

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

**Propriedades funcionais e atividade antioxidante de hidrolisados
proteicos de feijão preto**

Jarine Amaral do Evangelho
Nutricionista

Pelotas, 2014

Jarine Amaral do Evangelho

**Propriedades funcionais e atividade antioxidante de hidrolisados
proteicos de feijão preto**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos da Universidade
Federal de Pelotas, como requisito parcial à
obtenção do Título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação

Prof^a Dr^a Elessandra da Rosa Zavareze (UFPEL - FAEM)

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias (UFPEL - FAEM)

Prof. Dr. Jose de J. Berrios (USDA)

Pelotas, 2014

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Ana Paula Wally Vallim (IFSul)

Prof^a Dr^a Letícia Mascarenhas Pereira Barbosa (UFPeI-FN)

Dr^a Vânia Zanella Pinto (UFPEL - FAEM)

Prof^a Dr^a Elessandra da Rosa Zavareze (UFPeI-FAEM)

Agradecimentos

A Deus. Ele esteve sempre ao meu lado durante esta caminhada, obrigada por me amparar nos momentos difíceis e me ajudar a superar as dificuldades. Contudo, não teria chegado até aqui sem a ajuda de alguns anjos que Ele me enviou, a saber:

Agradeço a meus pais Tereza Maria e Jorge e ao meu querido irmão George que mesmo distantes, estiveram sempre comigo, ensinando-me, apoiando-me, amando-me incondicionalmente e acreditando em meu potencial. Eu amo vocês!

Obrigada a todos os meus familiares e aos meus amigos que me incentivaram a chegar até aqui e compreenderam a minha ausência (que não foi pouca!!).

A orientadora, professora Elessandra da Rosa Zavareze obrigada por acreditar em mim e aceitar-me como orientanda, incentivar-me, apoiar-me sempre que precisei e pela amizade que levarei para sempre!

Agradeço ao meu co-orientador professor Álvaro Renato Guerra Dias pelos conhecimentos repassados nesses anos de trabalho, pelo incentivo, pelo apoio, pela confiança e pela amizade.

Ao Dr. Jose de J. Berrios pela oportunidade desenvolver parte do projeto em seu laboratório no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), esta oportunidade sem dúvidas me fez crescer profissionalmente e pessoalmente. Agradeço ainda ao James Pan químico deste laboratório que sempre prestativo me auxiliou nas análises.

Aos professores Moacir Cardoso Elias e Mauricio Oliveira pelo apoio, pela receptividade e pelo empenho para integração da equipe do laboratório e pela amizade.

Ao meu colega Nathan Vanier, meu muitíssimo obrigada, não tenho palavras para descrever a imensa ajuda (sem medir esforços!!) para a realização deste trabalho. Parabéns por ser esse exemplo de profissional, pelo entusiasmo e amor pela pesquisa!

A minha grande amiga Vânia Pinto que me acolheu no labgrãos (desde o primeiro dia!!) e fora dele também, nesses anos aprendi muito contigo, es sem duvida uma pessoa admirável!!

A minha amiga Gabriela que sempre me incentivou muito obrigada por ser essa pessoa de bem com vida, coração iluminado que alegrou meus dias difíceis quando os percalços aconteciam que tive o prazer de compartilhar disciplinas, mates, estudos, histórias e lanches!!

A minha querida amiga de laboratório Shanise por ser um grande exemplo de perseverança e determinação.

Aos colegas de Pós-graduação e estagiários do Laboratório de Grãos muito obrigada pelo apoio e a amizade.

Divido com todos vocês mais uma etapa de minha vida.

Deus abençoe a todos!

Dedicatória

**A minha admirável mãe Tereza Maria
Ao meu querido irmão George
Aos demais familiares e amigos**

RESUMO

Evangelho, Jarine Amaral do. **Propriedades funcionais e atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de feijão preto**. 2014, 84 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas.

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do ponto de vista nutricional tem grande importância na dieta, pois é fonte de carboidratos, proteínas, fibras, minerais e vitaminas. A proteína é o segundo maior constituinte desse grão, com variação entre 18 a 30%, dependendo do cultivar. As proteínas são de grande importância na indústria alimentícia, pois além do seu valor nutricional, elas podem apresentar propriedades funcionais desejáveis à formulação de alimentos. A hidrólise enzimática vem sendo aplicada para modificar as proteínas e melhorar suas propriedades funcionais, bem como liberar peptídeos de diferentes pesos moleculares e composição de aminoácidos com atividade antioxidante. Tendo em vista estes aspectos, o objetivo deste estudo foi extrair proteínas de feijão preto e avaliar as propriedades funcionais e a capacidade antioxidante do concentrado proteico de feijão preto, bem como de seus hidrolisados obtidos pela ação das enzimas pepsina e Alcalase. Foram realizadas análises, como grau de hidrólise, composição química, eletroforese (SDS-PAGE), fluorescência relativa, calorimetria diferencial de varredura (DSC), capacidade de absorção de óleo, estabilidade de emulsão, perfil de aminoácidos e atividade antioxidante do concentrado proteico e dos hidrolisados de feijão preto. A enzima pepsina promoveu maior grau de hidrólise do concentrado proteico e os hidrolisados proteicos obtidos com essa enzima apresentaram menor conteúdo proteico, também apresentaram menor fluorescência relativa, pico de desnaturação proteica e menor atividade antioxidante e estabilidade das emulsões, que os hidrolisados obtidos a partir da enzima Alcalase. O concentrado proteico de feijão preto e seus hidrolisados apresentaram um bom perfil de aminoácidos e com atividade antioxidante, podendo assim ser empregados como suplementos proteicos da dieta como um alimento nutricional e bioativo.

Palavras-chave: Alcalase, Emulsão, Hidrólise enzimática, Hidrolisado proteico, Pepsina, *Phaseolus vulgaris* L.

ABSTRACT

Evangelho, Jarine Amaral do. **Functional properties and antioxidant activity from black bean protein hydrolysate**. 2014, 84 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas.

Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) have an important role in human nutrition, been sources of carbohydrates, protein, vitamins and minerals. The proteins are the second major component, providing an inexpensive source of protein in the diet (20–25%), according to the cultivars. These proteins are very important on food industry, since in addition to its nutritional value, they may have desirable functional properties for food development. The enzymatic hydrolysis has been used to change and improve these protein functional properties as well as realizing peptides with different molecular weight and antioxidant activity. Based on these, the aims of this study were to isolate black bean protein, characterize the black bean protein concentrate (CPFP) and its hydrolysates produced by Alcalase and pepsin enzymes. Hydrolysis degree, proximate composition, electrophoresis (SDS-PAGE), relative fluorescence, thermal stability by differential scanning calorimetry (DSC), oil binding capacity, emulsion stability, amino acids profile, and the antioxidant activity of CPFP and its hydrolyzed were done. Pepsin promoted the highest hydrolysis degree and the hydrolysate from this enzyme action had the highest ash content, as well as, the lowest crude protein concentration, low relative fluorescence, protein denaturation peak (compared to CPFP control) and the lowest antioxidant activity, and lower emulsion stability, compared to Alcalase hydrolyzed material. The CPFP and its hydrolysates had good amino acid profile with antioxidant activity, could be applied as protein supplements in the diet as a nutritional and bioactive food.

Keywords: Alcalase, Black bean, Emulsion, Enzymatic hydrolysis, Pepsin, *Phaseolus vulgaris* L., Protein hydrolysate

LISTA DE TABELAS

Figura 1. Processo de hidrólise: Rompimento da ligação peptídica	21
Figura 2. Reação do ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) com os aminoácidos	24
Figura 3. Mecanismo de desestabilização das emulsões	35
Figura 4. Grau de hidrólise do concentrado proteico de feijão preto obtido pela ação das enzimas pepsina (a) e Alcalase (b)	49
Figura 5. Teor de proteínas (a) e cinzas (b) (% em base seca) do concentrado proteico de feijão preto e de seus hidrolisados obtidos pela ação da enzima Alcalase e pepsina.....	52
Figura 6. Perfil de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) do concentrado proteico de feijão preto e hidrolisados. STD: proteínas padrão; A: concentrado proteico de feijão preto (Controle); B-F: Hidrolisados proteicos com 15, 30, 45, 60 e 120 min de reação para pepsina (a) e Alcalase (b), respectivamente.....	54
Figura 7. Espectro de fluorescência relativa do concentrado proteico de feijão preto (CPFP) e dos hidrolisados proteicos a partir de pepsina (a) e Alcalase (b).....	58
Figura 8. Termogramas de DSC do concentrado proteico de feijão preto (a) e de seus hidrolisados obtidos a partir da enzima pepsina nos tempos de reação 15 min (b), 30 min (c), 45 min (d), 60 min (e) e 120 min (f)	60
Figura 9. Capacidade de absorção de óleo (mL/g) do concentrado proteico de feijão preto e hidrolisados a partir de pepsina ou Alcalase	62
Figura 10. Estabilidade de emulsão do concentrado proteico de feijão preto (A) e seus hidrolisados com pepsina (B-F) e com Alcalase (G-K) durante 30 dias de armazenamento	65
Figura 11. Atividade antioxidantes dos hidrolisados proteicos quantificados pela inibição de (a) ABTS ^{•+} e de (b) DPPH	67

LISTA DE FIGURAS

Tabela 1. Temperatura e pH ótimos de enzimas comerciais aplicadas a hidrólises enzimáticas de proteínas alimentares.....	22
Tabela 2. Delineamento experimental para avaliar as propriedades físico-químicas, funcionais e térmicas, e atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de feijão.....	40
Tabela 3. Composição de aminoácidos (aa g/kg de proteína) do concentrado proteico do feijão preto (CPFP) e dos hidrolisados proteicos obtidos com 120 min de reação com as enzimas pepsina e Alcalase	56
Tabela 4. Temperaturas de transição (°C) e entalpia (J/g) da análise térmica do concentrado proteico de feijão preto e de seus hidrolisados obtidos por diferentes tempos de reação com pepsina.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Condições de hidrólise e atividade biológica de hidrolisados proteicos de diferentes fontes alimentares.....	26
Quadro 2. Propriedades funcionais desempenhadas pelas proteínas em sistemas alimentares.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Hipótese	15
1.2. Objetivos	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Material.....	39
3.2. Métodos.....	39
3.2.1 Delineamento experimental.....	40
3.2.2. Preparo do concentrado proteico de feijão preto (CPFP).....	40
3.2.3. Hidrólise enzimática	41
3.2.4. Determinação do grau de hidrólise.....	41
3.2.4.1. Amostra controle (<i>hc</i>) (não hidrolisada, efeito da temperatura e do pH)	42
3.2.4.2. Hidrolisados proteicos de feijão (<i>htot</i>) (com adição de enzima)	43
3.2.4.3. Hidrólise total (<i>ht</i>)	43
3.2.5. Composição química.....	44
3.2.6. Eletroforese (SDS-PAGE)	44
3.2.7. Perfil de aminoácidos	45
3.2.8. Fluorescência relativa.....	45
3.2.9. Propriedades térmicas.....	46
3.2.10. Capacidade de absorção de óleo (CAO).....	46
3.2.11. Estabilidade de emulsão	46
3.2.12. Atividade antioxidante pelo método ABTS ^{•+}	47
3.2.13. Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	48
3.3.14. Estatística.....	48

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. Grau de hidrólise	49
4.2. Composição química.....	51
4.3. Eletroforese (SDS-PAGE)	53
4.4. Perfil de aminoácidos	55
4.5. Intensidade de fluorescência relativa	57
4.6. Propriedades térmicas (DSC).....	60
4.7. Capacidade de absorção de óleo.....	62
4.8. Estabilidade de emulsão	63
4.9. Atividade antioxidante	66
5. CONCLUSÕES	68
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie do gênero *Phaseolus* mais produzida e consumida no mundo. O cultivo do feijão ocorre em mais de 100 países, porém a Índia, Myanmar e o Brasil são os principais produtores mundiais (FAO, 2011). O grão é rico em amido, proteínas, fibras, vitaminas do complexo B e polifenóis, principalmente na região do tegumento, que apresentam atividade antioxidante. No que se refere à proteína de feijão, destaca-se o seu alto teor no grão (18 a 30% dependendo da cultivar) e apresentam em seu perfil de aminoácidos oito dos nove essenciais aos seres humanos.

Os feijões quebrados, também conhecidos como bandinhas de feijão são provenientes dos processos de colheita e pós-colheita dos grãos e apresentam o mesmo valor nutricional dos grãos inteiros, entretanto baixo valor comercial. A abertura dos cotilédones aumenta a exposição dos componentes do grão ao meio ambiente, o que favorece as reações físicas e químicas, indicando assim a necessidade do seu consumo em menor tempo que os grãos inteiros (CARVALHO et al., 2012). Uma forma de agregar valor a esses grãos quebrados é a extração de suas proteínas.

De acordo com Damodaran (1996), as proteínas são utilizadas como ingrediente na indústria de alimentos devido ao seu valor nutritivo e suas propriedades funcionais, como atividade emulsificante, formação de gel e espuma, agente aglutinante de óleo, água e aroma, aumento de viscosidade, etc. De forma geral, as proteínas são efetivas na estabilização de emulsões de óleo em água, devido a sua natureza anfifílica, por exemplo, possui tanto sítios de reação hidrofílicos como hidrofóbicos na sua superfície e habilidade para formação de filme (AVRAMENKO; LOW; NICKERSON, 2013).

Recentemente, pesquisadores investigaram a ação da hidrólise enzimática sobre as proteínas vegetais visando melhorar a funcionalidade e as propriedades nutricionais das proteínas, bem como a produção de hidrolisados proteicos com atividade antioxidante. Geralmente a hidrólise enzimática de proteínas é acompanhada por 3 efeitos distintos: (1) uma redução no peso molecular das proteínas, (2) um

aumento no número de grupos ionizáveis e (3) exposição dos grupos hidrofóbicos até então ocultos. Estes efeitos podem efetivamente modificar a conformação e a estrutura das proteínas e, logo, melhorar a sua solubilidade, as suas propriedades de superfície e as suas propriedades de gel (ZHAO et al., 2011).

Alguns estudos mostraram os efeitos da hidrólise enzimática sobre as propriedades funcionais do isolado proteico de soja (JUNG; MURPHY; JOHNSON, 2005) girassol (MARTINEZ et al., 2005), farelo de aveia (GUAN et al., 2007) e lentilha (AVRAMENKO; LOW; NICKERSON, 2013). Outros estudos reportaram a atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de cereais, leguminosas e de proteínas de origem animal, mas poucos estudos similares foram encontrados utilizando o feijão fonte proteica. De acordo com VALDEZ-ORTIZ et al. (2012), a atividade antioxidante das proteínas é dependente da sua constituição de aminoácidos e esta relacionada com a capacidade de doação de prótons aos radicais livres.

Os antioxidantes são benéficos à saúde humana, pois protegem o organismo contra a ação dos radicais livres. A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diferentes mecanismos endógenos. Entretanto, em algumas situações o organismo humano produz em excesso esses radicais resultando no chamado estresse oxidativo. Essa condição é precursora do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, tais como o diabetes, Alzheimer, artitre, arteriosclerose, câncer entre outras.

As proteínas têm papel fundamental em praticamente todos os processos biológicos e estudar sua capacidade antioxidante como no caso da proteína de feijão é importante para ampliar a utilização das proteínas desse grão na preparação de fórmulas alimentares que contenham além das propriedades nutritivas da proteína um alimento bioativo.

1.1. Hipótese

As propriedades funcionais e a capacidade antioxidante de hidrolisados proteicos de feijão variam em função da enzima hidrolítica utilizada e do grau de hidrólise.

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito da hidrólise enzimática com enzimas pepsina e Alcalase nas propriedades funcionais e a capacidade antioxidante de hidrolisados proteicos de feijão.

1.2.2 Objetivos específicos

Extrair proteína de feijão preto para produção de concentrado proteico de feijão preto

Hidrolisar o concentrado proteico de feijão preto utilizando as enzimas pepsina e Alcalase;

Avaliar o grau de hidrólise das enzimas em diferentes tempos de reação;

Avaliar a composição química, peso molecular, perfil de aminoácidos, hidrofobicidade, propriedades térmicas, funcionais e antioxidantes do concentrado e hidrolisados proteicos de feijão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Feijão

O gênero *Phaseolus* compreende todas as espécies conhecidas como feijão. Estima-se que existem cerca de cinquenta e cinco espécies de *Phaseolus*, das quais apenas cinco são cultivadas comercialmente: o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.); o feijão de lima (*P. lunatus*); o feijão Ayocote (*P. coccineus*); o feijão tepari (*P. acutifolius*); e o *P. polyanthus* (EMBRAPA, 2010).

Phaseolus vulgaris L. é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero, contribuindo com cerca de 95% da produção mundial de *Phaseolus* (LAJOLO; GENOVESE; MENEZES, 1996). Segundo dados da FAO (2011), os cinco principais países produtores são Índia, Myanmar, Brasil, China e Estados Unidos e, juntos representam mais de 65% da produção mundial. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial do grão com uma produção 2011 estimada em 3,43 milhões de toneladas.

Durante os processos de colheita e pós-colheita do feijão, existe a geração de grãos quebrados, normalmente de cozimento difícil, denominado “bandinhas de feijão”. Estes grãos quebrados possuem propriedades funcionais e nutricionais semelhantes às do feijão, com alto potencial para uso na indústria alimentícia, podendo ser empregado na produção de farinhas, extração de proteínas e amido, embora ainda no Brasil seja pouco aproveitado (SILVA; ASCHERI, 2009)

No Brasil o consumo de feijão preto se dá principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, no sudeste de Minas Gerais e no Sul do Espírito Santo. Nos outros estados brasileiros o feijão preto apresenta pouca aceitação e baixo valor comercial (EMBRAPA, 2010). Por outro lado, consumo de feijão carioca é difundido em todo território nacional.

O feijão, do ponto de vista nutricional, tem grande importância na dieta, pois é fonte de carboidratos, proteínas, fibras, minerais e vitaminas. Os carboidratos são os principais constituintes dos feijões e o amido é o carboidrato mais abundante nos grãos (22-45%) (LIN et al., 2008). Muitos benefícios nutricionais são atribuídos aos

carboidratos do feijão. O amido de feijão apresenta baixo índice glicêmico por ser lentamente digerido (WINHAM; HUTCHINS; MELDE, 2007), enquanto a fibra alimentar está associada à saúde gastrointestinal (MARLETT; McBURNEY; SLAVIN, 2002).

A proteína é o segundo maior constituinte desses grãos e os valores variam de 18 a 30% dependendo da cultivar (PIRES et al., 2006). Para uma proteína ser considerada de alto valor biológico ela precisa ter boa digestibilidade gastrointestinal e apresentar quantidades adequadas dos aminoácidos essenciais (Leon et al., 2005). O feijão possui alta digestibilidade proteica in vitro (aproximadamente 78%) comparado à outra fonte de proteína vegetal como a soja (59 a 65%) (PIRES, 2006).

Os aminoácidos são considerados essenciais quando o organismo não o produz de forma endógena e se faz necessário consumir através da dieta. Existem vinte aminoácidos principais de importância ao organismo humano. Desses vinte, apenas nove são considerados essenciais: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, histidina (FRANCO, 2005). A proteína de feijão apresenta em sua constituição oito dos nove aminoácidos essenciais ao homem, tendo como aminoácido limitante a metionina que se encontra em valores muito pequenos nesse grão.

A maior parte das proteínas de feijão são de armazenamento, representando cerca de 80% das proteínas totais desse grão. Essas proteínas são desprovidas de atividade catalítica e localizam-se em corpúsculos proteicos no cotilédone (OOMAH et al., 2011). O feijão não contém quantidades expressivas de prolaminas e de glutelinas, no entanto, apresenta elevados teores de globulinas e albuminas (BROUGHTON et al., 2003). Ao contrário dos grãos de cereais, o feijão praticamente não contém prolaminas e apresenta um teor relativamente baixo de glutelinas (SGARBIERI, 1996).

Em geral, as globulinas são proteínas de reserva, enquanto as albuminas desempenham papéis metabólicos essenciais como participação na constituição de enzimas como a lipoxigenase e as lectinas, por exemplo (PARK et al., 2010). O grupo das globulinas é formado pelas faseolinas (ou vicilinas) e leguminas, de acordo com a sua precipitação (SILVA et al., 2001). As proteínas restantes, glutelinas e prolaminas,

estão fortemente ligadas às organelas e membranas celulares e são pouco estudadas (PIRES, 2002).

A principal fração das globulinas e a faseolamina (fração 7S), representando cerca de 40 a 50% das proteínas do grão. A faseolamina é a maior proteína de armazenamento do feijão. É uma proteína oligomérica composta de três subunidades polipeptídicas α , β e γ com massa molecular entre 43 a 53 kDa (YIN et al., 2008). Enquanto outra fração globulínica as leguminas (fração 11S) representam apenas 10% (MONTROYA et al., 2010). As proteínas das frações 7S e 11S contêm grandes quantidades dos ácidos aspártico e glutâmico. Entretanto, os teores de arginina e lisina variam consideravelmente, sendo que o conteúdo de lisina de muitas proteínas 11S é significativamente maior do que das proteínas 7S (SATHE, 2002).

Além de apresentar teor proteico relativamente alto, carboidratos complexos, fibra alimentar e vitaminas do complexo B, o feijão também contém polifenóis, principalmente na região do tegumento, que apresentam capacidade antioxidante (SILVA; ROCHA; CANNIATI-BRAZZACA, 2009).

2.2. Enzimas

As enzimas são um grupo de substâncias orgânicas que atuam como catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações químicas. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas. As enzimas apresentam elevado potencial catalítico, alto grau de especificidade para seus substratos e aceleram reações químicas de maneira bastante eficiente e atuam em soluções aquosas sob condições moderadas de temperatura e pH (LEHNINGER, 1995).

De acordo com o sistema internacional (Enzyme Commission, EC) de nomenclatura e classificação de enzimas, cada enzima recebe um número classificatório (número EC) composto por quatro dígitos separados por pontos (IUBMB, 1992). O primeiro dígito indica a classe de acordo com as reações que catalisam: 1. Oxirredutases (reações de oxido-redução), 2. Transferases (reações de transferência

de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc.), 3. Hidrolases (reações de hidrólise de ligação covalente), 4. Liases (reações de eliminação e adição de grupos, formando ou desfazendo ligações duplas), 5. Isomerases (reações de isomerização), e 6. Ligases (catálise da ligação de duas moléculas com hidrólise simultânea de ATP). O segundo e terceiro dígito (subclasse e sub-subclasse, respectivamente) indicam diferentes situações, dependendo da classe em que se encontram. O quarto dígito é o número de série da enzima em sua sub-subclasse (REED, 1975).

As enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases pertencem aos grupos das hidrolases. Esse grupo tem em comum o envolvimento da água para a formação do produto. As proteases rompem as ligações peptídicas das proteínas levando à formação de grupos amina e carboxila, originando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres (Figura 1) (BARRETT et al., 2001). Essas enzimas pertencem a classe 3 e subclasse 4 (EC 3.4 peptídeo hidrolase). As proteases ainda são divididas em dois grupos de enzimas: as endoproteinases (EC 3.4. 21-29), que clivam ligações peptídicas no interior da cadeia proteica, e as exoproteinases (EC 3.4. 11-19), cuja ação está dirigida aos aminoácidos terminais da cadeia polipeptídica (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

A maior parte das proteases são específicas, ou seja, não hidrolisam a molécula de proteína em qualquer ligação peptídica, mas apenas ligações entre aminoácidos específicos. Se essas ligações forem abundantes na proteína, pode-se esperar que haverá um alto grau de hidrólise dessa proteína. Também existem as proteases não específicas, que podem hidrolisar a proteína em vários fragmentos da molécula.

Uma vez que são fisiologicamente necessárias para organismos vivos, as proteases são ubíquas, sendo encontradas numa ampla diversidade de fontes como plantas, animais e micro-organismos (AGYEI; DONQUAH, 2011). Algumas proteases originárias de plantas são papaína, bromelina, queratinase e ficina. As proteases de origem animal geralmente são advindas de suínos e bovinos. As principais proteases de origem animal são tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina e quimosina. As proteases de origem microbiana representam a principal fonte das proteases

comercializadas. Esse fato deve-se a facilidade de cultivo ao rápido crescimento dos micro-organismos, ampla diversidade bioquímica das enzimas produzidas, pequeno espaço requerido para seu cultivo e baixo custo (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

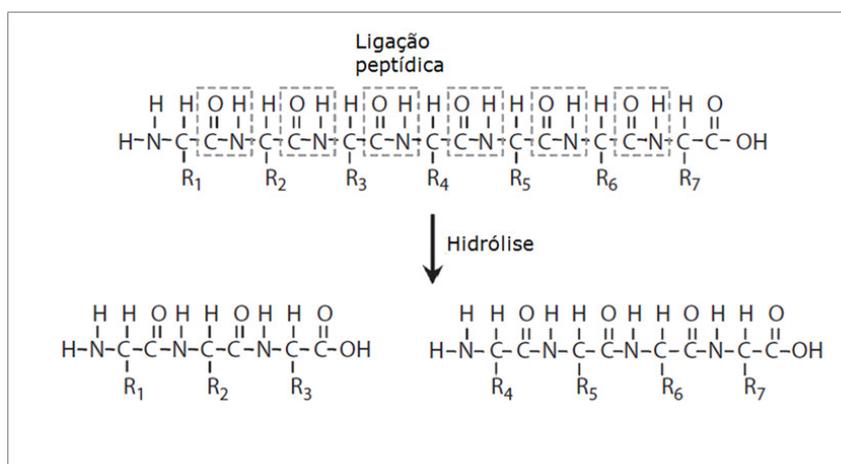


Figura 1. Processo de hidrólise: Rompimento da ligação peptídica

Fonte: Hettiarachchy (2012)

Além da importância biológica, as enzimas proteolíticas representam um importante grupo de enzimas utilizadas industrialmente. Elas têm uma ampla faixa de aplicações biotecnológicas como a produção de alimentos, detergentes, couro, hidrolisados proteicos e fármacos (AL-SHEHRI et al., 2004). Do ponto de vista tecnológico, as endopeptidases são as mais utilizadas nos processamentos de alimentos, e em alguns casos sua ação é complementada com exopeptidases.

O pH e a temperatura são os fatores que mais influenciam na atividade enzimática. As enzimas são sensíveis à concentração de H^+ do meio, existindo uma zona de pH em que a atividade enzimática é máxima. Isso acontece, pois como outras proteínas, as enzimas possuem nos resíduos de aminoácidos da molécula grupos ionizáveis, de forma que as alternâncias de pH podem mudar sua conformação, sua capacidade de ligação com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo (HARTMEIER; ANANTHANARAYAN, 2008). A temperatura também deve ser mantida de acordo com a especificidade da enzima pois o calor resulta no aumento

das colisões entre substrato e enzima e pode provocar a desnaturação da enzima (ILLANES et al., 2008).

As características das enzimas em relação ao pH e a temperatura variam bastante. Valores de pH e temperatura ótimos de algumas proteases aplicadas em proteínas alimentares estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1. Temperatura e pH ótimos de enzimas comerciais aplicadas a hidrólises enzimáticas de proteínas alimentares

Nome	Procedência	pH	Temperatura (°C)
	Proteases animais		
Pancreatina	Pâncreas	7,0-9,0	36-40
Pepsina	Estômago	2,0-4,0	36-40
Quimiotripsina	Pâncreas	7,0-9,0	36-40
Tripsina	Pâncreas	7,0-9,0	36-40
Proteases vegetais			
Bromelina	<i>Ananas bracteatus</i>	5,0-8,0	50-60
Ficina	<i>Ficus spp.</i>	5,0-8,0	30-50
Papaína	<i>Carica papaya</i>	5,0-7,0	65-80
Proteases bacterianas			
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	6,5-8,5	50-60
Neutrase	<i>Bacillus subtilis</i>	5,5-7,5	45-55
Pronase	<i>Streptomyces griseus</i>	7,0-9,0	37-40

Fonte: Adaptado Diniz; Martin (1997)

Entre as enzimas utilizadas para a hidrólise de proteínas estão a Alcalase e a pepsina. A Alcalase é uma endoprotease do tipo serina produzida por uma cepa seleta de *Bacillus licheniformis*. Essa enzima cliva primariamente ligações peptídicas onde o lado carboxílico contém resíduos hidrofóbicos como leucina, tirosina e valina (ADAMSON; REINOLDS, 1996). Esta enzima possui larga especificidade na clivagem de ligações peptídicas existentes entre glicina e histidina; serina e histidina; leucina e tirosina e tirosina e triptofano.

A pepsina é uma endoprotease e exhibe clivagem preferencial para os resíduos aromáticos. O aumento da susceptibilidade à hidrólise ocorre se houver um aminoácido

contendo enxofre, perto da ligação peptídica, que possui um aminoácido aromático. A pepsina também cliva preferencialmente na extremidade carboxila da fenilalanina e leucina e, em menor extensão na extremidade carboxila dos resíduos de ácido glutâmico. A pepsina não irá clivar ligações em valina, alanina, glicina (SIGMA ALDRICH, 2014).

2.3. Hidrólise proteica

A hidrólise proteica consiste no rompimento das ligações peptídicas das proteínas, liberando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres, sendo catalisada por ácidos, bases ou enzimas. A hidrólise química é um processo de difícil controle, originando produtos com reduzida qualidade nutricional, pois no processo existe perda de aminoácidos essenciais (SINHA et al., 2007). O processo enzimático de hidrólise apresenta vantagens sobre os métodos químicos, como a especificidade, o controle do grau de hidrólise e o menor conteúdo de sal no hidrolisado final. O fato de que as enzimas possam ser empregadas, na maioria das vezes, em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema da reação é frequentemente desnecessária e mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser usados em concentrações maiores (BIASUTTI et al., 2007).

Um dos parâmetros básicos usados para descrever a extensão da hidrólise de proteínas é o grau de hidrólise (GH). O grau de hidrólise representa a porcentagem de ligações peptídicas clivadas durante a reação. Existem vários métodos para determinar o GH sendo que o mais utilizado destes inclui o método do ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). A análise baseia-se na reação dos grupos amino N-terminal da proteína com o TNBS 0,1%. O reagente TNBS tem especificidade de reação com grupos amino primários, resultando em um trinitrofenil (TNP)-derivado de coloração amarela, que é determinado espectrofotometricamente a 346nm (ADLER-NISSEN, 2002). A Figura 2 mostra um exemplo da reação do ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) com os aminoácidos.

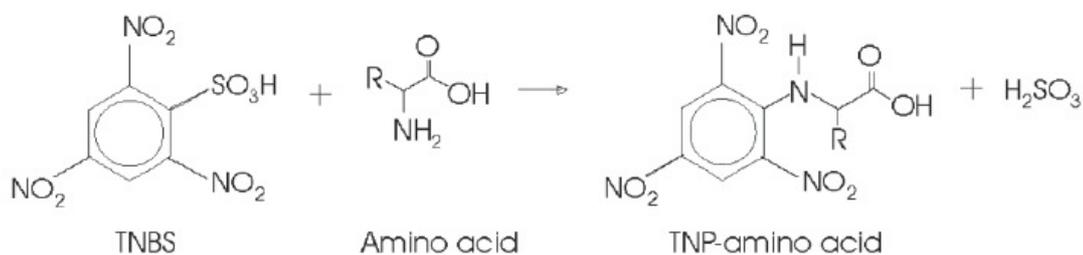


Figura 2. Reação do ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) com os aminoácidos

Alguns autores relacionam um baixo grau de hidrólise das proteínas com uma melhora nas propriedades funcionais das proteínas (AVRAMENKO; LOW; NICKERSON, 2013, ALASHI et al., 2014, YUST et al., 2010). Em relação às propriedades biotivas das proteínas, o grau de hidrólise parece não estar intimamente associado a esse fator, mas sim ligada com a natureza e a composição aminoacídica dos peptídeos gerados durante a hidrólise (Alashi et al., 2014).

2.5. Propriedades nutricionais de hidrolisados proteicos

Os hidrolisados proteicos têm sido utilizados no preparo de alimentos com alta digestibilidade proteica e com a presença de grupos seletos de aminoácidos. Esses alimentos são fundamentais para pessoas que apresentam doenças crônicas que dificultam a absorção das proteínas na sua forma nativa – doenças de Crohn e Síndrome do intestino curto, por exemplo – ou que impossibilitam o consumo de aminoácidos específicos – como exemplo a Fenilcetonúria, as alergias e intolerâncias alimentares (PACHECO et al., 2005). Outro campo de aplicação dos hidrolisados proteicos é a nutrição esportiva, especialmente em exercícios de resistência e musculação, pois os aminoácidos e peptídeos são precursores da síntese proteica exercendo assim um papel fundamental na recuperação mais rápida pós-treino e promovendo uma melhora na performance do atleta.

No entanto, os alimentos disponíveis no mercado visam fornecer tradicionalmente as proteínas como fonte de energia e aminoácidos essenciais

necessários para manutenção das funções fisiológicas do organismo. Recentemente, estudos com peptídeos obtidos pela hidrólise enzimática de proteínas extraídas de diferentes fontes alimentares, além do seu valor nutritivo, têm demonstrado claramente efeitos benéficos a saúde humana. Dentre estes efeitos, estão: atividade anti-hipertensiva, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, atividade anticarcinogênica e atuação no controle do metabolismo lipídico (ROY; BOYE; SIMPSON, 2010). As propriedades bioativas dos peptídeos variam de acordo com (1) a sequência de aminoácidos; (2) o tamanho molecular dos hidrolisados; e (3) os grupos residuais das cadeias laterais dos aminoácidos (ZHAO et al., 2011).

As pesquisas recentes têm centrado na produção de hidrolisados proteicos de origem animal e vegetal (ALASHI et al., 2014; ONUH et al., 2014; AHN et al., 2012; ZHAO et al., 2012; FRITZ et al., 2011). As fontes animais mais utilizados são as proteínas a partir de soro de leite, proteína de pescado, músculo de frango, proteínas de moluscos e ovos. As principais fontes de proteínas vegetais são proteínas de sementes de leguminosas, como feijão, soja, ervilha, e grão de bico, oleaginosas como a canola e derivados de culturas de cereais, tais como arroz, cevada e milho (Quadro 1).

Estes estudos envolvem enzimas comerciais (Alcalase, Flavourzyme, pepsina, pancreatina, tripsina, quimiotripsina, neutrase, etc.) em diferentes tempos de hidrólise e proporções de enzima/substrato sob condições ótimas de pH e temperatura para cada enzima específica. Tais condições de preparo do hidrolisado irão propiciar diferentes graus de hidrólise. A especificidade da enzima é um fator chave na hidrólise, pois afeta o número e a localização das ligações peptídicas que estão sendo hidrolisadas, produzindo assim hidrolisados com diferentes peptídeos que terão diferentes propriedades biológicas e funcionais (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010).

Quadro 1. Condições de hidrólise e atividade biológica de hidrolisados proteicos de diferentes fontes alimentares

Fonte	Condições de Hidrólise		Purificação	Atividade	Referências
	Enzimas	Tempo (h)			
Arroz	Alcalase, flavourzyme, neutrase, protamex	4	–	Antioxidante	Zhao et al. (2012)
Amaranto	Alcalase, papaina, pronase, Quimiotripsina, tripsina	4	–	Anti-hipertensivo	Fritz et al. (2011)
Amendoim	Alcalase	0,5; 2; 6 e 22	–	Antioxidante, anti-hipertensivo	Jamdar et al. (2010)
Canola	Alcalase, pepsina, pancreatina, quimiotripsina, tripsina	4	Ultrafiltração	Antioxidante	Alashi et al. (2014)
Cevada	Alcalase, flavourzyme	0;5, 1; 1,5; 2; 3 e 4	Ultrafiltração	Antioxidante	Xia et al. (2012)
Soja germinada	Mix de pancreática, pepsina, peptidase intestinal	1 - 2 - 1 (total = 4 horas)	Ultrafiltração	Anticarcinogênico	Robles-Ramirez et al. (2012)
Frango	Alcalase, pepsina + pancreatina	4; 2 - 4	Ultrafiltração	Antioxidante	Onuh et al. (2014)
Salmão	Alcalase, flavourzyme, neutrase, protamex, pepsina e tripsina	8	HPSEC	Anti-inflamatório	Ahn et al. (2012)
Microalga Spirulina Maxima	Pepsina, quimiotripsina + tripsina	4- 4	Ultrafiltração	Anti-inflamatório	Vo et al. (2013)
Molusco (<i>C. fluminea Muller</i>)	Protamex	5	–	Hipocolesterolêmico	Lin et al. (2010)

Continuação quadro 1.

Grão de bico	Pepsina	24	Cromatografia por troca iônica, ultrafiltração	Antioxidante	Arcan e Yemenicioglu (2010)
Soro de leite	Alcalase, corolase PP, flavourzyme, neutrase	4	Ultrafiltração	Antioxidante	O’Keeffe e FitzGerald (2014)
Feijão Azufrado	Alcalase, termolisina, pancreática	2	–	Antioxidante, anti-hipertensivo	Ortiz-Valdez et al. (2012)
Feijão comum	Pepsina+pancreatina	1,5-1,5 (total = 3 h)	–	Anticarcinogênico	Vital et al. (2014)
Nozes	Alcalase, neutrase, pepsina	0,5; 1; 2; 3 e 4	--	Antioxidante	Chen et al. (2012)
Girassol	Pepsina, pancreática	3 - 3	RP-HPLC	Antioxidante	Megias et al. (2009)
Milho	Protease, protease alcalina, protease neutra	6	Ultrafiltração	Antioxidante	Zhou et al. (2012)
Ervilha	Termolisina	3	RP-HPLC	Antioxidante	Pownall et al. (2010)
Albumina	Alcalase	3	–	Antidiabético	Yu et al. (2007)
Batata doce	Alcalase	2	RP-HPLC	Antioxidante	Zhang et al. (2014)

HPSEC – Cromatografia de exclusão de tamanho; RP-HPLC –Cromatografia líquida de fase reversa

Algumas vantagens são relatadas para a utilização de métodos enzimáticos na modificação de proteínas. Dentre elas, a melhor aceitação do consumidor, uma vez que o consumidor considera o tratamento enzimático mais seguro do que os tratamentos químicos. Outra vantagem são condições mais brandas de processamento por tratamento enzimático comparado aos tratamentos químicos, as quais geram menos subprodutos tóxicos (GUAN et al., 2007). Além disso, a hidrólise enzimática também é relatada como um tratamento benéfico na remoção de fatores antinutricionais (MOURE et al., 2006).

2.6. Atividade antioxidante de hidrolisados proteicos

Os antioxidantes são benéficos à saúde humana, pois protegem o organismo contra a ação dos radicais livres. Os radicais livres são fisiologicamente produzidos e exercem funções de sinalização celular e de defesa do organismo contra infecções. No entanto, certas circunstâncias endógenas e/ou exógenas podem levar a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as quais exercem efeitos deletérios ao oxidar moléculas biologicamente essenciais, tais como lipídios, proteínas, carboidratos e DNA. Isso resulta no chamado estresse oxidativo, que por sua vez é precursor de doenças crônicas e degenerativas, como artrite, arteriosclerose, Alzheimer, câncer e diabetes (JAMDAR et al., 2010). Além do papel fisiológico, os antioxidantes previnem os alimentos da oxidação lipídica, aumentando a conservabilidade do produto alimentar (ONUH et al., 2013).

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida de forma precisa e quantitativamente. Dentre os métodos para avaliar a atividade antioxidante in vitro mais comumente utilizados estão os ensaios que se baseiam na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. Incluem métodos como: ABTS^{•+} (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-acidosulfônico)), que consiste em monitorar o decaimento do cátion-radical ABTS^{•+} produzido pela oxidação do mesmo quando a amostra contendo antioxidante é adicionada; DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), que é baseado na capacidade do radical livre DPPH reagir com

doadores de hidrogênio; e a avaliação do poder redutor, onde a atividade antioxidante é avaliada pela redução do Fe^{3+} presente no ferrocianeto de potássio a Fe^{2+} . Com a redução, forma-se um complexo azul conhecido como azul Prússia (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

O método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio), consiste na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas, como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer dano oxidativo. Utiliza como molécula alvo dos radicais livres de oxigênio as ficobiliproteínas β -ficoeritrinas ou R-ficoeritrina altamente fluorescentes, que contêm um pigmento vermelho fotorreceptor. Esse método possui uma vantagem muito importante com relação aos outros métodos de determinação da capacidade antioxidante que usam a absorvância, que é o uso da fluorescência como medida do dano oxidativo, pois, assim, ocorre menor interferência dos compostos coloridos presentes nas amostras. Um método bastante utilizado para avaliar a oxidação de moléculas lipídicas e o TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico). A oxidação dos ácidos graxos insaturados leva à formação, dentre outros compostos, do malonaldeído, que é capaz de reagir com o ácido tiobarbitúrico e formar um pigmento rosado, que apresenta um máximo de absorção a 532-535 nm (MCDONALD-WICKS; WOOD; GARG; 2006).

Estudos *in vitro* mostraram que hidrolisados proteicos são capazes de eliminar os radicais livres DPPH e $\text{ABTS}^{\bullet+}$, além de apresentarem maior atividade quelante com íons metálicos e maior capacidade inibitória da oxidação lipídica do que proteína nativa, não hidrolisada (XIA et al., 2012). Entretanto, o mecanismo exato de eliminação de radicais livres não está completamente elucidado. Segundo alguns estudos (CHEN et al., 2007; MEGIAS et al., 2009; POWNALL et al., 2010), fatores que podem estar relacionados com a atividade antioxidante de proteínas são a constituição de aminoácidos do peptídeo gerado, a presença de aminoácidos hidrofóbicos e a distribuição do peso molecular.

De acordo com Zavareze et al. (2014), a atividade antioxidante das proteínas é dependente da sua constituição, principalmente relacionada a presença dos aminoácidos tirosina, triptofano, metionina, lisina, cisteína, e histidina, que podem atuar como potentes antioxidantes devido a sua capacidade de participar de reações

de transferência de elétrons. A presença de enxofre nos resíduos de cisteína e metionina está relacionada a capacidade antioxidante destes aminoácidos (ELIAS; SARAH; ERIC; 2008). Os aminoácidos básicos e ácidos têm habilidade para se ligar a íons metálicos que são responsáveis pelo início da oxidação lipídica em alimentos (JÊ, PARK, KIM, 2005; RAJAPASKE et al., 2005).

A clivagem de ligações peptídicas no processo de hidrólise altera a conformação da proteína, podendo aumentar ou reduzir a hidrofobicidade (LIU et al., 2008). Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, como valina, leucina e glicina, contribuem para o aumento da solubilidade dos peptídeos em lipídeos, facilitando, assim, a interação com os radicais livres e a inibição da peroxidação lipídica (RANATHUNGA et al., 2006). Xia et al. (2012) utilizaram a enzima Alcalase para obtenção de hidrolisados proteicos da fração glutelina de cevada. Após a separação por cromatografia de fase reversa, peptídeos com maior hidrofobicidade apresentaram maior capacidade de se ligar a radicais hidroxilas e maior atividade quelante de íons Fe^{+2} , com valores máximos de 70% e 93%, respectivamente, numa concentração de 1 g.L^{-1} . Esses autores verificaram que os aminoácidos hidrofóbicos prolina, fenilalanina, leucina, isoleucina e valina constituíam 50 a 67% dos resíduos totais presentes na fração com maior atividade antioxidante.

A atividade antioxidante dos peptídeos também pode estar relacionada a distribuição da peso molecular (PEÑA-RAMOS; XIONG, 2002; XIA et al., 2012). Em estudo realizado com canola, ALASHI et al., (2014) fracionaram o hidrolisado proteico de acordo com o peso molecular através de filtração por membrana (<1kDa, 1-3kDa, 3-5kDa e 5-10kDa) e verificaram variação na atividade antioxidante de acordo com a fração do hidrolisado. Carrasco-Castilla et al. (2012) estudaram a atividade antioxidante pelos métodos $ABTS^{\bullet+}$, poder redutor e atividade quelante de íons Fe^{+2} e Cu^{+2} de hidrolisados proteicos de feijão obtidos pela ação em conjunto das enzimas pepsina e pancreatina. Os autores fracionaram as proteínas e obtiveram valores elevados de atividade antioxidante in vitro ($ABTS^{\bullet+}$, atividade quelante de íons Fe^{+2} e Cu^{+2}) para a fração menor que <1kDa, particularmente devido a presença do aminoácido hidrofóbico fenilalanina. As frações >1kDa, mostraram maior atividade antioxidante na análise de poder redutor.

2.7. Propriedades funcionais de concentrados e hidrolisados proteicos

As propriedades funcionais das proteínas são definidas como as propriedades físico-químicas que afetam o processamento e o comportamento das proteínas em sistemas alimentares. Essas propriedades contribuem para a qualidade e atributos do produto final (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010). Segundo Araújo (2006), a composição e distribuição de aminoácidos, a relação hidrofobicidade/hidrofilicidade, a estrutura tridimensional e a flexibilidade influenciam na funcionalidade das proteínas nos alimentos.

A hidrólise enzimática de proteínas vem sendo aplicada visando melhorar as propriedades funcionais da proteína nativa, sem causar prejuízo para o seu valor nutritivo (CLEMENTE, 2000). Os hidrolisados proteicos têm uma ampla gama de aplicações que variam de ingredientes na preparação de alimentos formulados, fonte de nitrogênio na preparação de dietas adequadas para produtos enterais para hospitais, fórmulas infantis hipoalergênicas, alimentos dietéticos e bebidas esportivas.

A fonte proteica, o tempo de reação e a especificidade da enzima utilizada no processo de hidrólise, são os fatores que determinam que cada proteína tenha sua particularidade quanto a funcionalidade. As características funcionais de uma proteína hidrolisada refletem nas interações entre a composição de aminoácidos, a conformação estrutural, bem como a sua interação com outros compostos alimentares e o sistema em que está inserida (SANTOS et al., 2009). Segundo Yu; Ahmedna; Goktepe (2007), conhecer essas propriedades é de extrema importância à indústria para o processamento e formulação dos alimentos. No Quadro 2 estão descritas algumas propriedades funcionais desempenhadas pelas proteínas em sistemas alimentares.

Quadro 2. Propriedades funcionais desempenhadas pelas proteínas em sistemas alimentares.

Propriedade Funcional	Modo de ação	Aplicação em sistemas alimentares
Solubilidade	Solvatação de proteínas	Bebidas, sopas, formulações alimentares
Absorção de água	Ligações de hidrogênio	Carnes, produtos de panificação
Viscosidade	Espessamento, pontes de hidrogênio	Sopas, molhos para carnes, saladas
Absorção de óleo	Interação com o lipídeo	Carnes, embutidos, biscoitos
Adesividade	Proteínas agem como adesivos	Carnes, produtos assados, massas
Emulsificação	Redução da interface Gordura-agua	Embutidos, sorvetes, bolos, cookies
Formação de espuma	Formação de filme, aprisionamento de gás	Coberturas cremosas, shakes de proteínas, sorvetes

Fonte: Hettiarachchy (2012)

2.7.1. Absorção de óleo (CAO)

A capacidade de absorção de óleo representa a capacidade das proteínas para interagir com materiais lipídicos na formulação e processamento de alimentos, uma vez que muitas propriedades dos alimentos envolvem a interação de proteínas e líquidos, por exemplo, absorção e retenção do *flavor*. Além disso, essa interação das proteínas com os lipídeos reduz a taxa de rancidez oxidativa o que permite melhor estabilização de produtos alimentares ricos em gorduras (YUST et al., 2010). Uma elevada CAO é desejada para a formulação de produtos emulsionados, massas de bolos, maionese e embutidos (CHANDI; SOGI, 2006), contribuindo para a palatabilidade e retenção de sabor destes produtos (RODRIGUEZ-AMBRIZ et al., 2005).

Embora não tenha sido totalmente esclarecido, o mecanismo envolvido na interação proteína-óleo parece ser puramente físico, relacionado com as cadeias de aminoácidos hidrofóbicos existentes na molécula proteica que podem se ligar às

cadeias laterais hidrocarbônicas do óleo (AIDER; BARBANA, 2011). Os concentrados de proteínas de lentilhas, grão de bico, feijão branco e feijão preto exibiram absorção de óleo na faixa de 1,2 a 2,5 mL.g⁻¹. As proteínas de soja e de ervilha apresentaram menores valores entre 0,8 a 1,2 g mL.g⁻¹, respectivamente (MOURE et al., 2006).

Mundi e Aluko (2012), estudaram a capacidade de absorção de óleo das frações albuminas e globulinas de feijão vermelho e obtiveram resultados de 2,37 e 1,87 mL.g⁻¹ respectivamente. Esses autores relacionam os menores valores de absorção de óleo para a fração globulina devido a estrutura mais globular, a qual limita as interações com o lipídeo quando comparadas a estrutura da albumina que mais aberta.

Um estudo realizado com hidrolisados proteicos de grão de bico obtidos pela ação da enzima Alcalase, mostraram resultados superiores em relação ao concentrado proteico para todos os tempos de hidrolises enzimática analisados. Os valores encontrados foram de 3,08 mL.g⁻¹ para o concentrado proteico e de 5,89 mL.g⁻¹ para a proteína hidrolisada (MOURE et al., 2006).

Alguns resultados semelhantes foram obtidos por Vioque et al. (2000) ao hidrolisar proteínas de canola com alcalase. Os mesmos autores atribuíram os resultados ao fato de que a hidrólise de proteínas expõe as cadeias laterais apolares que interagem com os hidrocarbonetos do lipídeo, contribuindo para aumentar a absorção de óleo.

2.7.2. Emulsificante

A emulsão é a mistura entre dois líquidos imiscíveis em que um deles (a fase dispersa) encontra-se na forma de glóbulos dispersos no outro líquido (a fase contínua), formando uma mistura estável (ORDÓÑES, 2005). Em alimentos, geralmente as emulsões apresentam duas fases: óleo e água. Se a água for à fase contínua e o óleo a fase dispersa, a emulsão é do tipo óleo em água (O/A), por exemplo, o leite. No caso inverso, a emulsão é do tipo água em óleo (A/O), um exemplo é a manteiga. As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e

para manter as gotículas dispersas na fase contínua requer o uso de agentes emulsificantes (PAL, 2011).

As proteínas apresentam papel importante na melhoria das propriedades emulsificantes de diversos alimentos industrializados, como maioneses, patês, embutidos, chocolates e sorvetes. Uma das principais características que permitem que as proteínas sejam capazes de melhorar as propriedades funcionais dos alimentos é a presença de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas na mesma molécula. A presença dessas regiões é responsável pela propriedade emulsificante das proteínas, visto que as zonas hidrofóbicas e hidrofílicas são capazes de reduzir uma tensão superficial e interagirem na interface da emulsão (FOEGEDING; DAVIS, 2011).

Makri e Doxastakis (2006) estudaram a estabilidade de emulsões contendo 1, 2 e 3% de concentrado proteico de feijão preto, em pH 5,5 e 7,0. Após o período de 10 dias de armazenamento, todas as emulsões apresentavam o processo de floculação. As emulsões em pH 7,0 contendo 2 e 3% de proteínas foram mais estáveis e os autores relacionam ao fato dessas emulsões apresentarem um menor tamanho médio das gotas na fase contínua da emulsão.

Recentemente, pesquisadores têm investigado os efeitos da hidrólise enzimática sobre as propriedades funcionais e nutricionais de proteínas vegetais (JAMDAR et al., 2010, ZHAO et al., 2011, AVRAMENKO; LOW E NICKERSON, 2013). Supostamente, esses efeitos estão relacionados à modificação da conformação e estrutura nativa da proteína, sendo associados à diminuição do peso molecular, aumento dos grupamentos ionizáveis e à exposição de grupos hidrofóbicos, até então ocultos na estrutura enovelada das proteínas (ZHAO et al., 2011). Avramenko; Low e Nickerson, (2013) avaliaram as propriedades emulsificantes de hidrolisados proteicos de lentilha obtidos pela ação da enzima tripsina. Segundo esses autores, os hidrolisados proteicos obtiveram melhor capacidade emulsificante e maior estabilidade de emulsão do que o tratamento controle (isolado proteico de lentilha).

2.7.2.1. Mecanismo de desestabilização das emulsões

A estabilidade de emulsão refere-se a capacidade da emulsão em resistir as mudanças físico-químicas ao longo do tempo (MCCLEMENRS, 2007). Os principais tipos de mecanismos envolvidos no processo de desestabilização estão apresentado na Figura 3. Os processos que levam a desestabilização das emulsões podem acontecer simultaneamente ou consecutivamente.

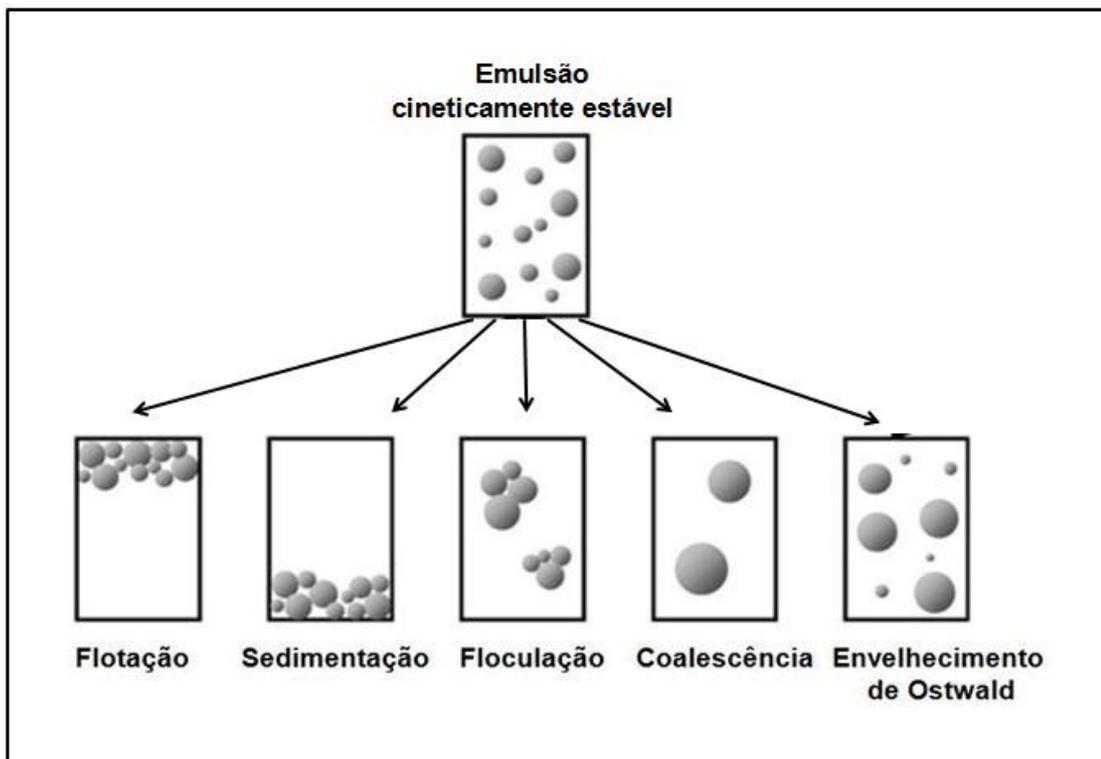


Figura 3. Mecanismo de desestabilização das emulsões

Fonte: MCCLEMENRS (2007).

Na flotação e sedimentação as gotas dispersas têm densidades diferentes da fase dispersante e por isso, pode haver a separação das fases devido à força da gravidade. A flotação é o processo em que as gotas se movem para região superior devido a menor densidade do que a fase contínua. Por outro lado, a sedimentação acontece quando as gotas tem maior densidade do que a fase contínua. Nesses dois processos por separação gravitacional não ocorre perda nas características

individuais das gotas. A taxa de flotação/sedimentação depende das características físicas do sistema (MCCLEMENRS, 2007).

A floculação é um processo em que duas ou mais gotas se aproximam ficando separadas por uma camada finíssima da fase contínua. Esse mecanismo acontece devido a supressão das cargas elétricas e inibição das repulsões eletrostáticas (ORDOÑES, 2005). Tendo em vista a formação de agregados no processo de floculação, isso poderá contribuir para o aumento na velocidade de sedimentação. Na floculação não há ruptura da película interfacial que envolve o gotas, mas é um processo que antecede a coalescência e a ruptura do sistema (MCCLEMENRS, 2007).

A coalescência é o processo em que ocorre o enfraquecimento e ruptura da película interfacial que envolve as gotas. Dessa maneira duas ou mais gotas se juntam formando uma única gota maior, podendo chegar a separação das fases em duas camadas por uma interface de superfície mínima. Embora a coalescência resulte em mudanças significativas microscópicas na fase dispersa, a separação visual, macroscópica pode não ser imediata. Nesse fenômeno as propriedades físicas e químicas da emulsão são alteradas (LAM; NICKERSON, 2013).

O processo de “envelhecimento” das partículas em suspensão pode conduzir ao crescimento das gotas maiores, as custas das menores pelo processo de difusão, devido a transferência de massa. Dessa maneira, as gotas menores, que possuem maior solubilidade tendem a se dissolver durante o período de armazenamento e a se depositarem nas gotas maiores que crescem gradativamente (TADROS, 2004).

2.8. Técnicas para estudo da estrutura e da conformação das proteínas

2.8.1. Eletroforese

A eletroforese é uma das análises mais utilizadas para avaliar o peso molecular das proteínas. A separação de proteínas tornou-se possível com o desenvolvimento da eletroforese em gel de poliacrilamida ou PAGE (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), em que é adicionado a amostra o detergente *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS), sendo a técnica habitualmente conhecida por SDS-PAGE.

Com esta técnica (SDS-PAGE) as amostras são desnaturadas pelo calor na presença de reagentes desnaturantes como o beta-mercaptoetanol, que destrói as ligações dissulfeto das proteínas, e o detergente SDS. O SDS, fortemente negativo, rodeia as cadeias proteicas, desnaturando-as e cobrindo a proteína com cargas negativas. Deste modo, a carga intrínseca à proteína, que é variável em função dos aminoácidos que a constituem é “mascarada” pelo detergente, tornando-se a razão carga/massa constante.

Em razão das proteínas serem substâncias anfóteras, ou seja, capazes de adquirirem carga positiva ou negativa em função do pH, também é indispensável manter constante o pH do meio durante a eletroforese, pelo uso de soluções-tampão. Assim, é possível que as proteínas, agora carregadas negativamente, sejam separadas em função do seu tamanho molecular. A técnica consiste na migração de moléculas ionizadas pelo gel de poliacrilamina quando aplica-se um campo elétrico.

O gel de poliacrilamida, entre outros reagentes, é constituído de uma mistura de dois polímeros: acrilamida e bis-acrilamida. A acrilamida é uma molécula linear enquanto a bis acrilamida apresenta-se em forma de “T”. Misturando-se estes dois polímeros, obtém uma matriz de gel poroso, similar a uma “rede” com uma malha mais ou menos apertada. Em uma determinada voltagem (V), corrente (I) e potência (w) constantes, as proteínas carregadas negativamente irão migrar para o pólo positivo. Essa migração depende do tamanho molecular, cada proteína migra de forma diferenciada ao longo do gel. As proteínas com menor tamanho molecular terão mais facilidade em atravessar a “rede” do gel, movendo-se mais rapidamente.

No tempo determinado para análise, espera-se que cada molécula se concentre numa estreita faixa (banda) no gel correspondendo a sua massa molar. Após as proteínas são fixadas ao “gel” e coradas com o Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue). Inicialmente, tanto as proteínas como o gel ficam corados, mas com o passo de descoloração, o corante é quase completamente removido do gel de poliacrilamida, permanecendo apenas ligado às bandas correspondentes às diferentes proteínas. As bandas de proteínas são comparadas a migração de um padrão de moléculas com tamanho molecular conhecido. Dessa

maneira, é possível determinar o tamanho molecular das proteínas em estudo (LAEMMLI, 1970).

2.8.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é uma técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à amostra e a um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura (CHRONAKIS, 1996). Na análise térmica por DSC, efetua-se um varrimento de temperatura numa cápsula de referência e em uma cápsula contendo amostra e simultaneamente, o calor adicionado à amostra, em relação à referência, é medido. Quando uma amostra sofre algum tipo de mudança de estado físico ou químico induzido termicamente ocorre à liberação ou absorção de calor e assim é registrado na forma de um pico no termograma. Os ensaios fornecem informações qualitativas e quantitativas em função do tempo e temperatura, considerando as transições em materiais que envolvem processos endotérmicos e exotérmicos. A técnica aplica-se a diferentes materiais incluindo polímeros, produtos farmacêuticos e alimentos (WAGNER e AÑON, 1990).

A calorimetria diferencial de varredura foi utilizada para estudar o processo de desnaturação de proteínas de soja, nomeadamente para avaliar o efeito de fatores externos nas temperaturas de desnaturação, como por exemplo, força iônica (WAGNER et al., 1992; CHRONAKIS, 1996); temperatura (SORGENTINI et al., 1995), concentração proteica (WAGNER et al., 1992), pH (CHRONAKIS, 1996) e/ou o efeito de diferentes processamentos, nomeadamente, pressão hidrostática, hidrólise enzimática e métodos de extração distintos (WAGNER et al., 1992). Kimura, et al (2008) estudaram as propriedades físico-químicas e funcionais das frações glubulinas 7s e 11 s de ervilha, fava, feijão caupi e feijão francês e comparou com as mesmas frações de proteína de soja. Os autores verificaram que as frações 7s dos grãos analisados apresentaram temperatura superior que a mesma fração do concentrado proteico de soja. Enquanto que, a fração 11s da proteína de fava, ervilha apresentaram temperatura de desnaturação inferior que a mesma fração da proteína de soja.

2.8.3. Espectroscopia de fluorescência

As proteínas são capazes de emitir fluorescência quando expostas a luz ultravioleta. Este processo ocorre pela capacidade das moléculas absorver energia e atingir seu estado excitado e ao tornarem ao estado basal são capazes de emitir luz (PAIN, 2003). Este sinal de fluorescência torna-se este método útil para a obtenção de informações sobre as estruturas de proteínas. A emissão da fluorescência de uma proteína pode revelar a exposição de aminoácidos hidrofóbicos das cadeias laterais. Os aminoácidos como fenilalanina, tirosina e triptofano possuem naturalmente fluorescência intrínseca. Esses aminoácidos quando expostos a luz ultravioleta emitem luz (KELLY; PRICE, 2006). Entretanto, se a proteína não contém grandes quantidades de aminoácidos aromáticos intrínsecos ou se houve o rompimento da ligação peptídica que expôs os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, se utiliza corantes fluorescentes para se obter a fluorescência relativa dessas proteínas. O reagente ácido-anilinoftaleno-1-sulfônico (ANS) é o mais utilizado para estudar as alterações conformacionais das proteínas. Esse reagente é capaz de se ligar às regiões hidrofóbicas na superfície das proteínas e emitir luz (KELLY; PRICE, 2006) que é quantificada por espectrofluorometria.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Foram utilizados grãos de feijão preto obtido no comércio local da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Os grãos apresentaram peso de mil grãos de $256,2 \pm 0,1$ g e a seguinte composição química: proteínas $23,1 \pm 0,1\%$, lipídeos $1,2 \pm 0,0\%$, cinzas $4,3 \pm 0,1\%$, amido $48,6\%$ e fibras $22,8 \pm 0,9\%$. Todos os reagentes utilizados apresentavam padrão analítico ou superior. As enzimas pepsina (≥ 400 U/mg) e Alcalase® CLEA (≥ 5 U/g) e foram obtidas da Sigma Aldrich.

3.2. Métodos

3.2.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental encontra-se na Tabela 2. No trabalho foram avaliadas as propriedades físico-químicas, funcionais e térmicas, além da atividade antioxidante do concentrado proteico de feijão preto (CPFP) e dos hidrolisados proteicos de feijão em função da enzima utilizada na hidrólise e do tempo de reação.

Tabela 2. Delineamento experimental para avaliar as propriedades físico-químicas, funcionais e térmicas e atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de feijão preto.

Tratamento	Variáveis independentes		Variáveis dependentes
	Enzima	Tempo de reação (min)	
1			Grau de hidrólise
2	Controle (CPFP)*	0	Composição química
3		15	Peso molecular
4		30	Perfil de aminoácidos
5	Alcalase	45	Fluorescência relativa
6		60	Propriedades térmicas
7		120	Capacidade de absorção de óleo
....			Estabilidade de emulsão
18	Pepsina		Atividade antioxidante

*CPFP= concentrado proteico de feijão preto (sem adição de enzima).

3.2.2. Preparo do concentrado proteico de feijão preto (CPFP)

Os concentrados proteicos foram preparados conforme descrito por Carrasco-Castilla et al. (2012), com modificações. Os grãos moídos de feijão preto foram preparado em moinho de laboratório (Perten 3100), utilizando peneira de 70 mesh. Inicialmente, a fim de remover os compostos fenólicos presentes, foram realizados duas lavagens com acetona 50% (v/v), durante 1 h cada. Para a extração das proteínas, a farinha foi suspensa em água destilada (1:10, grão moído:água). O pH foi ajustado para 9,5 com NaOH 1N, permanecendo sob agitação durante 30 min a

35 °C. Em seguida, centrifugou-se o material por 30 min a 12.000 x g. O pH do sobrenadante foi ajustado para 4,5 com HCl 1N e procedeu-se nova centrifugação a 12.000 x g. O precipitado foi coletado e acondicionado a -80 °C até ser liofilizado.

3.2.3. Hidrólise enzimática

A hidrólise foi realizada de acordo com Carrasco-Castilla et al. (2012). O concentrado proteico de feijão foi suspenso em tampão fosfato de sódio 35 mM para obter uma solução 5% (p/v). O material permaneceu sob agitação overnight a 4 °C. O processo de hidrólise foi realizado sob condições controladas (temperatura, pH e agitação) com proporção enzima substrato de 1/20 durante 120 min de reação. A hidrólise com a enzima pepsina foi realizada a 37 °C e pH 2,0, enquanto para a enzima Alcalase a hidrólise foi conduzida a 50 °C e pH 7,0. Alíquotas foram retiradas da mistura proteolítica nos intervalos de tempo 0, 15, 30, 45, 60, 120 min, e foram imediatamente aquecidas a 90 °C por 10 min para a inativação enzimática. O material foi centrifugado a 10.000 x g durante 15 min. O sobrenadante foi, então, coletado e liofilizado.

3.2.4. Determinação do grau de hidrólise

O grau de hidrólise foi determinado conforme Avramenko; Low e Nickerson (2012). Esta análise incluiu um controle (CPFP não hidrolisado, apenas efeito da temperatura e do pH) denominado *hc*, a determinação de um valor total de hidrólise do CPFP (*ht*), a hidrólise enzimática propriamente dita (*h*) pela reação com ácido trinitro benzeno sulfônico (TNBS) em cada uma destas etapas, para a quantificação dos grupos hidrolisados. Posteriormente foi calculado o grau de hidrólise (GH%), conforme as Equações 1 e 2.

$$h = (ht - hc) \times DF \quad \text{Equação (1)}$$

$$\%GH = \frac{h}{htot} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

h é o rendimento de hidrólise em função da ação enzimática, descontando-se a ação da temperatura e do pH de reação sobre a formação de hidrolisados, expresso mM de α -NH₂-Gli equivalente (grupos amino- α formados durante a reação de hidrólise ou α -NH₂-Gli equivalente),

hc é a concentração de mM de α -NH₂-Gli equivalente CPFP tratados (controle),

ht representa a concentração em mM de α -NH₂-Gli equivalente obtido a partir da hidrólise total do CPFP.

htot é a concentração de mM de α -NH₂-Gli equivalente do total de CPFP após 6h de hidrólise enzimática

DF é um fator de diluição.

3.2.4.1. Amostra controle (*hc*) (não hidrolisada, efeito da temperatura e do pH)

Inicialmente o CPFP 5% (p/v) foi homogeneizado em 35 mM tampão fosfato de sódio (pH 7,8) e deixado sob agitação durante uma noite a 4 °C. A solução resultante foi transferida para um banho de água com agitação (90 x g) a 37 °C durante 360 min. Alíquotas de 250 μ L da mistura foram removidas em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 min), adicionou-se 2 mL de solução 1% SDS em tampão fosfato de sódio 35 mM (pH 7,8), aqueceu-se a 90 °C em banho-maria durante 10 min e, em seguida, uma alíquota de 250 μ L foi coletada e adicionada a 2 mL de tampão fosfato de sódio 35mM (pH 7,8). Esta reação foi realizada em triplicata e analisadas utilizando a reação do ácido trinitro benzeno sulfônico (TNBS)

A reação do TNBS foi realizada de acordo com os métodos combinados de Adler- Nissen (1979) e Toro e Garcia-Carreno (2005), a fim de determinar o grau de hidrólise. As amostras controle, hidrolisados e soluções em branco obtidas nos itens anteriores, foram adicionadas de reagente TNBS (0,01%), seguidos por incubação a

50 °C durante 60 min em banho de água coberto (para evitar exposição à luz). No final da incubação, a reação foi terminada pela adição de 4 mL de HCl 0,1 M a cada tubo. As soluções foram arrefecidas a 23 °C durante 30 min, e a absorbância foi medida a 340 nm com um espectrofotômetro UV- visível (modelo- UVmini-1240 UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu, Japao). A curva padrão foi preparada a partir de uma solução de 35 mM de fosfato de sódio a pH 7,8 contendo 1,5 mM de glicina. Uma gama de padrões de glicina (0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 e 0,50 mM) foram preparadas a partir da solução estoque 1,5 mM de glicina por diluição para um volume final de 2,25 mL com tampão fosfato de sódio 35 mM (pH 7,8). Como um exemplo, a solução 0,05 mM de glicina padrão consistiu de 45 mL da solução 1,5 mM de glicina e 2 mL de tampão fosfato de sódio 35 mM. A amostra em branco consistiu em 0,25 mL de tampão fosfato de sódio 35 mM (pH 7,8) em 2 mL de solução 1,0% SDS. Amostras padrões e brancos foram analisadas em triplicata utilizando a reação de TNBS. A amostra controle é identificado como *hc* na Equação 1.

3.2.4.2. Hidrolisados proteicos de feijão (*htot*) (com adição de enzima)

A hidrólise do concentrado proteico de feijão preto foi realizada conforme descrito no item 3.2.3 com um tempo de reação de 360 min, sendo que foram coletas alíquotas (250 µL) a cada 15 min de reação, na primeira hora e depois a cada 60 min até 360 min de reação. Foi adicionado 2 mL de solução 1% SDS em tampão fosfato de sódio 35 mM (pH 7,8) em cada alíquota. Este material foi aquecido a 90 °C em banho-maria durante 10 min para a inativação térmica da enzima. A amostra em branco consiste em 250 µL de tampão fosfato de sódio 35 mM (pH 7,8) e 2mL solução 1,0% de SDS de tampão fosfato de sódio 35 mM (pH 7,8). A análise foi realizada em triplicata e analisadas utilizando a reação do TNBS. A hidrólise em 360 min. foi utilizada para o cálculo (*htot*) na Equação 2.

3.2.4.3. Hidrólise total (*ht*)

A hidrólise total e a determinação do máximo de grupos amino que podem ser hidrolisados através de uma digestão ácida. A determinação de grupos amino total hidrolisados do CPFPP foi realizado com base nos métodos de Adler-Nissen (1979), Jung, Murphy, e Johnson (2005). Aproximadamente 24 mg de CPFPP foram pesados em tubo de ensaio com tampa de rosca, seguido pela adição de 15 mL de HCl 6 N. O material foi submetido a digestão ácida, realizada por aquecimento da amostra em estufa com circulação de ar a 110 °C durante 20 h. O pH da solução foi ajustado para um pH de $7,0 \pm 0,2$ com NaOH 2 M, em seguida, o conteúdo foi filtrado com papel filtro (Whatman International Ltd., Maidstone, UK). Após essas etapas, alíquotas de 250 μ L foram adicionados a 2 mL de solução 1,0 % de SDS em tampão fosfato de sódio 35 mM (pH 7,8). A amostra em branco foi preparada por mistura de volumes de NaOH 6 N e HCl 6 N para obter uma solução com um pH final de $7,0 \pm 0,2$. Todas as reações de hidrólise total do CPFPP foram realizadas em triplicata, e todas as amostras e brancos foram analisados quanto ao grau de hidrólise, utilizando a reação do (TNBS). O máximo potencial de hidrólise do CPFPP são referidos como h_{tot} na Equação 2.

3.2.5. Composição química

A composição química dos grãos moídos de feijão, do concentrado proteico de feijão preto e dos hidrolisados proteicos a partir de pepsina e Alcalase foi determinada através das análises de proteína bruta, teor de cinzas e lipídeos sendo que todos os métodos foram realizados de acordo com as metodologia oficiais da AOAC, (2005). O teor de carboidratos foi determinado por diferença dos demais componentes.

3.2.6. Eletroforese (SDS-PAGE)

A determinação do perfil eletroforético do concentrado proteico de feijão preto e dos hidrolisados proteicos a partir de pepsina e Alcalase foi feita de acordo com

procedimento descrito por Laemmli (1970), com algumas modificações. 5mg de proteína foram dissolvidas em 1 mL de tampão contendo 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 10% de SDS, 10% de glicerol, 5% β -mercaptoetanol e 0,1% de azul de bromofenol e aquecidas a 90 °C por 5 min. Depois do material resfriado uma alíquota de 5 μ L foram aplicados no gel. A SDS-PAGE foi realizada utilizando-se um sistema tampão de SDS-Tris-Glicina. A concentração do gel de empilhamento foi de 4% e do gel de separação em gradiente de 8-16%. Uma mistura de proteínas padrão (6,5-66kDa) foi utilizado como o marcador de peso molecular e os géis foram corados com comassie blue.

3.2.7. Perfil de aminoácidos

Os teores de aminoácidos do concentrado proteico de feijão preto e dos hidrolisados de pepsina e Alcalase com tempo de reação de 120 min foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu, bomba LC - 20AT, Detector SPD-M20A e Injetor SIL 10AF, Kyoto, Japão). As amostras passaram por hidrólise prévia com ácido clorídrico (HCl) bidestilado 6 N, seguida de derivação em pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC) e a separação dos derivados feniltiocarbamilaminoácidos (PTC-aa), em coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag –3,9x300 mm), com detecção por UV a 254 nm. A quantificação da amostra foi baseada na altura de cada pico de aminoácido, utilizando como referência a altura do pico do padrão interno de aminoácidos com concentração conhecida, eluídos nas mesmas condições e no mesmo tempo das amostras.

3.2.8. Fluorescência relativa

A fluorescência relativa foi determinada pelo método descrito por YIN et al. (2008). Preparou-se uma solução estoque com o reagente 1,8-anilinoftaleno-sulfonato (ANS) e soluções de proteína (concentrado ou hidrolisados proteicos) 1,5% (m;v) foram preparadas em tampão fosfato 10 mM (pH 7,0). Em tubos falcon

contendo 4 mL de tampão e 20 µL de solução de estoque ANS foram adicionados 10, 20, 30, 40, e 50 L de solução de proteína de 1,5%. As misturas foram agitadas em vórtex durante 5 s. Utilizou-se espectrofluorômetro (modelo Shimadzu, Kyoto, Japão) e a intensidade de fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de 400 nm a 600 nm , com excitação programada em 390 nm a $20,0 \pm 0,5$ °C, com uma fenda de excitação e de emissão constante de 5 nm.

3.2.9. Propriedades térmicas

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizada com aproximadamente 1 mg de amostra do concentrado proteico de feijão preto ou dos hidrolisados, foi suspensa em 20 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) e colocada diretamente na cápsula de alumínio seladas hermeticamente. As amostras foram aquecidas de 20 a 120 °C na velocidade de 10 °C/min. Uma cápsula vazia foi usada como referência. A temperatura de desnaturação foi determinada pelo pico do termograma (Tp). A temperatura de desnaturação (Td) a temperatura de conclusão (Tc) e a variação de entalpia (ΔH), foram computados automaticamente.

3.2.10. Capacidade de absorção de óleo (CAO)

A capacidade de absorção de óleo foi determinada utilizando o método descrito por Ogunwolu et al. (2009), com algumas modificações. Amostras de 500 mg do concentrado proteico ou dos hidrolisados foram pesadas individualmente em tubos de centrífuga e homogeneizadas com 1 mL de óleo de milho em vórtex durante 30 s. As misturas permaneceram a temperatura ambiente (cerca de 20 °C) durante 30 min e em seguida foram centrifugadas a 13.600 g por 10 min a 25 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados a um ângulo de 45 ° durante 20 min para drenagem do óleo residual. Após os tubos contendo o material sedimentado foram pesados e a capacidade de absorção de óleo foi calculada em relação ao peso inicial, em base seca.

3.2.11. Estabilidade de emulsão

A estabilidade de emulsão foi avaliada de acordo com Kimura et al. (2008). Dispersões de 15 mL contendo 1% de concentrado ou hidrolisados foram homogeneizadas com 5 mL de óleo de milho a 12000 rpm durante 2 minutos (Ultra turrax, PT 3100, Polytron, Suíça). Os tubos foram selados e mantidos no escuro, sem agitação, a temperatura ambiente e a estabilidade das emulsões foram monitoradas visualmente durante o período de 30 dias de armazenamento. Os tubos foram fotografados no 1º, 10º, 20º e 30º dia.

3.2.12. Atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

A determinação da capacidade inibidora de radicais livres ABTS^{•+} do concentrado e dos hidrolisados proteicos de feijão preto foi realizada de acordo com o método descrito por Durak et al. (2013), com algumas modificações. O radical livre ABTS foi preparado a partir da reação de 5 mL de solução estoque de ABTS 7 Mm e 88 µL de solução de persulfato de potássio 140 mM. Ambas as soluções foram preparadas com água ultra pura. A mistura foi mantida ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, por 16 h. Após este tempo em repouso, 1 mL desta mistura foi diluída em álcool etílico, até obtenção de absorvância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm. Para promover a reação dos hidrolisados proteicos com o radical ABTS^{•+}, adicionou-se 0,1 mL de hidrolisado (1 g/L) em 1,9 mL de ABTS^{•+}. A absorvância foi analisada após 6 min de reação a 734 nm. Para a amostra em branco, foi utilizado tampão fosfato de sódio 35 Mm com pH 7,8, em substituição ao concentrado e hidrolisados. A Equação 4 foi utilizada para expressar o poder inibitório de radicais livres ABTS^{•+} de cada amostra, em percentagem.

$$\text{Inibição de radicais livres ABTS (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs. amostra}}{\text{Abs. branco}} \right) \right] \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

Abs. amostra = absorvância da amostra,

Abs. branco = absorvância do branco (sem a presença de amostra).

3.2.13. Atividade antioxidante pelo método DPPH

A capacidade de eliminação de radicais livres DPPH foi analisada de acordo com o método de Xia et al. (2012). Os hidrolisados proteicos (1 g/L) foram misturados com DPPH $0,1 \times 10^{-3}$ M preparado em etanol anidro, na proporção 1:1. A mistura foi agitada em vórtex e procedeu-se a reação durante 30 min à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Para a análise do controle foi utilizado tampão fosfato de sódio 35 Mm na mesma concentração. A redução de radicais livres DPPH foi determinada medindo a absorbância a 517 nm e os resultados calculados conforme a Equação 3.

$$\text{Inibição de radicais livres DPPH (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs. amostra}}{\text{Abs. branco}} \right) \right] \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

Abs. amostra = absorbância da amostra,

Abs. branco = absorbância do branco (sem a presença de amostra).

3.3.14. Estatística

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey, a 5% de significância dos dados referentes às análises ao grau de hidrólise, composição química, capacidade de absorção de óleo e atividade antioxidante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Grau de hidrólise

O grau de hidrólise do concentrado proteico de feijão preto de obtido pela ação das enzimas pepsina e Alcalase, sob diferentes tempos de hidrólise estão apresentados nas Figuras 4a e 4b, respectivamente.

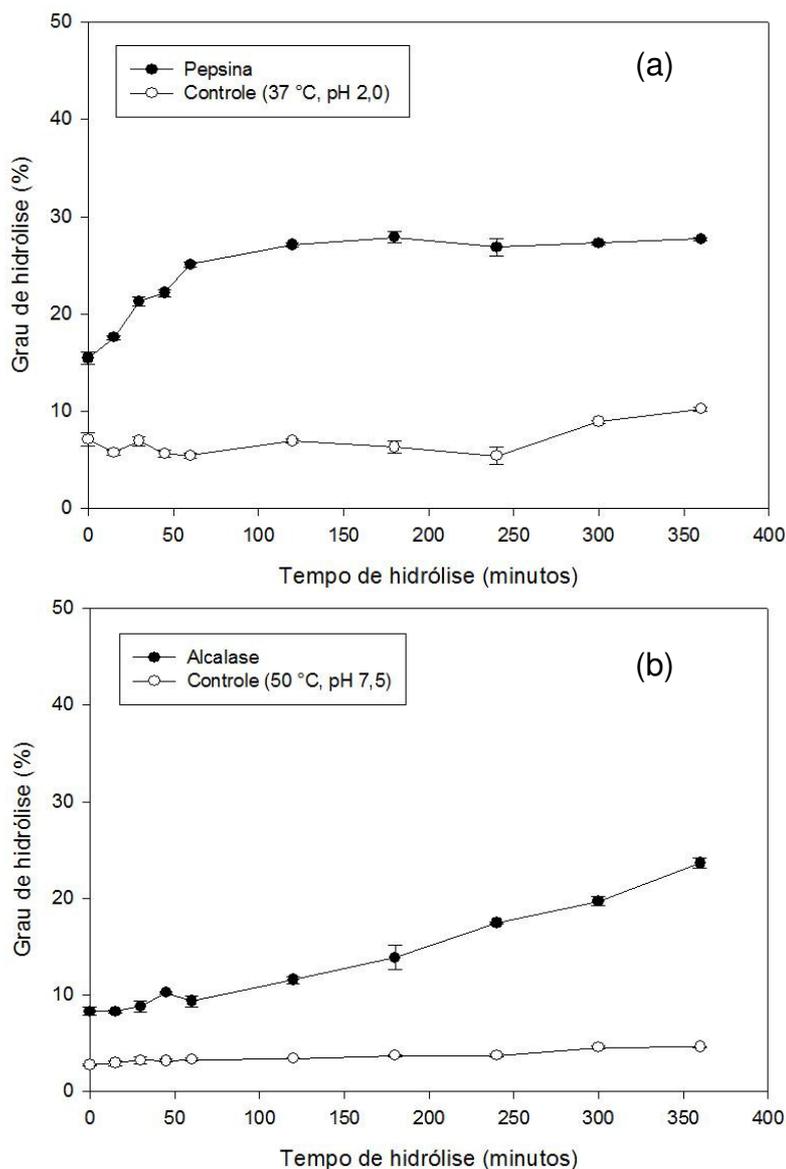


Figura 4. Grau de hidrólise do concentrado proteico de feijão preto obtido pela ação das enzimas pepsina (a) e Alcalase (b). Os respectivos controles de temperatura e pH também estão apresentados.

O grau de hidrólise foi determinado durante o período de 360 min de reação. Como controle, foi avaliado o efeito isolado do pH e da temperatura de reação sobre o grau de hidrólise, sem considerar a digestão enzimática.

As condições utilizadas para o tratamento com pepsina foram de 37 °C e pH 2,0, o qual proporcionou um pequeno aumento ($p < 0,05$) no grau de hidrólise no tempo final de hidrólise (300 e 360 min), em comparação com o tempo anterior (240 min). Nas condições ótimas utilizadas para a hidrólise com Alcalase (50 °C e pH 7,5), não houve efeito significativo da temperatura e do pH sobre o grau de hidrólise (Figura 1a).

A hidrólise do concentrado proteico de feijão com a enzima pepsina proporcionou um aumento significativo ($p < 0,05$) no grau de hidrólise nos primeiros 30 min de reação, enquanto que com a enzima Alcalase, um aumento significativo ($p < 0,05$) foi observado apenas após 120 min de reação. Pode-se observar na Figura 4A, que o grau de hidrólise das proteínas com pepsina alcançou um equilíbrio após 60 min de reação, enquanto o grau de hidrólise das proteínas hidrolisadas com a enzima Alcalase ainda continuava aumentando ($p < 0,05$) para cada hora de reação (Figura 4b). Ao final da reação (360 min), o grau de hidrólise para enzima pepsina foi de 27,7%, enquanto que para a enzima Alcalase de 23,6%.

Carrasco-Castilla et al. (2012) hidrolisaram isolados proteicos de feijão Jamapa (*Phaseolus vulgaris* L.), utilizando a associação das enzimas pepsina e pancreatina. Os autores primeiramente hidrolisaram o isolado proteico com pepsina durante 90 min, em seguida adicionaram a pancreatina e a hidrólise percorreu por outro período de 90 min de reação. O grau de hidrólise foi de 10% verificado após 90 min de hidrólise com pepsina, este valor encontrado pelos autores foi menor do que os 27% de grau de hidrólise encontrado no presente estudo, utilizando a mesma enzima durante 60 min de reação (Figura 4a).

Medina-Godoy et al. (2012) ao hidrolisarem concentrados proteicos de grão de bico por 120 min com Alcalase em pH 9,0, observaram resultados semelhantes aos apresentados na Figura 4B. Por outro lado, Peng et al. (2010) relataram graus de hidrólise superior a 20% ao hidrolisar proteínas isoladas de soro de leite durante 60 min de reação com a enzima Alcalase. O elevado grau de hidrólise determinado

por Peng et al. (2010) em comparação com os dados apresentados na Figura 4a pode ser atribuído a diferenças na fonte de proteica, atividade da enzima, e ao pH utilizado durante a hidrólise. Além disso, um tratamento a 95 °C por 5 min foi realizado pelos autores previamente a hidrólise enzimática, o que provavelmente influenciou nos resultados. Torruco-Uco et al. (2009) obtiveram hidrolisados proteicos de feijão Jamapa (*Phaseolus vulgaris* L.), pela ação da enzima Alcalase com grau de hidrólise superior a 40% após 15 min de reação. No entanto, os autores realizaram uma filtração através de um filtro de 0,45 µm, em que provavelmente algumas proteínas globulares ficaram retidas, e por isso possivelmente obtiveram um maior grau de hidrólise.

Os hidrolisados obtidos a partir das enzimas pepsina e Alcalase até 120 min de hidrólise foram estudados detalhadamente neste trabalho realizando análises de composição química, SDS-PAGE, propriedades funcionais, análise térmica e avaliação de antioxidantes. Neste tempo de utilizado, houve um equilíbrio no grau de hidrólise para a enzima pepsina, enquanto que a hidrólise com Alcalase apresentou valores de grau de hidrólise de 11,5%. Com este tempo de reação provavelmente já houve alterações estruturais e funcionais das proteínas. Além disso, o tempo de 120 min de hidrólise é viável para ser utilizado na indústria de alimentos.

4.2. Composição química

O concentrado proteico de feijão preto apresentou 81,6%, 6,2%, 0,8% e 11,4% de proteínas, cinzas, lipídeos e carboidratos totais, respectivamente. O teor de proteína do concentrado obtido no presente estudo foi maior do que o teor de proteína de feijão mung e feijão preto envelhecido relatado por Li et al. (2010) e Segura-Campos et al. (2012), respectivamente.

O teor de proteína e cinzas dos hidrolisados proteicos de feijão preto preparados com pepsina e Alcalase são apresentados nas Figuras 5a e 5b, respectivamente. Houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de 18,0% e de 11,1% no teor de proteína do concentrado de feijão preto para o tempo de hidrólise de 15 min com pepsina e Alcalase, respectivamente. O teor de proteína permaneceu

inalterado ($p < 0,05$) nos hidrolisados tratados com pepsina de 15 min até 120 min de reação.

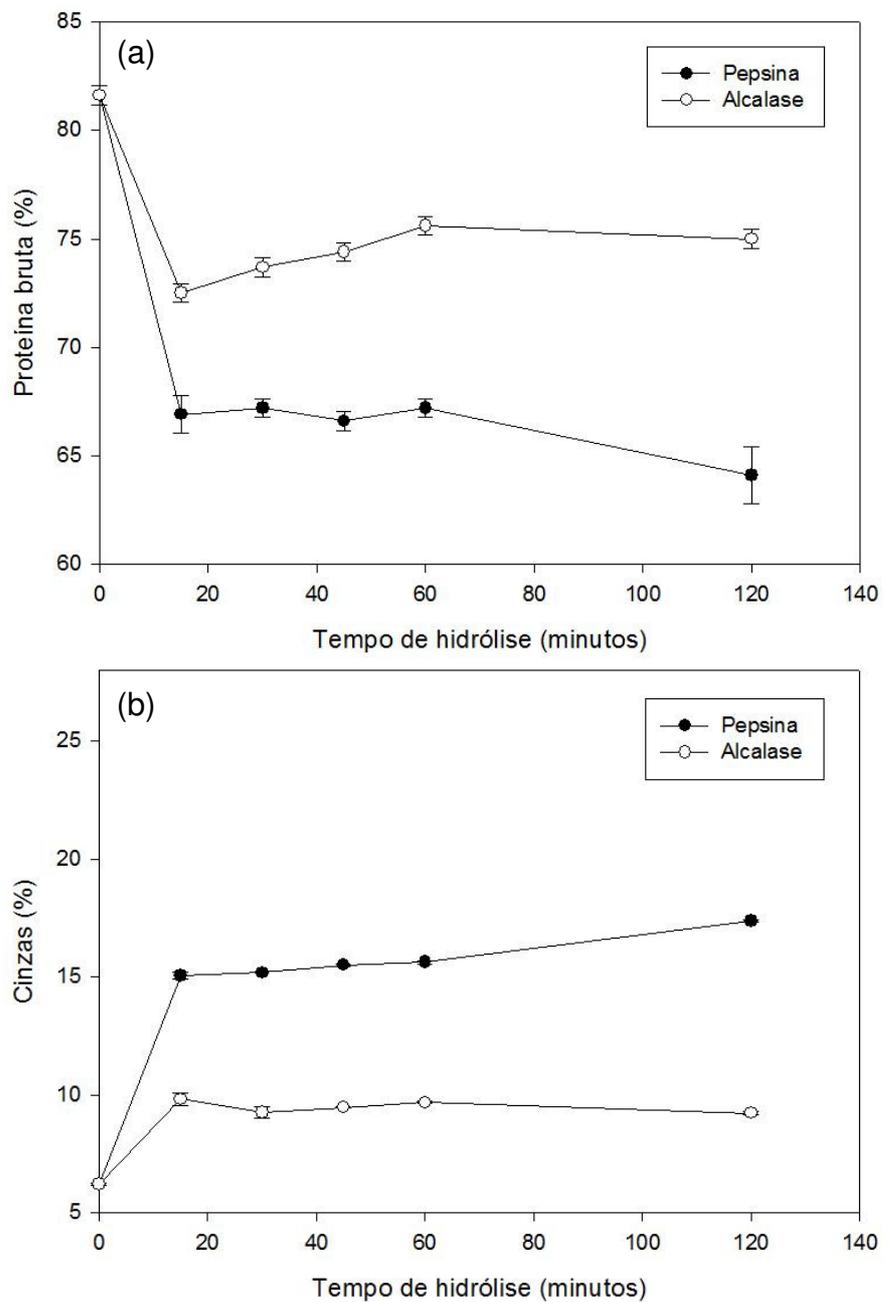


Figura 5. Teor de proteínas (a) e cinzas (b) (% em base seca) do concentrado proteico de feijão preto e de seus hidrolisados obtidos pela ação das enzimas pepsina e Alcalase.

Por outro lado, o teor de proteínas dos hidrolisados tratados com Alcalase de 15 a 60 min, houve tendência a aumentar (Figura 5a). Houve uma redução do teor

de proteína nos primeiros 15 min de hidrólise e um aumento associado no teor de cinzas do concentrado proteico de feijão preto hidrolisado com pepsina, como pode ser observado na Figura 5b. Yust et al. (2010) também relataram uma redução no teor de proteína e um aumento no teor de cinzas de hidrolisados proteicos de grão de bico obtidos por hidrólise com Alcalase. Segundo os autores, ocorre um aumento do teor de cinzas devido à adição de álcali para manter o pH constante durante a hidrólise.

No presente estudo, os hidrolisados proteicos de feijão preto, obtidos a partir da hidrólise com pepsina apresentaram maior teor de cinzas ($p < 0,05$) durante todo o tempo de hidrólise, em comparação com os hidrolisados proteicos obtidos por Alcalase. O teor de cinzas superior observado para os hidrolisados obtidos a partir de pepsina pode ser atribuído ao baixo pH necessário para a reação (pH 2,0), o qual, por sua vez, exigiu maior quantidade de ácido para a manutenção do pH constante durante a hidrólise.

O tempo de hidrólise e tipo de enzima não teve nenhum efeito sobre o teor de lipídeos, que foi menor que 0,15% para todos os tratamentos (dados não apresentados). O conteúdo de carboidratos totais foi maior ($p < 0,05$) nos hidrolisados obtidos do tratamento com a enzima pepsina, em comparação com aqueles de Alcalase. Esse resultado está de acordo com o teor de proteína (Figura 5a), o que indica menor pureza dos hidrolisados obtidos a partir da hidrólise com pepsina.

4.3. Eletroforese (SDS-PAGE)

Na Figura 6 estão apresentados os perfis de peso molecular por SDS-PAGE do concentrado proteico de feijão preto e dos hidrolisados obtidos a partir de pepsina (Figura 6a) e Alcalase (Figura 6b). Na primeira coluna de cada gel (Std) encontra-se o padrão de proteínas com peso molecular conhecido. As demais bandas foram intituladas com letras de A-F conforme o tempo de reação dos hidrolisados. Na segunda coluna do gel (a) das Figuras 6a e 6b, encontra-se o concentrado proteico de feijão preto. As outras letras são respectivas aos tempos de reação (15, 30, 45, 60, 120 min), utilizados para produção de cada hidrolisado

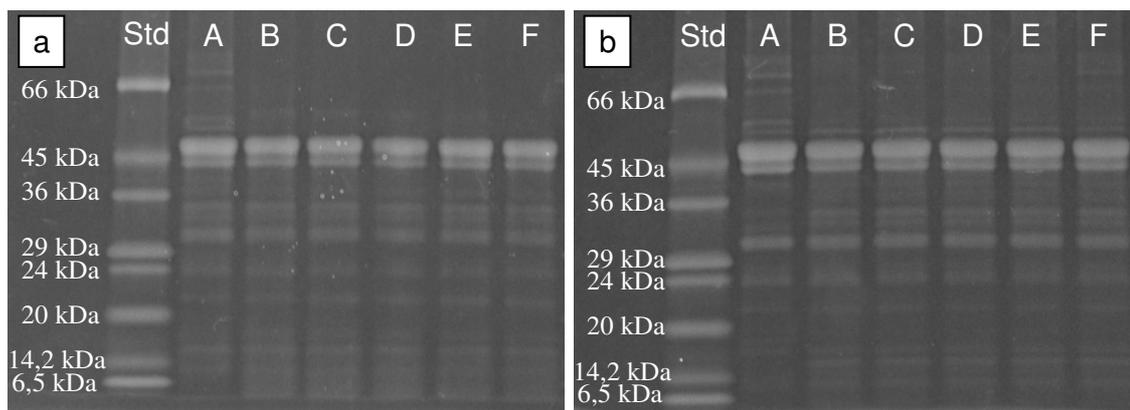


Figura 6. Perfil de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) do concentrado proteico de feijão preto e hidrolisados. STD: proteínas padrão; A: concentrado proteico de feijão preto (Controle); B-F: Hidrolisados proteicos com 15, 30, 45, 60 e 120 min de reação para pepsina (a) e Alcalase (b), respectivamente.

O perfil de SDS-PAGE e identificação de proteínas do feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) foi estudado por Makri e Doxastakis (2006) e Rui et al. (2011). Segundo estes autores, o perfil SDS-PAGE de proteína de feijão preto é composto principalmente por quatro classes: (1) proteínas 11S, com massa molecular acima de 57 kDa; (2) faseolina ou vicilina 7-8s, com massa molecular de 47 kDa (de tipo α), 44, 25 kDa (de tipo β), e 21 kDa (do tipo α); (3) Fitohemaglutinina (PHA), com massa molecular de 31 kDa; e (4) inibidores de α -amilase, com massa molecular de 27, 18 e 17 kDa da subunidade, dependendo da forma.

No presente estudo, observou-se claramente nas Figuras 6a e 6b, bandas no gel correspondentes a fração faseolina (47 kDa e 44 kDa) tanto para o concentrado proteico de feijão como para todos os hidrolisados. A banda de 31 kDa de PHA também foi visível para o concentrado e todos os hidrolisados. Essas bandas também foram observadas por Morales-de-Leon et al. (2007) para concentrados proteicos de feijão novo e endurecido (*Phaseolus vulgaris* L.).

Os hidrolisados tratados com pepsina apresentaram bandas mais uniformes entre 14,2 e 6,5 kDa, não sendo perceptíveis como uma função do tempo de hidrólise (Figura 6a). Além disso, as bandas de proteínas superior a 50 kDa

observadas no concentrado proteico de feijão desapareceram nos hidrolisados obtidos a partir de pepsina (Figura 6a).

De acordo com Makri et al. (2006), os pesos moleculares acima de 57 kDa correspondem a fração 11S das proteínas de armazenamento. Assim, o desaparecimento das bandas entre 45-66 kDa após a hidrólise com pepsina é um indicativo da quebra das proteínas 11S. Houve também o desaparecimento das bandas superiores a 50 kDa para a hidrólise com Alcalase até 60 min de reação (Figura 6b). No entanto, essas bandas foram novamente percebidas em 120 min de hidrólise na Figura 6 (A-F), sugerindo uma agregação de proteínas por ligações de hidrogênio. Um comportamento semelhante foi relatado por Rui et al. (2011).

4.4. Perfil de aminoácidos

A composição de aminoácidos do concentrado proteico de feijão preto e dos hidrolisados obtidos a partir de 120 min de reação com as enzimas pepsina e Alcalase está apresentado na Tabela 3. A composição de aminoácidos que atende os requisitos da FAO/WHO (2002) para adultos e crianças (3-10 anos de idade) também é apresentada na Tabela 3.

O concentrado proteico de feijão, bem como os hidrolisados, mostraram bom equilíbrio de aminoácidos essenciais, exceto para os aminoácidos cisteína e metionina, que estão presentes em conteúdo inferior às necessidades da FAO/WHO (2002) para adultos e crianças dos 3 aos 10 anos de idade. A deficiência de metionina e cisteína é comum em sementes de leguminosas (VALDEZ-ORTIZ et al., 2012). A composição em aminoácidos dos hidrolisados foi semelhante ao do concentrado, o que indica que a hidrólise enzimática não alterou o valor nutricional das proteínas originais. Conforme relatado por Yust et al. (2010), esta é uma vantagem do método de hidrólise enzimática em comparação com a hidrólise ácida ou básica.

Tabela 3. Composição de aminoácidos (aa g/kg de proteína) do concentrado proteico do feijão preto (CPFP) e dos hidrolisados proteicos obtidos com 120 min de reação com as enzimas pepsina e Alcalase.

Aminoácidos	Concentrado		Hidrolisados		FAO/WHO	FAO/WHO
	CPFP		Pepsina 120 min	Alcalase 120 min	(2002) <i>requerimento para adultos</i>	(2002) <i>requerimento para crianças**</i>
Asparagina	131,9		133,6	132,3		
Treonina*	40,7		39,9	40,9	23	25
Serina	59,4		59,6	60,0		
Glutamina	165,4		170,0	165,4		
Prolina	37,8		37,0	37,8		
Glicina	34,3		35,1	34,9		
Alanina	37,8		37,9	38,9		
Valina*	52,4		51,5	53,2	39	40
Isoleucina*	49,2		49,0	49,2	30	31
Leucina*	94,2		93,4	93,6	59	61
Tirosina*	38,7		37,9	39,1	38	
Fenilalanina*	72,3		71,3	71,3	(Fen+Tir)	41
Histidina*	31,5		31,4	31,2	15	16
Lisina*	78,4		78,3	76,4	45	48
Arginina	60,1		60,6	59,8		
Cisteina *	3,7		3,3	3,7	6	6
Metionina*	10,6		9,4	12,3	16	24

*Aminoácidos essenciais; ** Crianças de 3 a 10 anos.

Além disso, o concentrado proteico de feijão e seus hidrolisados apresentaram elevados teores de asparagina e glutamina, indicando alto teor de aminos, esses aminoácidos tem o papel de armazenamento nos grãos. A glutamina é um aminoácido importante aos seres humanos porque promove a produção de glicogênio pelo fígado, aumentando a síntese proteica e reduzindo a degradação proteica no músculo esquelético (FRANZESE, 2000).

Os altos teores de lisina e arginina encontrados, tanto no concentrado proteico de feijão preto e em seus hidrolisados, pode ser uma importante fonte em ingredientes para a fortificação de alimentos. Isto é importante, pois a suplementação dietética de alimentos com aminoácidos básicos tem se mostrado um eficiente coadjuvante para normalizar as respostas ao estresse hormonal em humanos (SMRIGA et al., 2007). Os aminoácidos de cadeia ramificada, a leucina, isoleucina e valina também são de extrema importância fisiológica em dietas projetadas para melhorar aumento do estado nutricional de pacientes com condições de alto catabolismo proteico, tais como queimaduras, câncer, insuficiência hepática, e trauma (WEISDORF, 1998).

4.5. Intensidade de fluorescência relativa

As mudanças conformacionais das proteínas do feijão preto em função da hidrólise enzimática foram avaliadas por espectros de emissão de fluorescência mediante a ligação ao reagente 1,8-anilinoftaleno-sulfonato (ANS) estão apresentadas nas Figuras 7a e 7b.

De acordo com Pallares et al. (2004), a um pH constante (por exemplo, pH 7,0), o ANS se liga a superfícies hidrofóbicas em proteínas expostas parcialmente desdobradas, com afinidade superior do que as proteínas nativas ou completamente desdobradas o que promove um aumento na emissão de fluorescência em comparação com a emissão do ANS em solução aquosa. Assim, o aumento da intensidade de fluorescência relativa é acompanhado por um aumento na hidrofobicidade da proteína.

Uma característica geral de proteínas globulares consiste na localização de resíduos hidrofóbicos no interior da proteína enquanto os resíduos polares ou carregados se situam à superfície da proteína. As cadeias laterais alifáticas dos aminoácidos alanina, valina, leucina e glicina apresentam características hidrofóbicas. Os aminoácidos contendo enxofre podem apresentar igualmente características hidrofóbicas, em especial a cisteína e a metionina envolvidos na formação de pontes dissulfídicas. A cadeia lateral aromática da fenilalanina, tirosina

e triptofano é fortemente hidrofóbica (LEHNINGER, 1995). A exposição desses aminoácidos no processo de hidrólise irá proporcionar a ligação ao ANS.

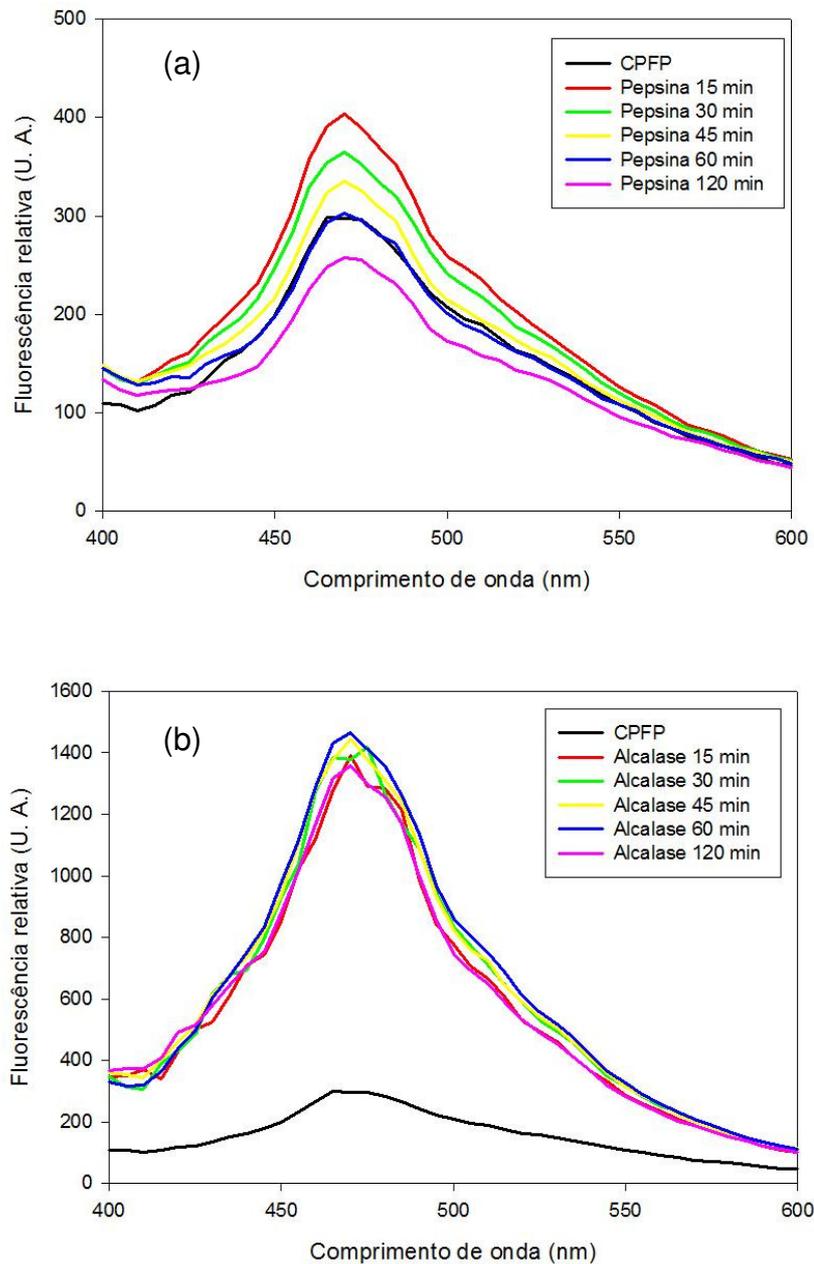


Figura 7. Espectro de fluorescência relativa do concentrado proteico de feijão preto (CPFP) e dos hidrolisados proteicos a partir de pepsina (a) e Alcalase (b).

Comparado ao concentrado proteico de feijão preto, a hidrólise com pepsina durante 15 min levou ao maior espectro de emissão de fluorescência dentre os

hidrolisados do mesmo grupo. Após 15 min de hidrólise com pepsina, os espectros de emissão de fluorescência diminuíram conforme o aumento no tempo de hidrólise (Figura 7a). Isso indica que durante os primeiros 15 min de hidrólise com pepsina houve a exposição de grupos hidrofóbicos que antes estavam voltados ao interior da proteína. Com o aumento do tempo de hidrólise houve redução na hidrofobicidade de superfície. Este fato, deve-se aos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos se voltarem ao interior da molécula e a exposição de grupos hidrofílicos para o exterior.

Zhao et al. (2011) realizaram hidrólise limitada em proteína de amendoim com a enzima Alcalase, no intuito de obter baixo grau de hidrólise e avaliar suas propriedades funcionais. Nesse estudo, os autores relataram uma redução na fluorescência relativa do concentrado proteico de amendoim conforme o aumento do grau de hidrólise. Um declínio na intensidade de fluorescência relativa também foi observado ao hidrolisar concentrado proteico de lentilha com tripsina (AVRAMENKO; LOW; NICKERSON, 2013). Estes autores relataram que pode ter acontecido uma agregação das proteínas por meio de interações hidrofóbicas o que influenciou nos resultados. Outra possibilidade é a composição e sequência dos aminoácidos da proteína. Tendo em vista que a fonte vegetal irá influenciar sobre os resíduos que serão expostos a partir da hidrólise.

Os hidrolisados proteicos de obtidos pela enzima Alcalase apresentaram espectros de emissão de fluorescência (Figura 7b) maior em comparação com os espectros de emissão do concentrado proteico de feijão preto e os de hidrolisados obtidos pela ação da pepsina. O menor teor de proteína dos hidrolisados com pepsina (Figura 5a) e a especificidade da enzima provavelmente sejam responsáveis pelos menores valores dos espectros de fluorescência, em comparação com os hidrolisados com Alcalase. Os hidrolisados obtidos a partir de Alcalase, independentemente do tempo de hidrólise, tiveram os espectros de emissão de fluorescência semelhante (Figura 7b). Este fato pode ser confirmado com o grau de hidrólise (Figura 4a) e o perfil de SDS-PAGE (Figura 6b) dos tratamentos com Alcalase.

4.6. Propriedades térmicas (DSC)

Os termogramas de DSC do concentrado proteico de feijão preto e de seus hidrolisados obtidos com a enzima pepsina estão apresentados na Figura 8. Na Tabela 4 estão apresentadas as temperaturas de transição e a entalpia da análise térmica do concentrado proteico de feijão preto e de seus hidrolisados obtidos a partir da enzima pepsina.

Apenas os hidrolisados obtidos com a enzima pepsina apresentaram pico endotérmico. Os hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase não apresentavam pico de transição endotérmica, o que é um indicativo da desnaturação de proteica.

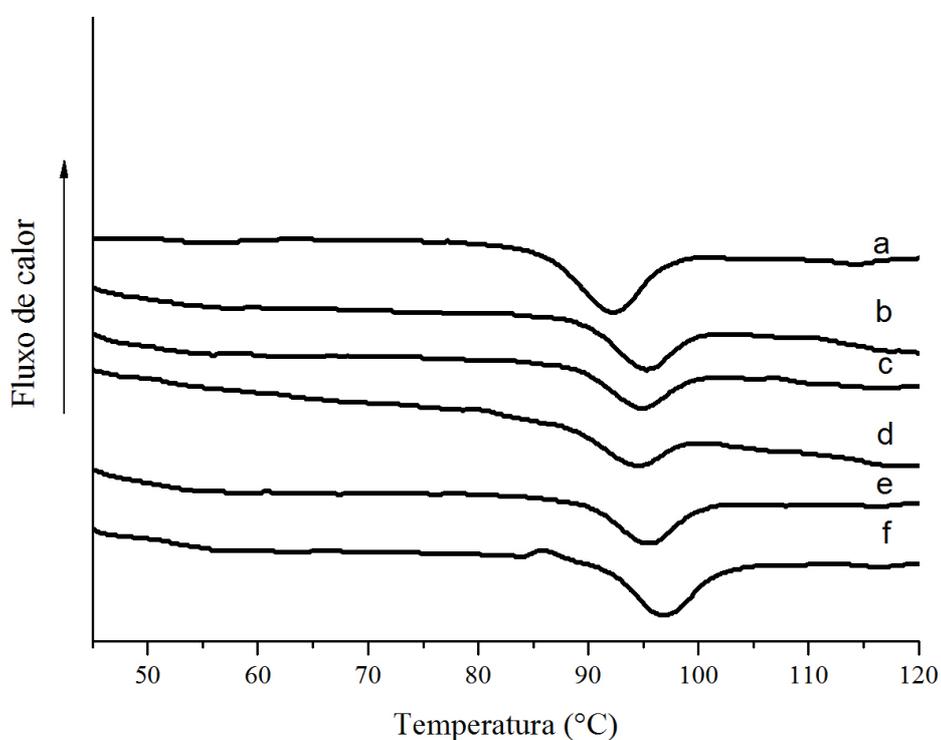


Figura 8. Termogramas de DSC do concentrado proteico de feijão preto (a) e de seus hidrolisados obtidos a partir da enzima pepsina nos tempos de reação de 15 min (b), 30 min (c), 45 min (d), 60 min (e) e 120 min (f).

Nieto-Nieto et al. (2014) realizaram hidrólise de proteínas globulares de aveia com diferentes enzimas e os resultados das propriedades térmicas dos hidrolisados com Alcalase não foram fornecidos pelos autores, sugerindo a inexistência de transição térmica obtidos pelos termogramas de DSC.

No presente estudo, verificou-se que a temperatura de desnaturação do concentrado proteico de feijão preto foi de 92,3 °C (Tabela 4). Esse valor encontrado é superior a temperatura de desnaturação de 88,9 °C observado por Rui et al. (2011) em um cultivar de feijão preto do Canadá, mas inferior à temperatura de desnaturação de 93,2 °C, determinada por Yin et al. (2008) em isolado proteico de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

Tabela 4. Temperaturas de transição (°C) e entalpia (J/g) da análise térmica do concentrado proteico de feijão preto e de seus hidrolisados obtidos por diferentes tempos de reação com pepsina.

Tratamentos*	Temperaturas de transição (°C)			ΔH (J/g)
	Td	Tp	Tc	
Concentrado	86,4	92,3	97,1	13,1
15 min	90,5	95,2	99,3	8,1
30 min	89,6	94,8	99,2	8,1
45 min	89,3	94,4	98,5	8,3
60 min	90,4	95,5	99,9	8,3
120 min	92,8	96,9	101,5	9,8

* Td = temperatura inicial, Tp = temperatura do pico de desnaturação proteica, Tc = temperatura final e ΔH = Entalpia.

Houve um aumento na temperatura de desnaturação dos hidrolisados obtidos a partir da enzima pepsina, em comparação com o concentrado proteico de feijão (Figura 8). De acordo com Tang, Sol e Yin (2009), a temperatura de desnaturação é uma medida da estabilidade térmica e um valor de temperatura de desnaturação superior é geralmente associado a uma maior estabilidade térmica para uma proteína globular. Assim, é possível inferir que o tratamento com pepsina proporcionou um melhor arranjo de proteína globular de feijão preto, que foi, por sua vez, mais estável à desnaturação.

Por outro lado, houve uma redução na entalpia de desnaturação em hidrolisados tratados com pepsina, comparado com o concentrado de proteico de feijão preto (Figura 8). Isto é um indicativo de uma menor organização na estrutura

das proteínas (Zhao et al., 2011). A presença de sais, utilizado para controle de pH durante a hidrólise com pepsina, conforme relatado na Figura 5B, pode ter contribuído para o aumento da temperatura de desnaturação dos hidrolisados obtidos a partir da digestão com pepsina. De acordo com Yin et al. (2011), a presença de sais é favorável a uma organização mais compacta das proteínas, devido à redução da repulsão intermolecular eletrostática.

4.7. Capacidade de absorção de óleo

Os resultados de capacidade de absorção de óleo do concentrado e dos hidrolisados proteicos de feijão preto obtidos a partir da hidrólise com pepsina e Alcalase estão apresentados na Figura 9.

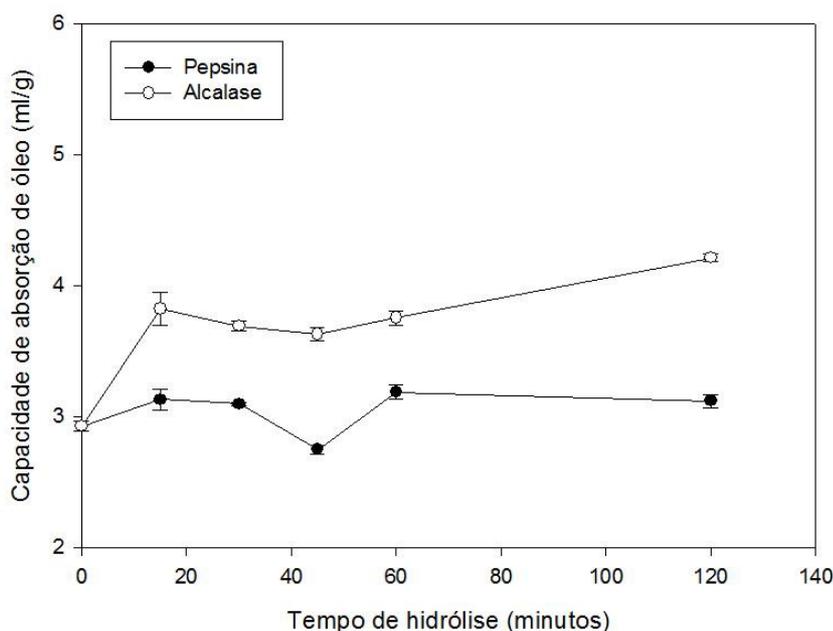


Figura 9. Capacidade de absorção de óleo do concentrado proteico de feijão preto e hidrolisados a partir de pepsina ou Alcalase.

A capacidade de absorção de óleo do concentrado de proteína do feijão preto (expressos na Figura 9 como "0 minuto" de hidrólise) foi de 2,9 mL de óleo por grama de proteína. Resultados semelhantes foram reportados por Morales-de-Leon et al. (2007). Esses autores encontraram valores de 3,26 e 2,74 mL de óleo por grama de proteína como a capacidade de absorção de óleo de feijão preto novo e

endurecido, respectivamente. Os hidrolisados proteicos obtidos com a enzima Alcalase apresentaram maior capacidade de absorção de óleo ($p < 0,05$) comparados com os hidrolisados obtidos a partir da enzima pepsina (Figura 9). Este resultado está de acordo com os dados de espectros de emissão de fluorescência, apresentados na Figura 7.

Yust et al. (2010) observaram um aumento na capacidade de absorção de óleo de hidrolisados proteicos de grão de bico obtidos a partir da hidrólise com Alcalase em comparação com o isolado proteico de grão de bico. Segundo os mesmos autores a hidrólise com Alcalase promoveu uma maior exposição de cadeias de hidrocarbonetos (não polares), o que contribuiu para aumentar a capacidade de absorção de óleo.

Além disso, no presente estudo, o teor de proteínas dos hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase foi superior ao teor de proteínas dos hidrolisados obtidos com a enzima pepsina (Figura 5a), isso pode ter contribuído também para a absorção de óleo superior desse tratamento. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na absorção de óleo para os hidrolisados com Alcalase entre os tempos de reação de 15, 30, 45 e 60 min de reação. No entanto, houve um aumento da capacidade de absorção de óleo, a medida que a hidrólise avançou de 60 para 120 min.

Os hidrolisados proteicos com enzima pepsina não apresentaram diferenças ($p < 0,05$) na capacidade de absorção de óleo em função do tempo de hidrólise, com exceção do tempo de 45 min, que apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) na capacidade de absorção de óleo. A baixa capacidade de absorção de óleo do hidrolisado proteico de pepsina em 45 min pode ser um resultado da maior exposição de cadeias polares, que são menos propensas a fazer ligação com o óleo.

4.8. Estabilidade de emulsão

Os resultados de estabilidade das emulsões estão apresentados na Figura 10. As emulsões foram preparadas com 1% de concentrado proteico ou hidrolisados proteicos. Após a produção das emulsões, os tubos foram selados e mantidos no

escuro, sem agitação, à temperatura ambiente, e a estabilidade das emulsões foi visualmente monitoradas durante 30 dias de armazenamento. Procedimento similar foi adotado por Kimura et al. (2008). Os tubos foram identificados da seguinte maneira: tubo (A) concentrado proteico de feijão preto, tubos B, C, D, E e F para hidrolisados obtidos a partir da enzima pepsina com 15, 30, 45, 60 e 120 min de reação, respectivamente. Os tubos para os hidrolisados com Alcalase foram identificados como G, H, I, J e K, para os mesmos tempos de hidrólise 15, 30, 45, 60 e 120 min, respectivamente.

As emulsões elaboradas a partir de hidrolisados proteicos de Alcalase foram mais estáveis do que os de hidrolisados com pepsina. Yust et al. (2010) relataram um aumento na estabilidade das emulsões preparadas com hidrolisado de proteínas de grão de bico obtidos a partir da hidrólise com Alcalase com baixo grau de hidrólise. Enquanto os hidrolisados de Alcalase apresentavam alta turbidez e sem separação de fases durante 30 dias de armazenamento, os hidrolisados com pepsina apresentaram separação de fases no primeiro dia de armazenamento (Figura 10).

No primeiro dia de armazenamento, a separação de fases das emulsões preparadas com os hidrolisados obtidos com a enzima pepsina foi bastante visível e conforme aumentou o tempo de hidrólise houve aumento nessa separação. Além disso, os hidrolisados obtidos com a pepsina apresentaram intensa flotação e sedimentação no décimo dia, apenas com exceção do hidrolisado obtido com 45 min de reação (Figura 10). Estes resultados podem ser relacionados com os dados dos espectros de emissão de fluorescência (Figura 7a), onde foi possível verificar a redução dos valores de emissão de fluorescência (relacionado à hidrofobicidade), para os hidrolisados tratados com pepsina com o aumento do tempo de hidrólise.

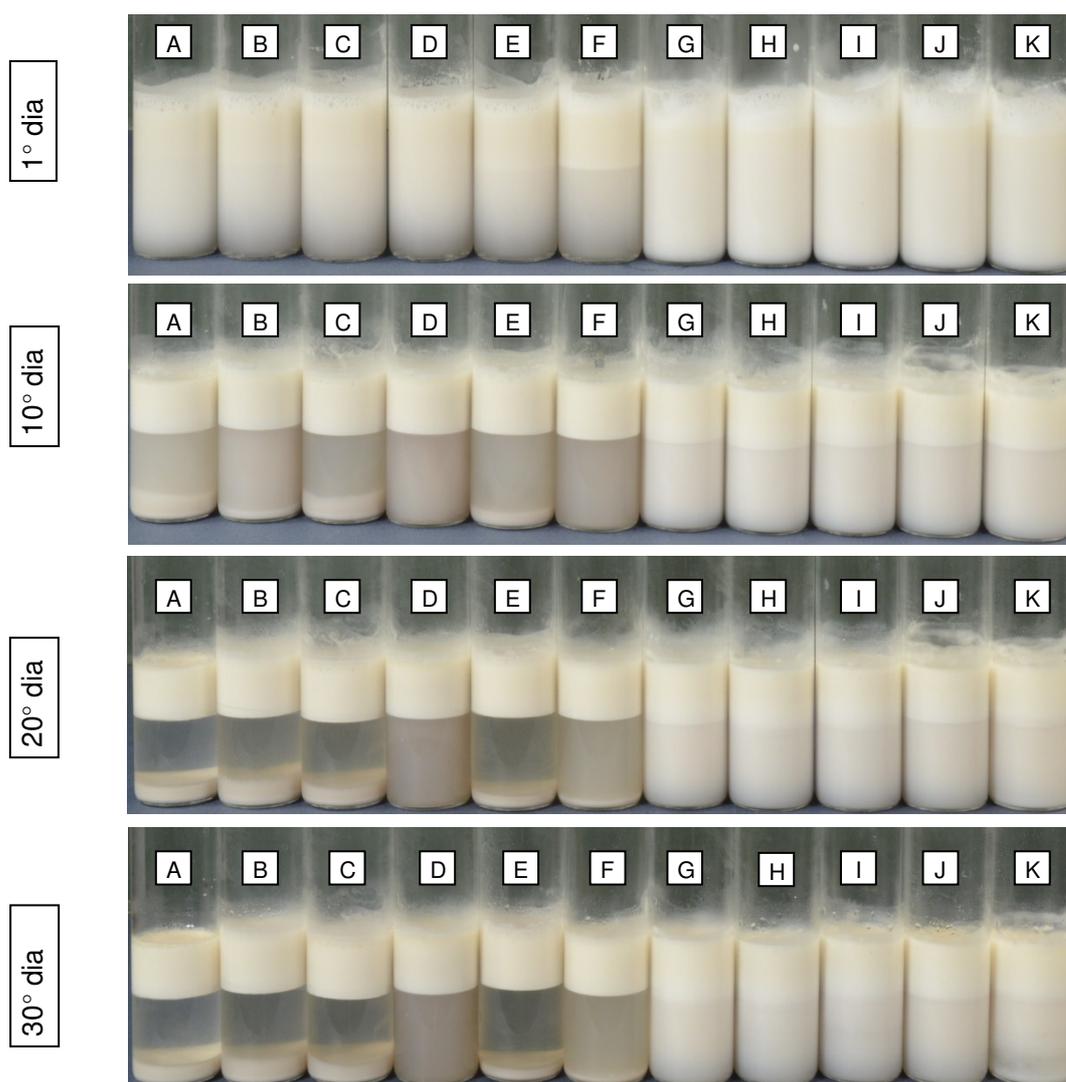


Figura 10. Estabilidade de emulsão do concentrado proteico de feijão preto (A) e seus hidrolisados com pepsina (B-F) e com Alcalase (G-K) durante 30 dias de armazenamento.

A redução na hidrofobicidade de hidrolisados proteicos de lentilha obtidos a partir da hidrólise com tripsina foi acompanhada por uma redução na estabilidade da emulsão (AVRAMENKO; LOW; NICKERSON, 2013). Resultados semelhantes foram relatados por Betancur-Ancona et al. (2014). Esses autores observaram uma redução na estabilidade das emulsões preparadas com hidrolisados proteicos de feijão preto envelhecido (*Phaseolus vulgaris* L.), obtidos com a enzima pancreatina em função do tempo de hidrólise.

O hidrolisado com pepsina obtido com 45 min de hidrólise apresentou um comportamento diferente de estabilidade, quando comparado aos demais tratamentos com pepsina. Entretanto, o mesmo hidrolisado com pepsina apresentou a menor capacidade de absorção de óleo, conforme apresentado na Figura 9, o que pode estar relacionado com o seu comportamento de emulsão. Apesar de apresentar separação de fases a emulsão preparada com hidrolisado de pepsina com 45 min, não houve flotação durante todo o período de armazenamento apresentando maior estabilidade, uniformidade de emulsão e turvação do que as demais emulsões preparadas a partir de outros hidrolisados com pepsina.

4.9. Atividade antioxidante

As propriedades antioxidantes dos hidrolisados obtidos com diferentes tempos de hidrólise estão apresentados na Figura 11. A atividade antioxidante dos hidrolisados foram avaliados com base em sua capacidade de eliminar radical livres ABTS^{•+} (Figura 11a) e DPPH (Figura 11b).

Os hidrolisados proteicos de feijão tratados com Alcalase, em todos tempos de reação, tiveram atividade antioxidante superiores para inibição dos radicais ABTS^{•+}, quando comparados ao concentrado proteico de feijão preto (controle). A maior capacidade de captar os radicais ABTS^{•+} foi observada com 30 min de hidrólise (Figura 11a). Este comportamento sugere que um menor grau de hidrólise com Alcalase pode ser favorável a atividade antioxidante para inibição dos radicais ABTS^{•+}.

Por outro lado, os hidrolisados proteicos obtidos com a ação da pepsina, apresentaram valores inferiores que o controle e conseqüentemente menores que os hidrolisados proteicos de Alcalase (Figura 11a).

Ao se analisar a Figura 11b da atividade antioxidante para inibição do radical DPPH, pode-se observar que os hidrolisados proteicos obtidos com a pepsina apresentaram valores superiores aos hidrolisados com Alcalase. Os tempos de hidrólise não influenciaram na atividade antioxidante para a pepsina ($p < 0,05$). No entanto, para a os hidrolisados com Alcalase, o tempo de hidrólise reduziu a capacidade de inibição dos radicais DPPH.

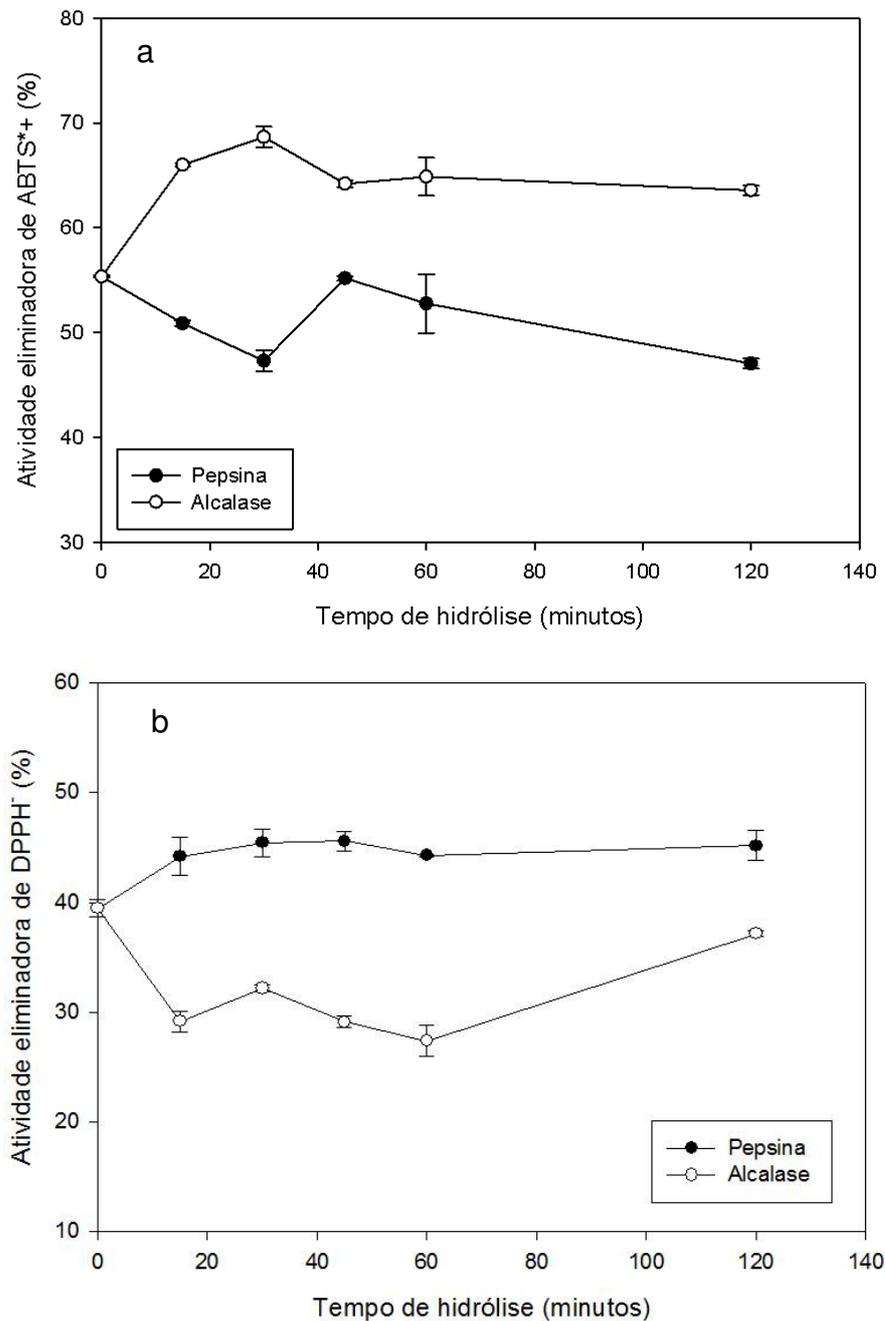


Figura 11. Atividade antioxidante do concentrado e hidrolisados proteicos de feijão preto quantificados pela inibição de (a) ABTS^{•+} e de (b) DPPH.

Estes resultados indicam que a hidrólise enzimática, tanto com pepsina quanto com Alcalase é capaz de liberar peptídeos que tem atividade antioxidante, com diferentes capacidades de captação dos radicais livres ABTS^{•+} e DPPH.

A maior atividade antioxidante pelo método de ABTS^{•+}, dos hidrolisados proteicos obtidos com a ação da Alcalase é atribuída a capacidade de ligação do ABTS^{•+} com os radicais hidrofílicos e hidrofóbicos da proteína (RE et al., 1999). Como pode-se verificar na Figura 7a, os hidrolisados proteicos com a enzima Alcalase apresentaram maior fluorescência relativa, indicando maior hidrofobicidade dos hidrolisados.

Valdez-Ortiz et al. (2012) estudaram hidrolisados proteicos de feijão Azufrado (*Phaseolus vulgaris*) obtidos com a enzima pepsina durante 2 horas de hidrólise e verificaram 44% de inibição do radical DPPH e 73% de inibição do radical ABTS^{•+}, sendo estes resultados semelhantes aos verificados neste trabalho.

Segundo Justo et al. (2008), que compararam as duas metodologias de atividade antioxidante, verificaram que o radical ABTS^{•+} é mais sensível à presença de compostos antioxidantes e desta forma, a porcentagem da inibição neste sistema é maior quando comparada com a inibição do radical DPPH, nas mesmas concentrações do composto ativo.

De acordo com Sarmadi e Ismail (2010), a hidrólise enzimática de proteínas pode ser aplicada para produzir peptídeos com atividades biológicas, no entanto, uma hidrólise intensa pode causar um efeito contrário, reduzindo assim a capacidade antioxidantes do composto.

5. CONCLUSÕES

O concentrado proteico de feijão preto hidrolisado com pepsina apresentou maior grau de hidrólise, menor conteúdo proteico e maior conteúdo de cinzas, comparado com a hidrólise por Alcalase. O perfil de aminoácidos dos hidrolisados proteicos no máximo tempo de reação de hidrólise (120 mim), apresentaram conteúdo semelhantes de aminoácidos ao concentrado proteico de feijão preto.

Os hidrolisados proteicos de feijão preto obtidos com a enzima pepsina apresentaram menor fluorescência relativa, quando comparados com os hidrolisados obtidos com a Alcalase, entretando maior que do concentrado proteico de feijão, com exceção do tempo de hidrólise de 120 mim. Além disso, os hidrolisados proteicos obtidos com a pepsina apresentaram pico de desnaturação proteica,

enquanto os hidrolisados por alcalase não apresentaram esse pico na análise térmica, devido a perda do arranjo tridimensional da proteína.

A hidrólise enzimática com a enzima alcalase melhorou a estabilidade de emulsão do concentrado proteico de feijão preto. Esta melhora se deve à maior hidrofobicidade do hidrolisado de Alcalase comparado ao concentrado proteico e ao hidrolisado com pepsina. Este resultado fomenta estudos futuros visando a aplicação do hidrolisado proteico de feijão preto obtidos por Alcalase em produtos alimentares.

O concentrado proteico de feijão preto hidrolisado por Alcalase (30 min) apresentaram maior capacidade antioxidante do que a proteína não hidrolisada e os hidrolisados pela ação de pepsina.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC. American Association of Cereal Chemists Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. **American Association of Cereal Chemists**, Inc, St. Paul, MN, USA, 2000.
- ADAMSON, N. J.; REYNOLDS, E. C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 3, p. 202-207, 1996.
- ADLER-NISSEN, J. The continuous wok – a new unit operation in industrial food processes. **Journal of Food Process Engineering**, v. 25, n.1, p. 435-453, 2002.
- AGYEI, D., DANQUAH, K. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 272-7, 2011.
- AHN, C. B.; JE, J. Y.; CHO, Y. S. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. **Food Research International**, v. 49, v. 1, p. 92-98, 2012.
- AIDER, M.; BARBANA, C. Canola proteins: Composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity - A practical and critical review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 1, p. 21-39, 2011.
- ALASHI, A. M.; BLANCHARD, C. L.; MAILER, J. R.; AGBOOLA, S.; MAWSON, J. A.; HE, R.; GIRGIH, A.; ALUKO, R. E. Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 146, n. 1, p. 500-506, 2014.
- AL-SHEHRI, M., ABDULRAHMAN; MOSTAFA, YASSER, S. Production and some properties of protease produced by *Bacillus licheniformis* isolated from Tihamet Aseer, Saudi Arabia. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1631-1635, 2004.
- AOAC. **Official methods of analysis**. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists, 18 ed . 2006.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3 ed. Viçosa, UFV, 2006. 601 p.

- ARCAN, I.; YEMENICIOGLU, A. Effects of controlled pepsin hydrolysis on antioxidant potential and fractional changes of chickpea proteins. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 140-147, 2010.
- AVRAMENKO, N. A.; LOW, N. H.; NICKERSON, M. T. T. The effects of limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and emulsifying properties of a lentil protein isolate. **Food Research International**, v. 52, n.1, p. 162-169, 2013.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The merops database as a peptidase information system. **Journal of Structural Biology**, v. 134, n.2, p. 95-102, 2001.
- BETANCUR-ANCONA, D., MARTÍNEZ-ROSADO, R., CORONA-CRUZ, A., CASTELLANOS-RUELAS, A., JARAMILLO-FLORES, M. E., CHEL-GUERRERO, L.. Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 128-137, 2014.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. W. H. Freeman and company, London, 2002. **Biochemistry**. 5th edition.
- BIASUTTI, E. A.; LOPES, D. C.; SOUZA, M. W. S.; CAMPOS, R. B. D.; SEGALL, S. D.; SILVESTRE, M. P. C. Obtenção de hidrolisados do soro de leite com alto teor de oligopeptídeos utilizando-se a subtilisina. **Brazilian Journal Food Techonololy**, v. 10, n. 4, p. 225-232, 2007.
- BOYE, J.; ZARE, F.; PLETCH, A. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. **Food Reserch International**, v. 43, n. 2, p. 414-431, 2010.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, v.1, p. 25-30, 1995.
- BRIJ PAL SINGH, B. P.; VIJ, S.; HAT, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, n.1, p. 171-179, 2014.
- BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus spp.*) – model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.

- CARRASCO-CASTILLA, J.; HERNANDEZ-ALVAREZ, A. J.; JIMENEZ-MARTINEZ, C., JACINTO-HERNADEZ, C.; ALAIZ, M. GIRON-GALLE, J.; VIOQUE, J.; DAVILA-ORTIZ, G. Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1157-1164, 2012.
- CARVALHO, A. V.; BASSINELO, P. Z.; MATTIETTO, R. A.; CARVALHO. R. N.; RIOS, A. O.; SECCADIO, L. L. Processamento e caracterização de snack extrudado a partir de farinhas de quirera de arroz e de bandinha de feijão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 72-83, 2012.
- CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran proteins concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n.1, p. 592-597, 2006.
- CHEN, G. T.; ZHAO L.; ZHAO, L. Y.; CONG, T.; BAO, S. F. In vitro study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate. **Journal Science Food Agricultural**, v. 87, n. 2, p. 357-362, 2007.
- CHRONAKIS, I. S. Network formation and viscoelastic properties of commercial soy protein dispersions: effect of heat treatment, pH and calcium ions. **Food Research International**, v. 29, n. 2, p. 123-134, 1996.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends Food Science Technology**, v. 11, n. 7, p. 254 - 262, 2000.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, décimo levantamento, setembro de 2014. Brasília: Conab, 2014
- DAMODARAN, S. Amino acids, peptides, and proteins. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 3 ed.. p. 321-428, 1996.
- DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysate. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 48, n. 3, p. 191-200, 1997

- DURAK, A.; BARANIAK, B.; JAKUBCZYK, A.; ŚWIECA, M. Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2177-2183, 2013
- ELIAS, R. J.; SARAH S. K.; ERIC A. D. Antioxidant activity of proteins and peptides, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5 p. 430-441, 2008.
- EMBRAPA. Sistemas de Produção, Ed. 2, 2010. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm>>. Acesso em 15 de setembro de 2014.
- FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P. Food protein functionality: A comprehensive approach. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1853-1864, 2011.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Crops primary equivalent: **dry beans supply rank in the world**, by quantity, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/609/default.aspx#ancor>>. Acesso em 15 de setembro de 2014.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. 307p.
- FRANZESE T.A. Medical nutrition therapy for rheumatic disorders. In: Krause's **Food, Nutrition & Diet Therapy**, 10 ed. W.B. Saunders. Philadelphia. p 970-986, 2000.
- FRITZ, M.; VECCHI, B.; RINALDI, G.; AÑÓN, M.; Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity, **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 878-884, 2011.
- GUAN, X.; YAO, H.Y.; CHEN, Z.X.; SHAN L.A.; ZHANG M.D. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 163-170, 2007.
- HARTMEIER, A.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 1019-1032, 2008.
- HETTIARACHCHY, N. S. **Food proteins and peptides-chemistry, functionality, interactions, and commercialization**. Estados Unidos da America, 1 ed., 2012.

- ILLANES, A. **Enzymes biocatalisis-principles and aplicaciones**, Valparaiso: Springer, 1 ed, 2008
- IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **Enzyme Nomenclature**, 6 ed., 1992. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>>. Acesso em: 15 setembro 2014.
- JAMDAR, S. N.; RAJALAKSHMI, V.; PEDNEKAR, M. D.; JUAN, F.; YARD, V.; SHARMA, A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v.121, n. 1, p. 178-184, 2010.
- JE, J. Y.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. **Food Research International**, v. 38, n. 1 p. 45-50, 2005.
- JUNG, S.; MURPHY, P. A.; JOHNSON, L. A. Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 2, p. 180-187, 2005.
- JUNIOR, C. O. L.; AMORIM, A. C. P.; SOUZA, W. S.; SILVA, V. D. M.; SILVA, M. R.; SILVESTRE, M. P. C. Otimização da extração enzimática da proteína do feijão. **Acta Scientiarum technology**, v. 32, n. 3, p. 319-325, 2010.
- JUSTO, O. R.; MORAES, A. M.; BARRETO, G. P. M.; MERCADANTE, A. Z.; ROSA, P. T. V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1699-1705, 2008.
- KELLY, S. M.; PRICE, N. C. Overview of protein folding. In G. Taylor **Current Protocols in Protein Science**, 2 ed, p. 2010.1-20.10, 2006.
- KIMURA, A., FUKUDA, T., ZHANG, M., MOTOYAMA, S., MARUYAMA, N., UTSUMI, S. Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from pea, fava bean, cowpea, and French bean with those of soybean-french bean 7S globulin exhibits excellent properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10273-10279, 2008.

- KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **Internacional Dairy Journal**, v. 15, n.9, p. 945-960, 2006.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v. 227, n.1, p. 680-685, 1970.
- LAJOLO, F. M., GENOVESE, M. I.; MENEZES, E. W. Qualidade nutricional. In: **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996
- LAM, R. S.; NICKERSON, M. T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 975-984, 2013.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier. 1995. p. 761.
- LI, W.; SHU, C.; YAN, S.; SHEN, Q. Characteristics of sixteen mung bean cultivars and their protein isolates. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 6, p. 1205-1211, 2010
- LIN, L.; HARNLY, J.; PASTOR-CORRALES, M. S.; LUTHRIA, D. L. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 399–410, 2008.
- LIN, Y-H.; TSAI, J-S.; HUNG, L-B.; PAN, B. S. Hypocholesterolemic effect of compounded freshwater clam protein hydrolysate and Gracilaria. **Food Chemistry** Food Chemistry, v. 123, n. 1, p. 395-399, 2010.
- LIU, Z.; DONG, S.; XU, J.; ZENG, M.; SONG, H.; ZHAO, Y. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. **Food Control**, v. 19, n. 1, p. 231-235, 2008.
- 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.
- MARLETT, A. J.; McBURNEY, M. I.; SLAVIN, J. L. Position of the American dietetic association: health implications of dietary fiber. **Journal of American Dietetic Research**, v. 102, n. 2, p. 993-1000, 2002.

- MARTINEZ K.; BAEZA, R.I.; MILLÁN, F.; PILOSOFF, A. M.R. Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams, **Food Hydrocolloids**, v.19, n. 3, p. 361-369, 2005.
- MCCLEMENTS, D. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 611-649, 2007.
- MCDONALD-WICKS, L. K, WOOD, L. G, GARG, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal Science Food Agricultural**, v. 86, n. 13 p. 2046-2056, 2006.
- MEDINA-GODOY, S.; AMBRIZ-PÉREZ, D. L.; FUENTES-GUTIÉRREZ, C. L.; GERMÁN-BÁEZ, L. J.; GUTIÉRREZ-DORADO, R., REYES-MORENO, C.; VALDEZ-ORTIZ, A. Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidativa activities and functional characterization of proteína hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 1974-1981, 2012.
- MEGÍAS, C.; YUST, M.; PEDROCHE, J.; LQUARI, H.; GIRON-CALLE, J., ALAIZ, M. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus L.*) protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1928-1932, 2009.
- MONTOYA, C. A.; LALLÈS, J. P.; BEEBE, S.; LETERME, P. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 443-449, 2010.
- MORÁLES-DE-LEÓN, J. C.; VÁZQUEZ-MATA, N.; TORRES, N.; GIL-ZENTENO, L.; BRESSANI, R. Preparation and characterization of proteína isolate from fresh and hardened beans (*Phaseolus vulgaris L.*). **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 96-102, 2007.
- MORALES-DE-LEÓN, J.; BOURGES, H.; CAMACHO, M. E. Amino acid composition of some Mexican foods. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 55, n. 1, p. 172-186, 2005.

- MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Antioxidant properties of ultrafiltration recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 447-456, 2006.
- MOURE, A.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ; PARAJO, J. C. Functionality of oilseed protein products: **A review. Food Research International**, v. 39, n. 1, p. 945-963, 2006.
- MUNDI S.; ALUKO R. E. Physicochemical and functional properties of kidney bean albumin and globulin protein fractions **Food Research International Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 299-306, 2012.
- NIETO-NIETO, T. V.; WANG, Y. X.; OZIMEK, L.; CHEN, L. Effects of partial hydrolysis on structure and gelling properties of oat globular proteins. **Food Research International**, v. 55, n. 1, p. 418-425, 2014.
- O'KEEFFE, M. B.; FITZGERALD, R. J.; Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells. **International Dairy Journal International Dairy Journal**, v. 36, n. 1, p. 128-135, 2014.
- OGUNWOLU, S.O.; HENSHAW, F.O.; MOCK H-P.; SANTROS, A. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale L.*) nut. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 852-858, 2009.
- ONUJ, J. O.; GIRGIH, A. T.; ALUKO, R. E.; ALIANI, M. Inhibitions of renin and angiotensin converting enzyme activities by enzymatic chicken skin protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 260-267, 2014.
- OOMAH, B. D.; PATRAS, A.; RAWSON, A.; SINGH, N.; COMPOS-VEGA, R. Chemistry of pulses. In: **Pulse foods: processing, quality and technological applications**. Academic press, p. 9-56, 2011.
- ORDOÑEZ, J. A. **Tecnología de Alimentos** – Componentes dos Alimentos e Processos, Porto Alegre: Editora Artmed, v. 1, 2005.
- ORTIZ-VALDEZ, A.; FUENTES-GUTIÉRREZ, C. I.; GERMÁN-BÁEZ, L. J.; GUTIÉRREZ-DORADO, R.; MEDINA-GODOY, S. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-

- inhibitory and antioxidative characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 91-96, 2012.
- PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L. S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005.
- PAIN, R. H. Determining the CD spectrum of a protein. In Ronald E. W., Terry E. A., E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, P. Sporns, **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. 351-355, 2003.
- PAL, R. Rheology of simple multiple emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 1, p. 41-60, 2011.
- PALLARÈS, I.; VENDRELL, J.; AVILÈS, F. X.; VENTURA, S. Amyloid fibril formation by a partially structured intermediate state of α -chymotrypsin. **Journal of Molecular Biology**, v. 342, n. 1, p. 321-331, 2004.
- PARK, S. J.; KIM, T.W.; BAIK, B-K. Relationship between proportion and composition of albumins, and in vitro protein digestibility of raw and cooked pea seeds (*Pisum sativum L.*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 10, p. 1719-1725, 2010.
- PEÑA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2952-2956, 2002.
- PENG, X.; KONG, B.; XIA, X.; LIU, Q. Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 5, p. 360-365, 2010.
- PIRES, C. V. **Caracterização bromatológica e digestibilidade in vitro de proteínas de cultivares *Phaseolus vulgaris*, L.** Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.
- PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; CRUZ, G. A. D. R.; MENDES, F. Q.; DE REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A. Composição físico-química de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*). **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 157-162, 2006.

- POWNALL, T. L.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Amino acid composition and anti-oxidant properties of pea seed (*Pisum sativum L.*). Enzymatic protein hydrolysate fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4712-4718, 2010.
- RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, W. K.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Research International**, v. 38, n. 1, p. 175-182, 2005.
- RANATHUNGA, S.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. K. Purification and characterization of antioxidantative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 1, p. 310-315, 2006.
- RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.
- REED, G. **Enzymes in food processing**. 2.ed. New York : Academic Press, Food Science and Technology. 1975. 573 p.
- ROBLES-RAMÍREZ, M. C.; RAMÓN-GALLEGOS E.; MORA-ESCOBEDO, R.; TORRES-TORRES, N. A peptide fraction from germinated soybean protein down-regulates PTTG1 and TOP2A mRNA expression, inducing apoptosis in cervical cancer cells. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 9, n. 4, p. 255-263.
- RODRÍGUEZ- AMBRIZ, S. L.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ,G.; GONZÁLEZ, J. E. C.; TRUJILLO, J. P. P. Composition and functional properties of *Lupinus campestris* protein isolates. **Plants Foods for Human Nutrition**, v.60, n. 1, p.99-107, 2005.
- ROY, F.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. **Food Research International**, v. 43, n.2, p. 432–442, 2010.
- RUI, X.; BOYE, J.; RIBEREAU, S.; SIMPSON, B. K.; PRASHER, S. O. 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.
- SANTOS, S. D.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 72-77, 2009.
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010.
- SATHE, S. K. Dry bean protein functionality. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 175-223, 2002.
- SEGURA-CAMPOS, M.; RUIZ-RUIZ, J.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D. Antioxidant activity of *Vigna unguiculata* L. walp and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris* L. protein hydrolysates. **CyTA – Journal of Food**, v.1, n. 3, p.1-8, 2012.
- SGARBIERI, V. C.; **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades de gradações, modificações**. Livraria Varela – São Paulo, 1996.
- SIGMA ALDRICH, Specification sheet, Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p6887?lang=en®ion=CA> . Acesso em 15 de setembro de 2014.
- SILVA, A. G.; ROCHA, L. C.; CANNIATI BRAZACA, S. G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 24, n. 4, p. 591-598, 2009.
- SILVA, M. A.; NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J. Frações protéicas e globulina principal de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 12, n. 1, p. 131-149, 2001.
- SILVA, R. F.; ASCHERI, J. L. R. Extrusão de quirera de arroz para uso como ingrediente alimentar. **Brazilian Journal of Food Science and Technology**, v. 12, n. 3, p. 190-199, 2009.

- SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1484-1491, 2007.
- SMRIGA, M.; ANDO, T.; AKUTSU, M.; FURUKAWA, Y.; MIWA, K.; MORINAGA, Y. Oral treatment with L-lysine and L-arginine reduces anxiety and basal cortisol levels in healthy humans. **Biomedical Research**, v.28, n. 2, p. 85-90, 2007.
- SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R.; ANON, M. C. Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 2471-2479, 1995.
- TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, n. 1, p. 227-258, 2004
- 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. 1, p. 1771-1778, 2009.
- TANG, C-H.; MA, C-Y. Heat-induced modifications in the functional and structural properties of vicilin-rich protein isolate from kidney (*Phaseolus vulgaris* L.) bean. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 859-866, 2009.
- TORO, M. A. N.; GARCIA-CARRENO, F. **Evaluation of the progress of protein hydrolysis**, Food Analytical Chemistry, 1 ed. p. 141-154, 2005
- TORRUCO-UCO, J.; CHEL-GUERRERO, L.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; DÁVILA-ORTÍZ, G., BETANCUR-ANCONA, D. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 1597-1604, 2009.
- VALDEZ-ORTIZ, A.; FUENTES-GUTIÉRREZ, C. I.; GERMÁN-BÁEZ, L. J.; GUTIÉRREZ-DORADO, R.; MEDINA-GODOY, S. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 91-96, 2012.

- VIOQUE J.; SÁNCHEZ-VIOQUE R.; CLEMENTE A.; PEDROCHE J.; MILLAN F. Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77 , n. 1, p. 447-450, 2000.
- VITAL, A. L.; GONZÁLEZ-MEJÍA, E.;VERMONT P. D.; LOARCA-PIÑA, G. Peptides in common bean fractions inhibit human colorectal cancer cells. **Food Chemistry**, v. 157, n. 1, p. 347-355, 2014
- VO, T-S.; RYUB, B.; KIMA, S-E. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1336-1346, 2013
- WAGNER, J. R; AÑON, M. C. Influence of denaturation degree, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates, **Journal of Food Science**, v. 55, n. 3, p. 765–770, 1990.
- WAGNER, J. R; SORGENTINI, D. A.; AÑON, M. C. Effect of physical and chemical factors on rheological behavior of commercial soy protein isolates: protein concentration, water imbibing capacity, salt addition, and thermal treatment, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 10, p. 1930-1937, 1992.
- WEISDORF, S. A. Nutrition in liver disease. In E. Lebenthal, **Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy** Raven Press, New York.: Raven Press, 2 ed, p. 665-675, 1998.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Protein and Amino Acid Requeriments in Humam Nutrition: FAO/WHO/UNU, 2002. Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_935_eng.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2009
- WINHAM, D. M.; HUTCHINS, A. M.; MELDE, C. L. Pinto bean, navy bean, and black-eyed pea consumption do not significantly lower the glycemic treatment in normoglycemic adults. **Nutrition Research**, v. 27, n. 9, p. 535-541, 2007.
- XIA Y, BAMDAD F, GÄNZLE M, CHEN L. Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**; v.134, n. 3, 1509–1518, 2012.

- YIN, S.-W.; TANG, C.-H.; WEN, Q.-B.; YANG, X.-Q.; LI, L. 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.
- YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing. **Food Chemistry**, v. 103, n.1, p. 21-129, 2007.
- YUST, M.; DEL, M.; PEDROCHE, J.; MILLÁN-LINARES, M. DEL C.; ALCAIDE-HIDALGO, J. M.; MILLÁN, F. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. n. 4, **Food Chemistry**, v. 122, p. 1212-1217, 2010.
- ZAVAREZE, E. R.; TELLES, A. C.; HALAL, S. M.; ROCHA, M.; COLUSSI, R.; ASSIS, L. M.; CASTRO, L. S.; DIAS, A. R. G.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 841-848.
- ZHANG, M.; MU, T.-H.; SUN, M.-J.; Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. **Journal of Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 191–200, 2014.
- ZHAO, G.; LIU, Y.; ZHAO, M.; REN, J.; YANG, B. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1438-1443, 2011.
- ZHAO, Q.; SELOMULYA, C.; XIONG, H.; CHEN, X. D.; RUAN, X.; WANG, S.; XIE, J.; PENG, H.; SUN, W. Comparison of functional and structural properties of native and industrial process-modified proteins from long-grain indica rice. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 1, p. 568–575, 2012.
- ZHOU, K.; SUN, S.; CANNING, C. Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration, **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1192–1197, 2012.