



# COMO DIFERENTES PROCESSOS TECNOLÓGICOS PODEM AFETAR AS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE HIDROLISADOS PRODUZIDOS A PARTIR DE PROTEÍNAS VEGETAIS?

**Palavras-Chave:** peptídeos bioativos, processos tecnológicos, atividade antioxidante.

**Autores:** Cláudia Akel Ferruccio [FEA/UNICAMP], Caroline Lopes [FEA/UNICAMP]

Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro [FEA/UNICAMP]

---

## INTRODUÇÃO:

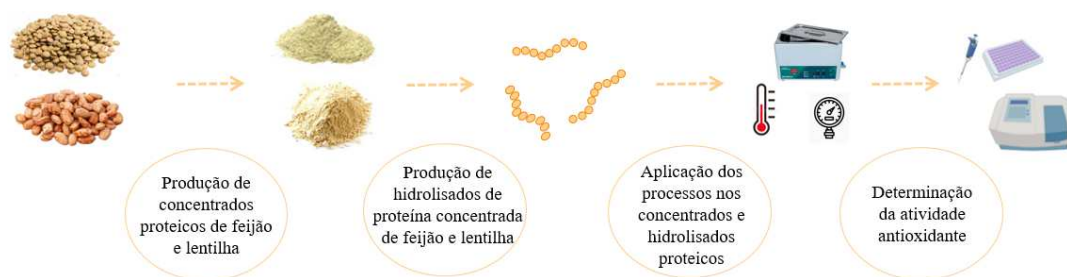
Fontes alternativas de proteínas, incluindo vegetais, insetos e micro-organismos, fazem parte do escopo de diferentes pilares e objetivos da segurança e da sustentabilidade alimentar. As leguminosas, como o feijão e a lentilha, têm sido consideradas alimentos funcionais ricos em proteínas e compostos bioativos<sup>1,2</sup>. Essas proteínas, quando hidrolisadas, podem gerar peptídeos com atividades antioxidantes, antidiabéticas, antimicrobianas e anti-hipertensivas, funções estas não desempenhadas pela proteína nativa<sup>3</sup>.

Tão importante quanto estudar as alterações promovidas pelo tratamento enzimático sobre as proteínas, é entender como as operações unitárias na indústria de alimentos podem afetar as propriedades intrínsecas dos hidrolisados proteicos. Além do tradicional processamento térmico, tecnologias emergentes de esterilização comercial como a alta pressão e o ultrassom vêm sendo exploradas por causarem menores alterações sensoriais e nutricionais e atuarem de forma eficiente na conservação dos alimentos. Tratamentos prévios com essas tecnologias vêm sendo relatados como uma eficiente estratégia para aumentar a extensão da hidrólise e a liberação de peptídeos bioativos<sup>3</sup>. No entanto, os efeitos desses processos sobre as propriedades bioativas de hidrolisados proteicos ainda é pouco relatado na literatura. Como uma forma de entender os efeitos de diferentes tecnologias sobre as propriedades biológicas de hidrolisados proteicos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar como processos envolvendo tratamento térmico, ultrassom e microfluidização afetam a atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de feijão carioca e lentilha.

## METODOLOGIA:

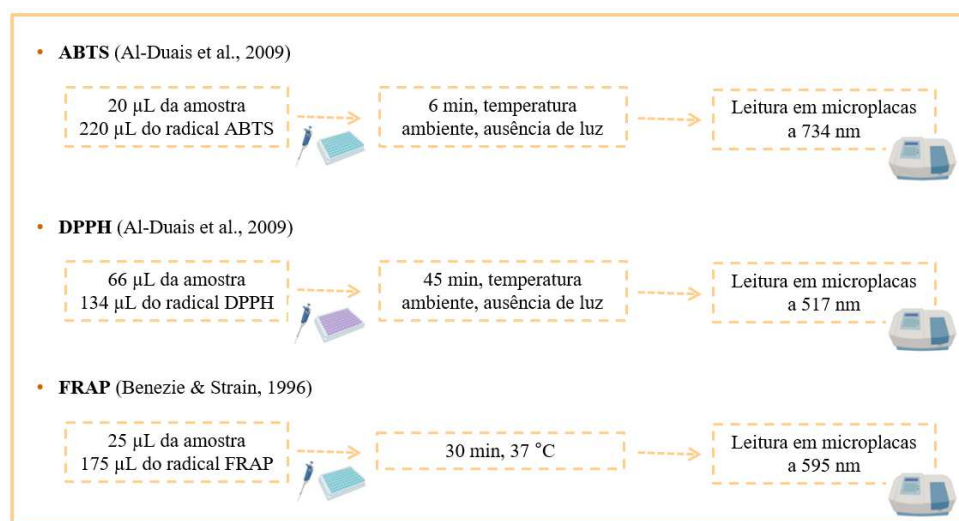
As amostras de feijão carioca (*Phaseolus vulgaris*) e lentilha (*Lens culinaris*) foram adquiridas no mercado local da cidade de Campinas (São Paulo, Brasil). As proteínas foram extraídas e os concentrados proteicos obtidos foram utilizados como substratos para hidrólise enzimática e demais processamentos. As proteases comerciais utilizadas na hidrólise foram a Flavourzyme® 500L de *Aspergillus oryzae* e Alcalase® 2.4L de *Bacillus licheniformis* (Sigma Aldrich).

Os produtos obtidos a partir do feijão e da lentilha foram avaliados sob duas perspectivas: 1) aplicação dos processos tecnológicos (tratamento térmico a 75°C e em ebulição, ultrassom e microfluidização) como pré-tratamentos (anterior à hidrólise enzimática) e 2) aplicação dos processos tecnológicos (tratamento térmico a 75°C e em ebulição, ultrassom e microfluidização) como pós-tratamentos (posterior à hidrólise enzimática). A Figura 1 mostra o esquema simplificado das etapas do projeto.



**Figura 1.** Esquema simplificado das etapas envolvidas no projeto.

As atividades antioxidantes dos concentrados e hidrolisados proteicos dos substratos, submetidos ou não aos tratamentos, foram determinadas a partir do esquema presente na Figura 2. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, realizado com auxílio do software Minitab® 19 de Minitab Inc. (Pensilvânia, EUA).



**Figura 2.** Determinação das propriedades antioxidantes dos concentrados e hidrolisados proteicos de feijão e lentilha.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos para as atividades antioxidantes dos concentrados e hidrolisados proteicos de feijão carioca e de lentilha submetidos aos diferentes processos tecnológicos estão representados, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2. As avaliações das amostras submetidas à hidrólise enzimática e aos diferentes processos permitiram verificar tanto o efeito isolado da hidrólise enzimática nas amostras tratadas e não tratadas quanto o efeito dos processamentos sobre as propriedades antioxidantes dos concentrados e dos hidrolisados proteicos.

**Tabela 1.** Propriedades antioxidantes mensuradas pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP para as amostras de feijão submetidas à hidrólise enzimática e aos diferentes processos tecnológicos.

Propriedades antioxidantes ( $\mu\text{mol TE/g}$ )			
Amostras	ABTS	DPPH	FRAP
Proteína concentrada	39,77 $\pm$ 3,78 <sup>b</sup>	13,17 $\pm$ 1,27 <sup>b</sup>	0,67 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>
Proteína hidrolisada	94,97 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	16,01 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	8,14 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>
Ultrassom			
Controle	39,82 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	11,13 $\pm$ 1,37 <sup>b</sup>	2,18 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>
Pré-tratamento	99,83 $\pm$ 2,90 <sup>a</sup>	24,52 $\pm$ 2,85 <sup>a</sup>	7,22 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>
Pós-tratamento	102,97 $\pm$ 5,75 <sup>a</sup>	22,22 $\pm$ 2,84 <sup>a</sup>	8,28 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>
Tratamento térmico a 75°C			
Controle	57,29 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>	13,67 $\pm$ 0,75 <sup>b</sup>	4,48 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>
Pré-tratamento	98,81 $\pm$ 1,92 <sup>a</sup>	24,32 $\pm$ 1,80 <sup>a</sup>	8,68 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>
Pós-tratamento	99,60 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	22,66 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup>	7,06 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>
Tratamento térmico em ebulição			
Controle	38,23 $\pm$ 5,14 <sup>b</sup>	12,72 $\pm$ 0,93 <sup>b</sup>	6,89 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>
Pré-tratamento	92,18 $\pm$ 7,12 <sup>a</sup>	19,03 $\pm$ 3,05 <sup>a</sup>	6,28 $\pm$ 0,34 <sup>b</sup>
Pós-tratamento	91,25 $\pm$ 3,52 <sup>a</sup>	19,85 $\pm$ 2,66 <sup>a</sup>	7,56 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>
Microfluidização			
Controle	50,35 $\pm$ 2,31 <sup>c</sup>	13,22 $\pm$ 0,85 <sup>c</sup>	3,80 $\pm$ 1,44 <sup>b</sup>
Pré-tratamento	108,68 $\pm$ 4,23 <sup>a</sup>	27,19 $\pm$ 2,35 <sup>a</sup>	6,82 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>
Pós-tratamento	100,25 $\pm$ 1,47 <sup>b</sup>	20,60 $\pm$ 2,36 <sup>b</sup>	5,91 $\pm$ 0,96 <sup>ab</sup>

\*Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os resultados na coluna para as amostras dentro de um mesmo tratamento.

De forma geral, a hidrólise acarretou em aumentos de atividade antioxidante nos três métodos avaliados, tanto na presença quanto na ausência dos tratamentos tecnológicos. Os aumentos atingiram valores máximos de 158% (ABTS), 105% (DPPH) e 279% (FRAP) para as amostras de proteína de feijão submetidas ao pós-tratamento com ultrassom (ABTS e FRAP) e pré-tratamento com microfluidização (DPPH), em comparação com os seus respectivos controles (Tabela 1). Para a proteína de lentilha, os aumentos atingiram 197% (ABTS), 170% (DPPH) e 690% (FRAP) para as amostras submetidas ao pós-tratamento com ultrassom (ABTS), pré-tratamento por microfluidização (DPPH) e pós-tratamento por microfluidização (FRAP), respectivamente, em comparação com os seus respectivos controles (Tabela 2).

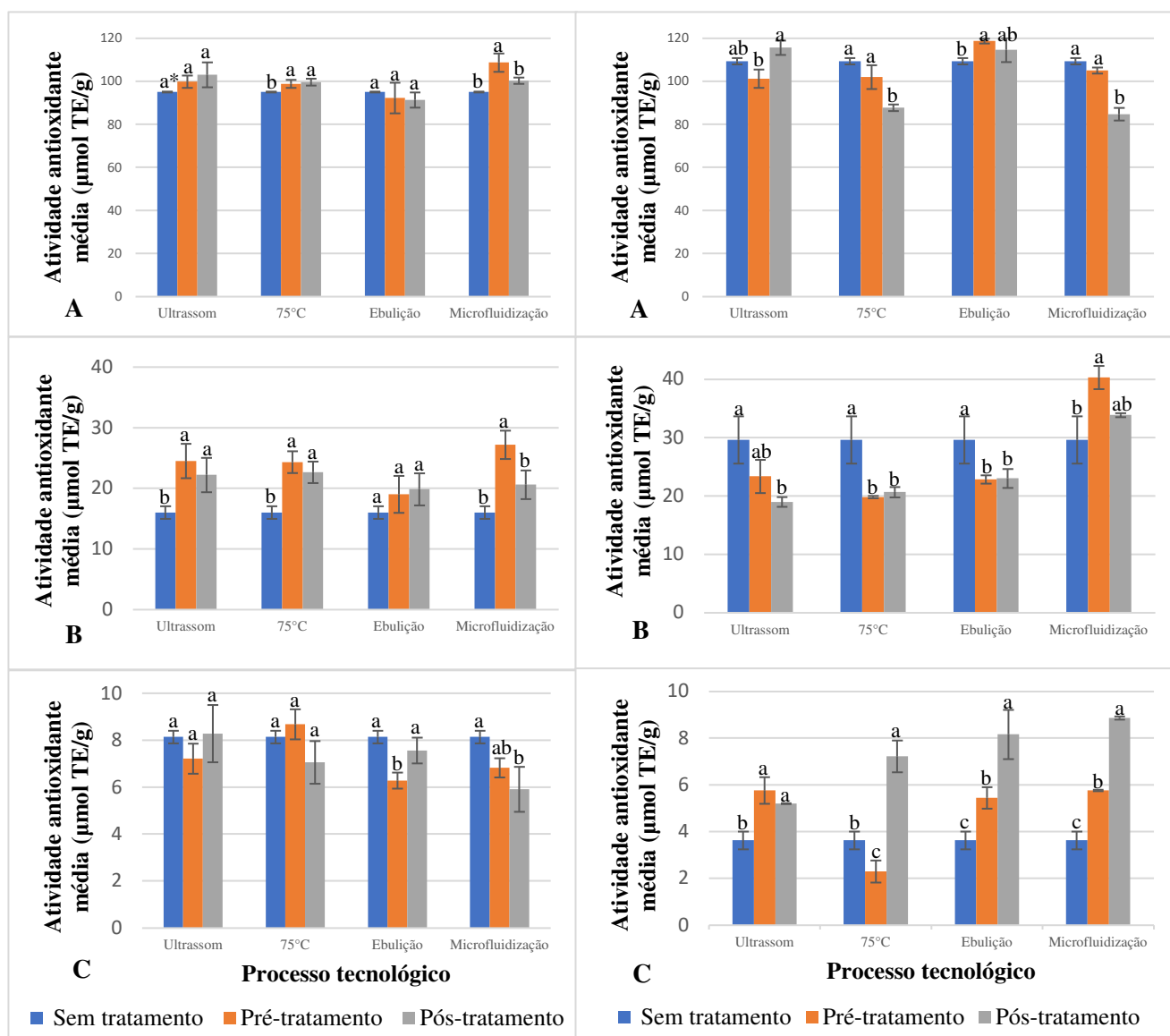
O aumento da bioatividade relacionado à hidrólise enzimática pode ser explicado pela ação de proteases específicas que atuam na estrutura primária das proteínas por meio da clivagem das ligações peptídicas e, assim, liberam pequenos peptídeos com potencial antioxidante<sup>3</sup>. Ademais, já foi relatado na literatura o potencial das enzimas em aprimorar a extração de compostos fenólicos complexados com as proteínas da matriz vegetal que, quando livres, são capazes de neutralizar reações oxidativas<sup>6</sup>.

Os efeitos dos diferentes processos tecnológicos nos hidrolisados proteicos de feijão e lentilha por meio da comparação entre as proteínas hidrolisadas sem tratamento e as amostras tratadas antes e após a hidrólise enzimática estão representados na Figura 3.

A aplicação de ultrassom promoveu aumento da bioatividade das amostras de feijão em 53% antes e 39% após a hidrólise para o método DPPH, e das amostras de lentilha em 59% e 43%, no pré e no pós-tratamento, respectivamente, para o método FRAP.

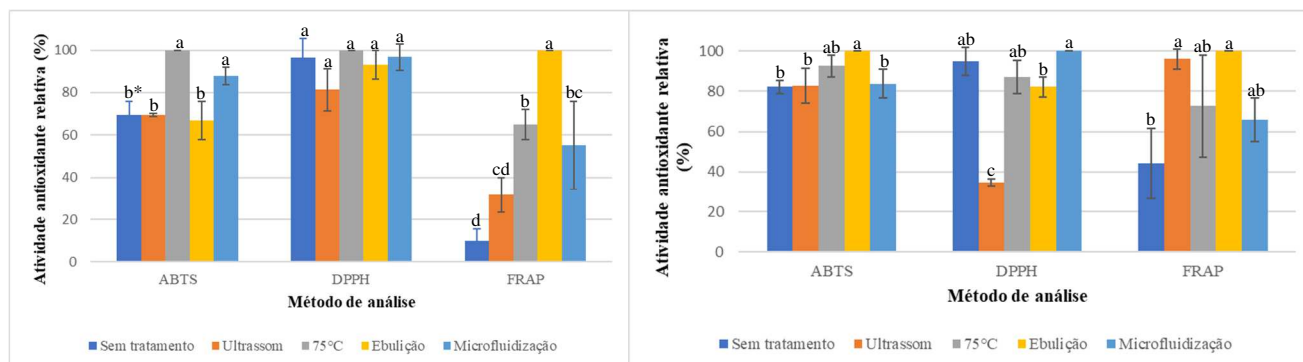
**Tabela 2.** Propriedades antioxidantes mensuradas pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP para as amostras de lentilha submetidas à hidrólise enzimática e aos diferentes processos tecnológicos.

Propriedades antioxidantes ( $\mu\text{mol TE/g}$ )			
Amostras	ABTS	DPPH	FRAP
Proteína concentrada	38,50 $\pm$ 1,45 <sup>b</sup>	14,14 $\pm$ 1,03 <sup>b</sup>	0,75 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>
Proteína hidrolisada	109,31 $\pm$ 1,52 <sup>a</sup>	29,61 $\pm$ 4,05 <sup>a</sup>	3,63 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>
Ultrassom			
Controle	38,85 $\pm$ 4,01 <sup>c</sup>	5,16 $\pm$ 0,24 <sup>c</sup>	1,63 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>
Pré-tratamento	101,20 $\pm$ 4,29 <sup>b</sup>	23,35 $\pm$ 2,85 <sup>a</sup>	5,76 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>
Pós-tratamento	115,59 $\pm$ 3,35 <sup>a</sup>	18,96 $\pm$ 0,83 <sup>b</sup>	5,20 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
Tratamento térmico a 75°C			
Controle	43,41 $\pm$ 2,51 <sup>c</sup>	12,97 $\pm$ 1,22 <sup>b</sup>	1,23 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>
Pré-tratamento	101,91 $\pm$ 5,54 <sup>a</sup>	19,80 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	2,30 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup>
Pós-tratamento	87,73 $\pm$ 1,50 <sup>b</sup>	20,65 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>	7,22 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>
Tratamento térmico em ebulição			
Controle	46,90 $\pm$ 5,57 <sup>b</sup>	12,23 $\pm$ 0,72 <sup>b</sup>	1,70 $\pm$ 0,33 <sup>c</sup>
Pré-tratamento	118,71 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>	22,83 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	5,44 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>
Pós-tratamento	114,53 $\pm$ 5,66 <sup>a</sup>	23,01 $\pm$ 1,62 <sup>a</sup>	8,16 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>
Microfluidização			
Controle	39,27 $\pm$ 3,37 <sup>c</sup>	14,89 $\pm$ 1,82 <sup>c</sup>	1,12 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>
Pré-tratamento	104,95 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>	40,30 $\pm$ 1,98 <sup>a</sup>	5,76 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
Pós-tratamento	84,70 $\pm$ 2,97 <sup>b</sup>	33,85 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	8,86 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>



**Figura 3.** Atividade antioxidante das amostras hidrolisadas de feijão (coluna esquerda) e lentilha (coluna direita) submetidas aos diferentes processos tecnológicos, determinada pelas metodologias: A – ABTS; B – DPPH; e C – FRAP. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as amostras agrupadas no mesmo tratamento tecnológico.

O tratamento a 75°C elevou a atividade antioxidante dos hidrolisados de feijão em 52% e 42%, respectivamente, no pré e pós-tratamento para o método DPPH, 4% em ambos os tratamentos para o método ABTS e 99% para a lentilha no pós-tratamento para o método FRAP. A ebulição aumentou em 9% a bioatividade das proteínas de lentilha no pré-tratamento para o método ABTS, 50% no pré-tratamento e 125% no pós-tratamento quando a atividade foi avaliada pelo método FRAP. A microfluidização elevou essa propriedade em 14% (ABTS) e 70% (DPPH) no pré-tratamento do feijão e em 36% na lentilha pré-tratada (DPPH). De forma geral, os pré-tratamentos demonstraram ser uma eficiente estratégia para elevação da bioatividade, uma vez que alteram a estrutura da proteína e permitiram a obtenção de peptídeos<sup>3,7,8</sup>. Quando comparado os concentrados proteicos tratados e não tratados (Figura 5), a microfluidização (ABTS), o tratamento a 75°C (ABTS) e a ebulição (FRAP) foram os processos mais adequados para elevação da atividade antioxidante nos concentrados de feijão, e a ebulição (ABTS e FRAP) e o ultrassom (FRAP) nos concentrados de lentilha.



**Figura 4.** Atividade antioxidante relativa dos concentrados proteicos de feijão (esquerda) e lentilha (direita) submetidos aos diferentes processos tecnológicos. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as atividades antioxidantes das amostras dentro do mesmo método de medida.

## CONCLUSÕES:

Os resultados sugerem que a aplicação da hidrólise enzimática é um processo efetivo para elevação da atividade antioxidante nos três métodos avaliados, tanto na presença quanto na ausência dos tratamentos tecnológicos. Os resultados demonstraram que a aplicação de ultrassom, tratamentos térmicos e microfluidização foram eficientes para promover o aumento da bioatividade nos concentrados (sem hidrólise) e nos hidrolisados proteicos de feijão e lentilha, recebendo destaque quando aplicados como pré-tratamentos.

## BIBLIOGRAFIA

- MIRALI, M.; PURVES, R. W.; VANDENBERG, A. Phenolic profiling of green lentil (*Lens culinaris* Medic.) seeds subjected to long-term storage. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 12, p. 2161–2170, 2016.
- OSEGUERA-TOLEDO, M. E., MEJIA, E. G., DIA, V. P., AMAYA-LLANO, S. L. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- $\kappa$ B pathways. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1175–1185, 2011.
- TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.
- AL-DUAIS, M. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research Technology**, v. 228, p. 813–821, 2009.
- BNEZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996
- CASARIN, A. L. F.; RASERA, G. B.; DE CASTRO, R. J. S. Combined biotransformation processes affect the antioxidant, antidiabetic and protease inhibitory properties of lentils. **Process Biochemistry**, v. 102, p. 250–260, 2021.
- GIRGIH, A. T. et al. Enzymatic protein hydrolysates from high pressure-pretreated isolated pea proteins have better antioxidant properties than similar hydrolysates produced from heat pretreatment. **Food Chemistry**, v. 188, p. 510–516, 2015.
- ZHANG, Y.; ROMERO, H. M. Exploring the structure-function relationship of Great Northern and navy bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: A study on the effect of enzymatic hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1516–1525, 2020.