



EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE PEIXINHO (*Stachys byzantina*) E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES TECNO-FUNCIONAIS

Palavras-Chave: proteína vegetal; emulsificante; estrutura; capacidade espumante; funcionalidade.

Autores(as):

Letícia Saiemi Tateoka, FEA – UNICAMP

Prof. Orientador: Luiz Henrique Fasolin, FEA – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Existe uma busca crescente por fontes alternativas de proteínas que forneçam alimentos com qualidade nutricional, tecnológica associado a um processo de extração que possua menor impacto ambiental. Uma das fontes promissoras de proteína vegetal ainda pouco conhecidas são as plantas alimentícias não convencionais (PANCs), como a *Stachys byzantina*, popularmente conhecida como peixinho-da-horta. Essa planta se destaca por conta do seu alto teor de proteína (cerca de 20%) quando comparado a outras folhas presentes comumente na alimentação, como o espinafre (0,69%). Contudo, pouco se sabe sobre o processo de extração destas proteínas, bem como sobre suas propriedades tecnológicas e funcionais. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo a avaliação das condições de extração das proteínas da folha de peixinho-da-horta e a avaliação da relação entre a proteína obtida com as propriedades tecno-funcionais para possíveis aplicações em alimentos.

METODOLOGIA:

As folhas de Peixinho foram obtidas de produtor local, lavadas, imersas em solução clorada, secas em temperatura ambiente com convecção de ar forçada por 48 h e armazenadas refrigeradas. A análise centesimal das folhas foi feita através de metodologias oficiais da *Association of official Analytical Chemists* (AOAC) 2006. Os resultados estão de acordo com os valores reportados na literatura, com teor de proteínas de 25,24 %, umidade 11,98%, lipídios 3,06%, carboidratos 52,75% e cinzas 6,97% (AZEVEDO, 2018; SILVA 2021).

A extração de proteínas foi feita utilizando a combinação de diferentes valores de pH (8, 10 e 12) a uma temperatura fixa de 60 °C. O tempo de extração, bem como a razão solvente:matriz foram fixados em 2 horas e 1:10, respectivamente. A determinação do ponto isoelétrico (pI) para realização da precipitação isoelétrica foi realizada através da avaliação do potencial zeta em diferentes valores de pH utilizando o Zetasizer Nano-ZS (Malvern, UK). Após a precipitação, a mistura foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em água. A solução teve o pH ajustado para 7 e em seguida foi liofilizada para obtenção do concentrado proteico em pó.

A capacidade espumante foi avaliada de acordo com ALMEIDA *et al.* (2022) com modificações. As amostras foram homogeneizadas para incorporar ar utilizando homogeneizador (Ultra Turrax T18, Angi Co.,

Shanghai China) e transferidas para provetas de 50 mL e o volume total foi lido após 30 segundos para determinar a capacidade espumante e após 30 min para a estabilidade das espumas (PHILLIPS *et al.*, 1990). A avaliação da evolução das bolhas foi verificada por microscopia.

Para a avaliação da capacidade emulsificante, foram preparadas dispersões de proteína com 3% e 5% (m/v) e os valores de pH foram ajustados para 3 e 7. As emulsões consistiram em 90% (v/v) de dispersão da proteína (fase contínua) e 10% (v/v) de óleo de soja (fase dispersa). Primeiramente, foi realizada uma pré-emulsificação utilizando homogeneizador (Ultra Turrax T18, Angi Co., Shanghai China) e, posteriormente, as emulsões foram tratadas com um gerador ultrassônico (Sonicador de Ponteira Ultrassônico Eco–Sonics). As emulsões foram avaliadas em relação ao potencial zeta, estabilidade da emulsão, através do equipamento Turbiscan Lab Expert (Formulation Co., L'Union, França), distribuição do tamanho de gotas por dispersão de luz através do Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) e propriedades reológicas através da obtenção de curvas de escoamento (AR1500ex, TA Instruments, England).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados de Kjeldahl foram incoerentes com a observação visual, provavelmente devido a outros interferentes. Dessa forma, realizou-se a precipitação das proteínas com ácido tricloroacético para avaliar apenas a quantidade de nitrogênio proteico (KOONTZ, 2014). O maior rendimento foi em pH 10 (Tabela 1), resultado coerente com a literatura, uma vez que pHs de alta alcalinidade geralmente são mais eficientes. A análise do potencial zeta dos extratos mostrou que o pl foi próximo a pH 2,48. Dessa forma, a obtenção das proteínas foi realizada em pH 10 e recuperação em pH 2. Nessas condições o teor de proteína obtido foi de 25,84%.

Capacidade emulsificante e estabilidade da espuma

A Tabela 2 contém as informações referentes a capacidade espumante nas diferentes condições de concentração de proteína e pH. Pode-se concluir que as amostras com a maior concentração de proteína (5% (m/v)) apresentaram as menores capacidade espumante.

A estabilidade da espuma (EE) foi avaliada através da taxa de desestabilização (Tabela 2). A maior estabilidade foi observada em pH 3, onde se observa a manutenção do tamanho das bolhas de ar após o tempo de 30 min, enquanto em pH 7 houve o colapso e o aumento do diâmetro das bolhas (Figura 1). Em valores de pH próximos ao pl ocorre a

repulsão mínima entre as moléculas de proteína, o que leva à agregação molecular e à formação de uma camada espessa na interface ar/água (BACHMANN *et al.*, 2000). Essa camada pode levar ao aumento da estabilidade da espuma. Logo, como o pl está mais próximo do pH 3, quanto mais distante deste ponto (pH 7), maior a desestabilização da espuma

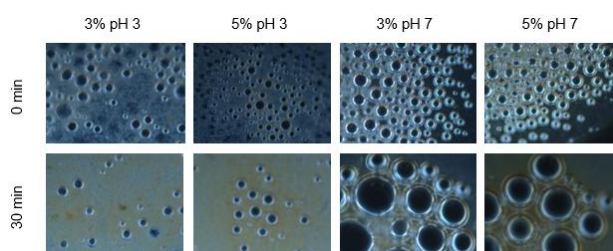
Tabela 2. Capacidade espumante (CE) e estabilidade das espumas (EE) obtidas em diferentes condições.

Solução	CE (%)	EE (%)
3% pH 3	61,66 ± 0,35	68,97 ± 0,35
5% pH 3	48,75 ± 1,77	48,12 ± 1,92
3% pH 7	65 ± 0,47	44,44 ± 0,18
5% pH 7	52,5 ± 3,54	46,67 ± 0,11

Tabela 1. Teor de proteína dos extratos

Condição	Proteína (Kjeldahl) (%)	Proteína (TCA) (%)
pH 8	0,40 ± 0,02	8,91 ± 0,12
pH 10	0,35 ± 0,03	18,62 ± 0,51
pH 12	0,11 ± 0,04	18,24 ± 0,80

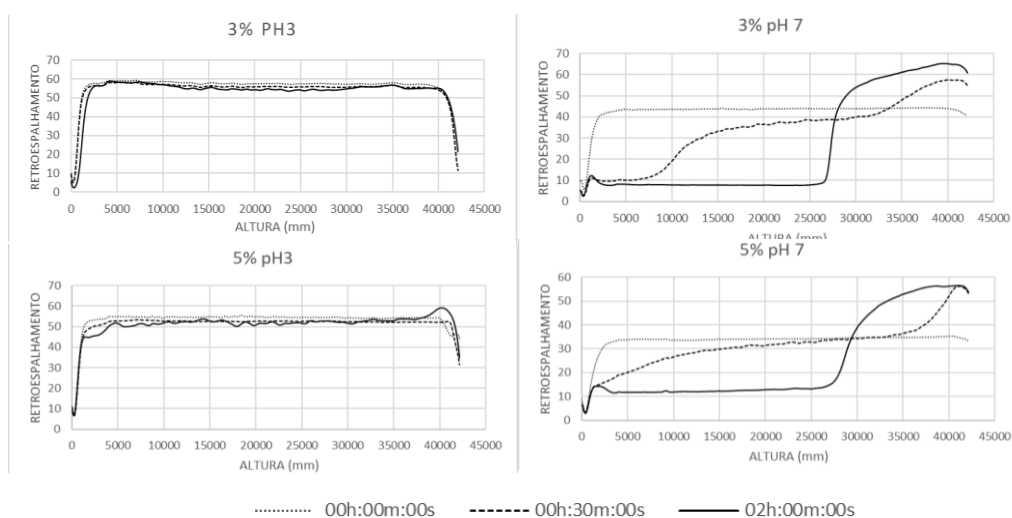
Figura 1 – Evolução das bolhas de ar dentro das espumas com o tempo



Propriedades da emulsão

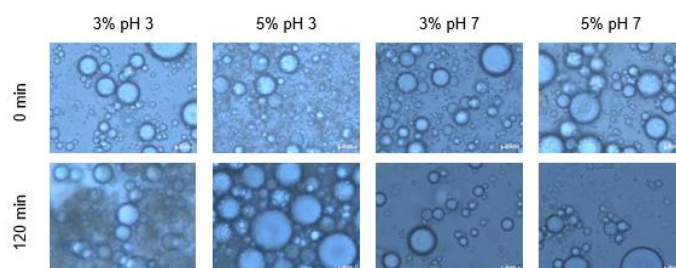
Todas as emulsões produzidas apresentaram potencial zeta negativo (-48,4 mV a -29,3 mV), sendo que nas condições de pH 7 este valor foi superior em relação ao pH 3. Contudo esse valor não foi suficiente para estabilizar totalmente as emulsões (Figura 2). Através da análise foi possível concluir que as emulsões em pH 3 apresentaram estabilidade superior, enquanto foi observado separação de fase nas amostras de pH 7 em tempos inferiores a 2 horas. Além disso, as emulsões de menor pH também se apresentaram visualmente mais viscosas, que pode ser atribuído à agregação proteica. A viscosidade da emulsão reduz a floculação e coalescência das gotas, contribuindo para a estabilidade da emulsão (KOKAL, 2005).

Figura 2 – Evolução das emulsões com o tempo em condições diferentes e relacionando retroespalhamento x altura (mm)



Em relação a concentração de proteína, este não foi o fator de maior interferência na estabilidade das emulsões. Porém, através da microscopia ótica (Figura 3), observa-se que conforme a concentração aumentou, possivelmente mais proteínas estavam disponíveis para a formação de filme, o que possibilitou a formação de uma maior quantidade de gotículas. Através das micrografias também possível perceber que emulsões se apresentaram polidispersas. A análise de tamanho de gotas mostrou uma distribuição multimodal e a distribuição do tamanho de gota nas emulsões em geral apresentou um pico menor entre 39-47 μm e um pico maior entre 55-63 μm . (MCCLEMENTS, 2004).

Figura 3 – Evolução das emulsões com o tempo (barra de escala para todas as imagens = 100 μm)



Quando o pH está próximo do ponto isoelétrico, as gotículas se aproximam e as proteínas podem se reorganizar, o que pode promover a floculação por conta do aumento da atração hidrofóbica e da formação de ligações dissulfeto entre as proteínas adsorvidas (ÖSTBRING, 2021). Porém, no caso das amostras analisadas, o pH próximo do ponto isoelétrico contribuiu para aumentar a estabilidade das amostras de pH 3.

Todas as emulsões apresentaram comportamento de fluido não-Newtoniano pseudoplástico, com índice de comportamento (n) menor do que 1 (Tabela 3). O comportamento observado é característico de emulsões estabilizadas por proteínas sendo também descrito previamente por Wainstein (2009) para extratos de folhas de ora-pro-nobis. O aumento da concentração de proteína e a acidificação do meio aumentaram o caráter pseudoplástico da emulsão, bem como o índice de consistência (k). A viscosidade em taxa de deformação de 100 1/s acompanhou o índice de consistência, uma vez que são relacionados.

De forma geral, pode-se observar que a proteína tem um elevado efeito espessante na viscosidade. Dessa forma, o maior efeito exercido na estabilidade das emulsões pode estar relacionado ao efeito espessante e/ou estérico das proteínas. Apesar de elevado potencial zeta, o efeito eletrostático não influencia no aumento ou manutenção da estabilidade frente à cremação. Isso sugere que as proteínas da folha de peixinho não possuem grande ação interfacial nas emulsões. Esse resultado também foi observado em estudos de folhas como a ora-pro-nóbis apresentados por Lise, 2018 em que a mucilagem da folha possibilitou uma boa estabilidade da emulsão, devido ao espessamento da fase contínua.

Tabela 3. Parâmetros reológicos das emulsões produzidas com concentrado proteico de peixinho

Parâmetro reológico	Emulsão			
	3% pH 3	5% pH3	3% pH7	5% pH 7
Índice de consistência k (Pa.s ⁿ)	0,314	0,742	0,031	0,463
Índice de comportamento n (-)	0,507	0,477	0,707	0,238
Viscosidade a 100 1/s (Pa.s)	0,0317	0,064	0,008	0,011

CONCLUSÕES:

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que o rendimento de 25,84% mostra que o processo ainda pode ser otimizado com a utilização de temperaturas mais altas ou processos que facilitem o rompimento celular para solubilização das proteínas, como ultrassom ou micro-ondas. Em relação às propriedades

tecnofuncionais foram observados resultados positivos relacionados à capacidade espumante, com maior estabilidade de emulsão em pH ácido, o que torna possível a utilização do extrato proteico como agente espumante. Por outro lado, as emulsões produzidas com o extrato proteico apresentaram desestabilização em pouco tempo. Contudo, foi possível observar que apesar de elevado potencial zeta, o efeito eletrostático não influencia no aumento ou manutenção da estabilidade frente ao processo de cremeação das emulsões. As maiores estabilidades foram observadas em pH ácido e podem ser relacionadas com o aumento da viscosidade e impedimento estérico. Por fim, são necessários mais estudos em relação às modificações estruturais que possam influenciar nas propriedades tecnofuncionais e no efeito espessante e/ou estérico das proteínas.

BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, Flávia Souza et al. **Scaling up the two-stage countercurrent extraction of oil and protein from green coffee beans: Impact of proteolysis on extractability, protein functionality, and oil recovery**. Food and Bioprocess Technology, v. 15, n. 8, p. 1794-1809, 2022.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18.ed. Gaithersburg, 2006.

AZEVEDO, Thaise Duda. Propriedades nutricionais, antioxidantes, antimicrobianas e toxicidade preliminar do peixinho da horta (*Stachys byzantina* K. Koch). 2018.

BACHMANN, J.; HORTON, R.; VAN DER PLOEG, R.R.; WOCHEA, S. **Modified sessile drop method for assessing initial soil-water contact angle of sandy soil**. Soil Science Society of America Journal, v.64, p.564-567, 2000

KOKAL, Sunil. "Crude-Oil Emulsions: A State-Of-The-Art Review." SPE Prod & Fac 20 (2005): 5–13.

KOONTZ, Laura. TCA precipitation. In: Methods in enzymology. Academic Press, 2014. p. 3-10.

LISE, Carla Cristina. Potencial emulsificante de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) em derivado cárneo tipo mortadela. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

MCCLEMENTS, D.J. Protein-stabilized emulsions. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2004, 9, 305–313.

SILVA, Caroliny Fernanda Batista da. **Avaliação in vitro de extratos de peixinho da horta (*Stachys byzantina*) obtidos por meio de solventes eutéticos profundos naturais**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

ÖSTBRING, Karolina et al. The effect of ph and storage temperature on the stability of emulsions stabilized by rapeseed proteins. Foods, v. 10, n. 7, p. 1657, 2021.

WAINSTEIN SILVA, Larissa et al. Potencial tecnológico das folhas da ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller): Uma Revisão. 2019.