_{eq}$  menor que o tratamento controle, ao contrário do observado no sistema contendo ALB.

Almejando estimar o momento de equilíbrio da  $\sigma$ , o instante em que haveria o quase equilíbrio da tensão interfacial ( $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$ ) foi estimado para os sistemas avaliados (EQUAÇÃO 4.1) considerando a expressão  $\sigma - \sigma_{eq} = 0,005$ . Ponderando os valores dos sistemas ALB, verifica-se que não havia diferenças significativas ( $Pr < 0,05$ ) entre os valores médios do instante  $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$  que variaram de 8 015 a 11 752 s sendo o menor tempo obtido para o tratamento ALB:pectina LM e o maior para o tratamento controle ALB. Avaliando os valores do instante  $t_{(\sigma-\sigma_{eq})}$  dos sistemas IFB, observa-se que as medias não tiveram diferenças significativas ( $Pr < 0,05$ ) entre si e variaram de 10 720 – 13 431 s sendo o menor tempo obtido para o tratamento IFB:arábica e o maior para o tratamento ISO:CMC.

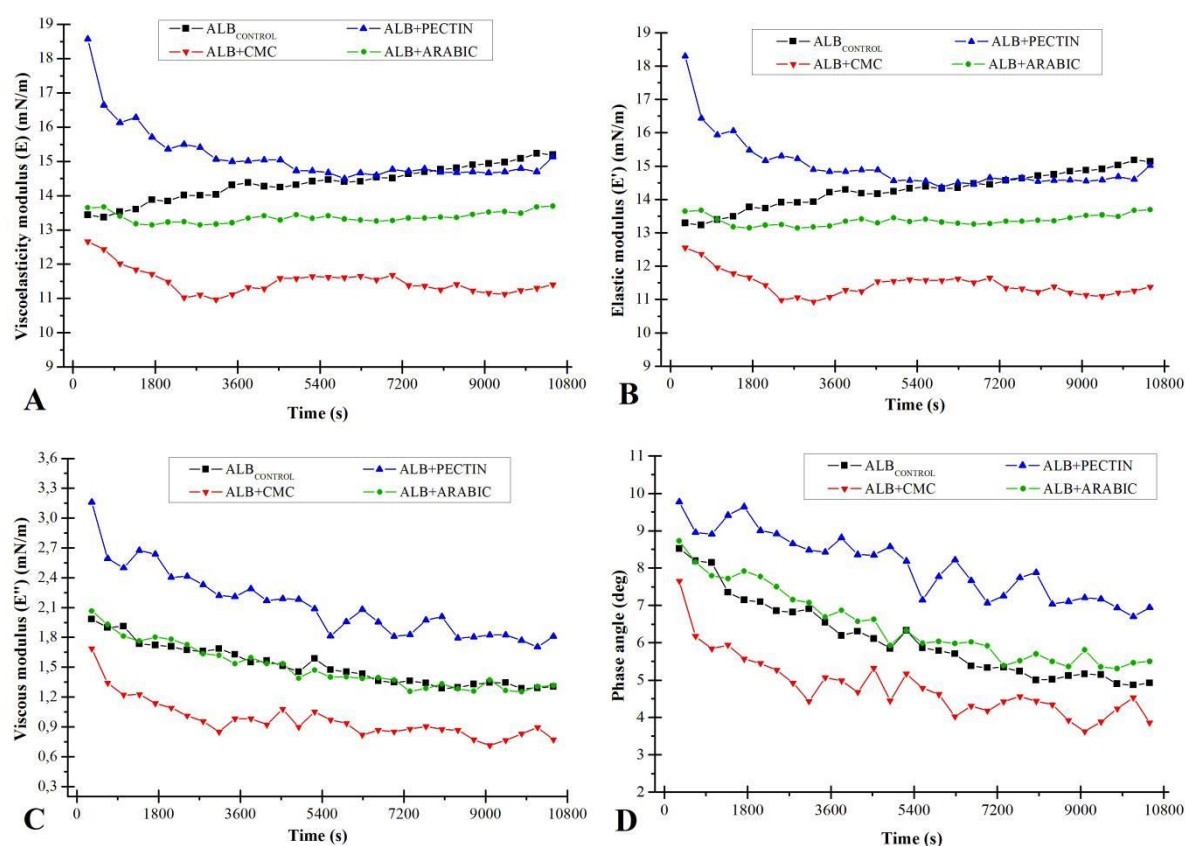
### 3.3.2 - Medidas de reologia dilatacional

O comportamento viscoelástico foi avaliado durante a formação e envelhecimento do filme superficial formado pelas moléculas adsorvidas na interface ar/água por meio de ensaios oscilatórios harmônicos dentro da faixa de viscoelasticidade linear obtido em condições constantes de frequência e amplitude de deformação a  $25 \pm 0,2$  °C. Os parâmetros dilatacionais dos tratamentos ALB e IFB são mostrados, respectivamente, nas Figuras 4.3 e 4.4. Em geral, analisando os perfis dos módulos viscoelásticos ( $E$ ), elástico ( $E'$ ), viscoso ( $E''$ ) e do ângulo de fase ( $\varphi$ ) em função do tempo evidenciam que a presença dos polissacarídeos também pode interferir nas viscoelasticidades dos filmes, em geral, levando a redução da rigidez ou resistência mecânica dos filmes (BOS; VLIET, 2001) comparado aos tratamentos controles porque a presença dos polissacarídeos causou prejuízo na viscoelasticidade.

Analisando os resultados dos perfis do módulo de viscoelasticidade dos sistemas da ovoalbumina (FIGURA 4.3A), observa-se o contínuo aumento da viscoelasticidade após a formação do filme no sistema formado apenas por proteínas (Controle). Esse resultado é a consequência da adsorção de moléculas na interface e da acomodação molecular da proteína na região interfacial que envolve o desenovelamento e o favorecimento das interações intermoleculares não covalentes proteína-proteína. Além disso, nota-se que a presença de polissacarídeos na fase aquosa contendo ovoalbumina pode impedir o ganho de viscoelasticidade dos filmes. Verifica-se que em nenhum dos tratamentos contendo polissacarídeos houve incremento do módulo de viscoelasticidade após formação da camada de moléculas. O sistema ALB:Pectina foi o melhor tratamento porque apresentou perfil de valores maiores comparado aos demais, o perfil do sistema ALB:arábica manteve valores

constantes e, por último, a sistema ALB:CMC foi o tratamento que exibiu o perfil com os menores valor do módulo de viscoelasticidade. Os resultados do módulo de viscoelasticidade indicam que a presença desses polissacarídeos pode diminuir a resistência mecânica dos filmes interfaciais da ovoalbumina formados na superfície, característica negativa quando se pensa em desenvolvimento de alimentos, pois, após serem formulados, os produtos sofrem perturbações mecânicas oriundas de operações unitárias que favorecem desestabilidade coloidal.

Figura 4.3 - Perfis dos parâmetros dilatacionais dos filmes proteicos formados na interface ar/água contendo  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ovoalbumina (ALB) e  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de polissacarídeo preparado em fosfato-citrato (50 mM pH 3) contendo 1,5 % NaCl: (A) Módulo de viscoelasticidade (E), (B) módulo de elasticidade ( $E'$ ), (C) módulo viscoso ( $E''$ ) e (D) ângulo de fase ( $\varphi$ )



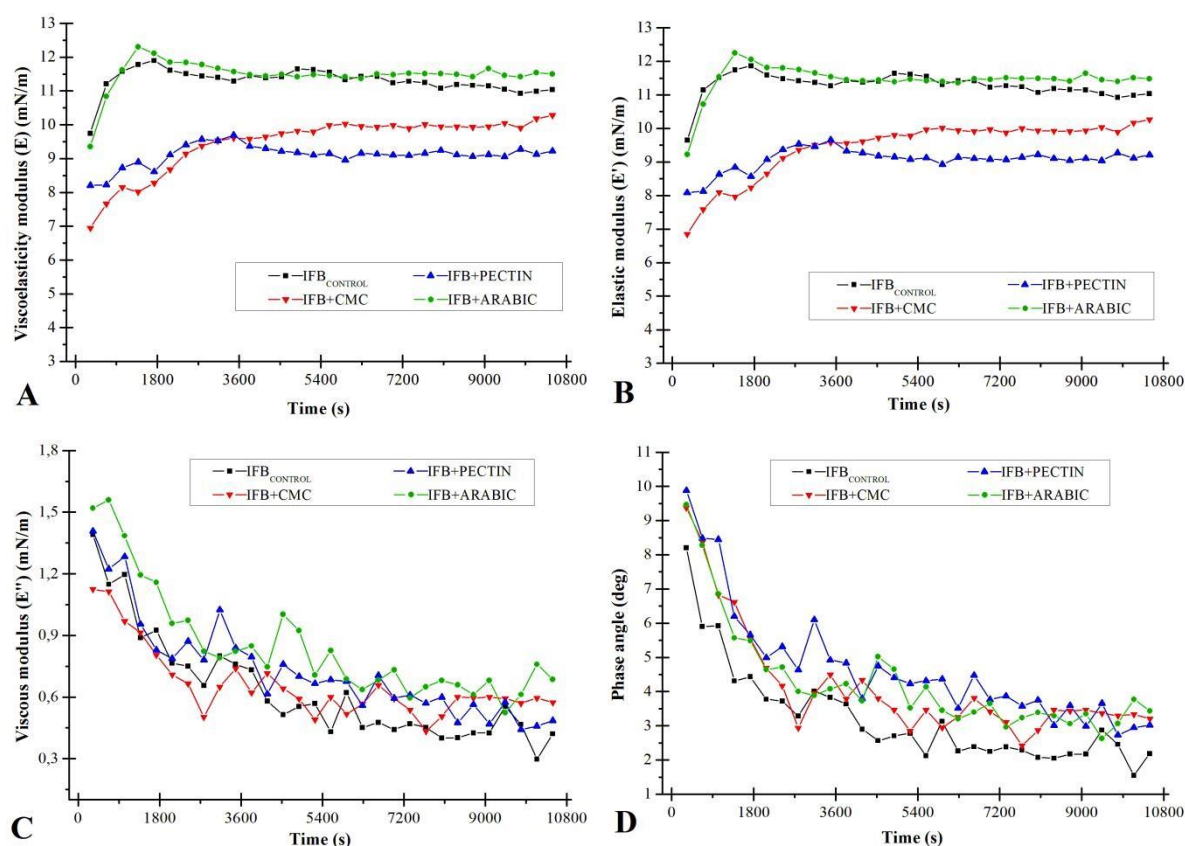
Fonte: o Autor

Avaliando os perfis das componentes elásticas e viscosa dos sistemas da ALB (FIGURA 4.3B e 4.3C), observa-se que a componente elástica é maior que a viscosa ao longo do tempo de adsorção. Resultado coerente com os perfis do ângulo de fase ( $\varphi$ ) (FIGURA

4.3D) que apontam que as interações proteína-proteínas levaram a formação de um filme com características de gel (PATINO et al., 2003) porque os valores de  $\phi$  são baixos ( $<10$ ), sobretudo, após constatar a tendência de queda de  $\phi$  que confirma o caráter de gel durante a formação e envelhecimento do filme.

Examinando os resultados dos parâmetros oscilatórios dos sistemas do IFB (FIGURA 4.4), observa-se que a viscoelasticidade da camada formada apenas por proteínas (Controle) aumentou até 1800 s e após esse instante o módulo manteve se basicamente constante. Esse resultado é em decorrência do processo adsorptivo característico das proteínas globulares de feijão comum branco na interface, em outras palavras, envolve o movimento difusional, a adsorção propriamente dita, o desenovelamento das cadeias polipeptídicas e, por fim, as interações intermoleculares proteína-proteína não covalente.

Figura 4.4 - Perfis dos parâmetros dilatacionais dos filmes proteicos formados na interface ar/água contendo  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de isolado proteico de feijão branco (IFB) e  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de polissacarídeo preparado em fosfato-citrato (50 mM pH 3) contendo 1,5 % NaCl: (A) Módulo de viscoelasticidade ( $E$ ), (B) módulo de elasticidade ( $E'$ ), (C) módulo viscoso ( $E''$ ) e (D) ângulo de fase ( $\phi$ ).



Fonte: o Autor

Todavia, diferente da camada de ALB que apresentou contínuo aumento do módulo viscoelástico (E), resultado da contínua adaptação molecular, as proteínas globulares do feijão podem ter tido maior capacidade de adaptação (desenovelamento) bem como de realização das interações intermoleculares favoráveis na superfície. Acredita-se que essa característica diferenciada possa ser atribuída a diferença quantitativa de segmentos polipeptídicos hidrofóbicos entre as proteínas vegetais analisadas e a ovoalbumina.

Além disso, verifica-se que a presença de polissacarídeos também pode interferir no módulo viscoelástico dos filmes formados nos sistemas IFB, promovendo aumento da viscoelasticidade das camadas durante a formação e envelhecimento do filme, diferente dos sistemas ALB. Nota-se que a presença da goma arábica trouxe aumento da viscoelasticidade do filme comparada ao tratamento controle IFB, provavelmente, porque houve adsorção das proteínas globulares e da porção proteica da goma arábica na interface, produzindo heterogeneidade no filme favorecendo o aumento da viscoelasticidade. Ao passo que a presença de carboximetilcelulose ou de pectina na solução aquosa não favoreceu a ampliação do módulo viscoelástico comparado ao tratamento Controle, todavia, mostrou aumento do módulo E durante a formação e envelhecimento do filme. Esse fato mostra que a interação IFB-polissacarídeo nos sistemas pode não atrapalhar o processo de adaptação molecular na região interfacial, muito pelo contrário.

Analisando os perfis das componentes elásticas e viscosa dos sistemas das proteínas globulares do IFB (FIGURA 4.4B e 4.4C), observa-se que a componente elástica também é maior que a viscosa ao longo do tempo de adsorção. Assim como foi obtido nos sistemas ALB, os perfis os perfis do ângulo de fase ( $\varphi$ ) dos sistemas IFB (FIGURA 4.4D) mostram que as interações proteína-proteínas também produziram filme interfacial com estrutura semelhante à rede de gel (PATINO et al., 2003) porque os valores de  $\varphi$  são baixos ( $<10$ ), sobretudo, após notar a tendência de queda de  $\varphi$  que revelam o caráter de gel ao longo do tempo de formação e envelhecimento do filme.

#### **4 - CONCLUSÃO**

A presença de polissacarídeo pode interferir nas propriedades reológicas superficiais do filme formado na presença de proteínas de feijão comum branco. A

comparação dos perfis de decaimento da tensão interfacial entre o isolado proteico de feijão comum branco com a ovoalbumina permitiu verificar que o desempenho da ovoalbumina na ausência ou presença de polissacarídeos é melhor. Nos sistemas ALB-polissacarídeo, observou-se que presença de polissacarídeo pode favorecer o decaimento da tensão interfacial com destaque para a pectina de baixa metoxilação, provavelmente, porque esse polissacarídeo também atua como surfactante na interface ar/água. Enquanto que no sistema IFB-polissacarídeo, a presença de polissacarídeo não proporcionou melhoria nos processos envolvidos na adsorção na interface ar/água, em outras palavras, não houve diferença na redução da tensão interfacial. Além da interferência no decaimento cinético da tensão interfacial, a presença de polissacarídeos trouxe mudanças negativa e positiva nos perfis de viscoelasticidade dos filmes contendo, respectivamente, ovoalbumina e proteínas de feijão branco. Embora o processo adsorptivo das proteínas de feijão branco seja mais lento comparado ao processo verificado para a ovoalbumina, o ganho de viscoelasticidade dos filmes interfaciais contendo as proteínas de feijão pode sugerir que dispersões formadas com essas proteínas podem exibir maior estabilidade cinética.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJIBOLA, C. F. et al. Polypeptide composition and functional properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) albumin, globulin and protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, v. 56, p. 189–200, 2016.
- BALDINO, N. et al. Rheological surface properties of commercial citrus pectins at different pH and concentration. *Lwt- Food Science and Technology*, v. 93, n. January, p. 124–130, 2018.
- BELLESÍ, F. A.; RUIZ-HENESTROSA, V. M. P.; PILOSOF, A. M. R. Behavior of protein interfacial films upon bile salts addition. *Food Hydrocolloids*, v. 36, p. 115–122, 2014.
- BOS, M. A.; VLIET, T. V. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layer and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 91, p. 437–471, 2001.
- CHAGAS, E. P.; SANTORO, L. G. Globulin and albumin proteins in dehulled seeds of three *Phaseolus vulgaris* cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 51, n. 1, p. 17–26, 1997.
- DANIELSSON, C. E. Seed globulins of the Gramineae and Leguminosae. *The Biochemical journal*, v. 44, n. 4, p. 387–400, 1949.

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

DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: Protein content and nutritional value. *Field Crops Research*, v. 53, n. 1–3, p. 31–45, 1997.

FAMEAU, A.-L.; SLONEN, A. Effect of particles and aggregated structures on the foam stability and aging. *Comptes Rendus Physique*, v. 15, n. 8–9, p. 748–760, 2014.

GALVÁN, Z. R. N. et al. Rheological Properties of Aqueous Dispersions of Xanthan Gum Containing Different Chloride Salts Are Impacted by both Sizes and Net Electric Charges of the Cations. *Food Biophysics*, v. 13, n. 2, p. 186–197, 2018.

GORNALL, A. G. .; BARDAWILL, C. J. .; DAVID, M. M. . Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 177, n. 2, p. 751–766, 1949.

HE, Q. . et al. PEGylation of black kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate with potential functional properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 164, p. 89–97, 2018.

HILL, C.; EASTOE, J. Foams: From nature to industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 247, n. March, p. 496–513, 2017.

HOJILLA-EVANGELISTA, M. P. et al. Composition and Functional Properties of Saline-Soluble Protein Concentrates Prepared from Four Common Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 95, n. 8, p. 1001–1012, 2018.

JAFFÉ, W. G. .; HANNIG, K. . Fractionation of Proteins Beans (*Phaseolus vulgaris*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 109, p. 80–91, 1965.

JARPA-PARRA, M. et al. Impact of pH on molecular structure and surface properties of lentil legumin-like protein and its application as foam stabilizer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 132, p. 45–53, 2015.

JOSHI, M. et al. Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate. *Food Chemistry*, v. 134, n. 3, p. 1343–1353, 2012.

LAFARGA, T. . et al. Characterization of functional properties of proteins from Ganxet beans (*Phaseolus vulgaris* L. var. Ganxet) isolated using an ultrasound-assisted methodology. *Lwt-Food Science and Technology*, v. 98, n. July, p. 106–112, 2018.

LI, W. et al. Effects of soluble soy polysaccharides and gum arabic on the interfacial shear rheology of soy  $\beta$ -conglycinin at the air/water and oil/water interfaces. *Food Hydrocolloids*, v. 76, p. 123–130, 2018.

MACRITCHIE, F. Protein adsorption/desorption at fluid interfaces. *Colloids and Surfaces*, v. 41, n. C, p. 25–34, 1989.

MARTÍNEZ, K. D. et al. Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, v. 23, n. 8, p. 2149–2157, 2009.

MILLER, R.; LIGGIERI, L. *Progress in Colloid and Interface Science: Interfacial Rheology*. Leiden: Koninklijke Brill NV, 2009. v. 1

MIQUELIM, J. N.; LANNES, S. C. S.; MEZZENGA, R. pH Influence on the stability of foams with protein-polysaccharide complexes at their interfaces. *Food Hydrocolloids*, v. 24, n. 4, p. 398–405, 2010.

NEVES, I. C. O. et al. Foaming properties of suspensions composed by  $\beta$ -lactoglobulin and polysaccharides, in the presence of sucrose or polyols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 550, n. April, p. 199–208, 2018.

OOMAH, B. D. .; MAZZA, G. .; CUI, W. . Optimization of protein extraction from flaxseed meal. *Food Research International*, v. 27, n. 4, p. 355–361, 1994.

PATINO, J. M. R. et al. Dynamic properties of soy globulin adsorbed films at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 268, n. 1, p. 50–57, 2003.

PEREZ, A. A. et al. Milk whey proteins and xanthan gum interactions in solution and at the air-water interface: A rheokinetic study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 81, n. 1, p. 50–57, 2010.

PHILIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. *Structure-Function Properties of Food Proteins*. [s.l: s.n.].

RIZZO, G.; BARONI, L. Soy, soy foods and their role in vegetarian diets. *Nutrients*, v. 10, n. 1, p. 1–51, 2018.

RODRIGUEZ PATINO, J. M.; PILOSOFF, A. M. R. Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, v. 25, n. 8, p. 1925–1937, 2011.

RUÍZ-HENESTROSA, V. P. et al. Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 309, n. 1–3, p. 202–215, 2007.

SADAHIRA, M. S. et al. Influence of protein-pectin electrostatic interaction on the foam stability mechanism. *Carbohydrate Polymers*, v. 103, n. 1, p. 55–61, 2014.

SIMIQUÉLI, A. A. et al. Ovalbumin and guar gum foam and its surface properties as influenced by sucrose and sorbitol. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 135, p. 226–232, 2019.

SUN, S. M. et al. Reversible and Irreversible Dissociation of Globulins from *Phaseolus vulgaris* Seed. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 249, n. 7, p. 2118–2121, 1974.

WALSTRA, P. *Foams: Physics, Chemistry and Structure*. New York: Springer, 1989.

## CONCLUSÃO GERAL

O processo de produção de extrato proteico de feijão comum branco por solubilização salina leva a produção de isolados proteicos (>90 % - m/v). A variável Proporção  $\text{NaCl}_{\text{aq}}/\text{Farinha}_{\text{des}}$  possui efeito linear negativo significativo ( $\text{Pr}<0,05$ ) sobre a capacidade de inibir a  $\alpha$ -amilase do isolado proteico, enquanto que a temperatura não exibe efeito significativo. O processo de separação das proteínas via cromatografia de interação hidrofóbica não leva a obtenção da fração vicilina 7S em alta pureza. Independente da condição de pH e concentração de NaCl avaliada, as proteínas globulares do feijão comum branco podem manter a habilidade de redução cinética da tensão interfacial. Verificou-se que o pH e a concentração de NaCl não possuem efeito significativo ( $\text{Pr}>0,05$ ) sobre os parâmetros de decaimento da tensão interfacial, os filmes superficiais formados exibiam estrutura gélica com comportamento viscoelásticos, a presença de baixas concentrações NaCl favoreceu o aumento da viscoelasticidade em qualquer pH e os maiores valores do módulo viscoelástico foram obtidos para amostras preparadas em pH 3 com ou sem Sal. A comparação dos perfis de decaimento da tensão interfacial entre o isolado proteico de feijão comum branco com a ovoalbumina permitiu verificar que o desempenho da ovoalbumina na ausência ou presença de polissacarídeos é melhor e que a presença de polissacarídeos pode trazer melhoria nos perfis de viscoelasticidade dos filmes contendo proteínas de feijão branco. Embora o processo adsortivo das proteínas de feijão branco demonstre ser mais lento comparado ao processo verificado para a ovoalbumina, o ganho de viscoelasticidade dos filmes interfaciais contendo as proteínas de feijão pode sugerir que dispersões formadas com essas proteínas podem exibir maior estabilidade cinética. Portanto, conclui-se que (i) o processo de purificação de faseolamina partindo de isolado proteico de feijão branco deve ser realizada combinando outras técnicas cromatográficas a de interação hidrofóbica, (ii) embora a variação do pH e da concentração de NaCl não possuem efeito significativo sobre os parâmetros de decaimento da tensão interfacial, observa-se que interfere na viscoelasticidade dos filmes superficiais e, (iii) em meio ácido (pH 3) salino (1,5 % m/v NaCl), a presença e a identidade do polissacarídeo no meio pode interferir no desempenho das habilidades superficiais das proteínas globulares de feijão comum branco.