

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto sensu*
DOUTORADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

FRANCINE GOMES BASSO LOS

ESTUDO DO AMIDO, PROTEÍNA E COMPOSTOS FENÓLICOS
DO FEIJÃO CARIOCA

PONTA GROSSA

2019

FRANCINE GOMES BASSO LOS

ESTUDO DO AMIDO, PROTEÍNA E COMPOSTOS FENÓLICOS
DO FEIJÃO CARIOCA

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Programa
de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate

Co-orientadora: Rosa Cristina Prestes Dornelles

PONTA GROSSA

2019

L878 Los, Francine Gomes Basso
Estudo do amido, proteína e compostos fenólicos do feijão Carioca / Francine
Gomes Basso Los. Ponta Grossa, 2019.
139 f.

Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de
Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de
Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate.

Coorientadora: Profa. Dra. Rosa Cristina Prestes Dornelles.

1. Compostos fenólicos. 2. Propriedades tecnológicas. 3. Amido de feijão
envelhecido. 4. Hidrolisado proteico de feijão carioca. I. Demiate, Ivo Mottin. II.
Dornelles, Rosa Cristina Prestes. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Ciências e Tecnologia de Alimentos. IV.T.

CDD: 664

TERMO DE APROVAÇÃO

FRANCINE GOMES BASSO LOS



ESTUDO DO AMIDO, PROTEÍNA, E COMPOSTOS FENÓLICOS DO FEIJÃO CARIOCA

Tese aprovada como requisito para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

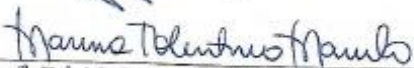
Orientador:


Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate - UEPG - PR


Prof. Dr. Agnes de Paula Scheer - UFPR - PR


Prof. Dr. Silvia Renata Machado Coelho - UNIOESTE - PR


Prof. Dr. Luiz Gustavo Lacerda - UEPG - PR


Prof. Dr. Marina Tolentino Marinho - UEPG - PR

Ponta Grossa, 24 de julho de 2019.

Dedico ao meu marido, que sempre apoia minhas decisões
e se alegra com minhas conquistas.

Dedico aos meus filhos, Heitor Alexandre e Raul Felipe,
ainda pequeninos no início dessa caminhada,
e agora, um pouco maiores,
mais curiosos e mais inteligentes.

Que sempre possamos ensinar uns aos outros a sermos melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me dá vitórias e me sustenta nas derrotas da vida.

Ao meu marido Alex Raul Los, pelo apoio e incentivo durante essa jornada, especialmente durante o período em que estivemos nos Estados Unidos. Sem sua participação esse sonho não seria realizado.

Aos meus amados filhos, que muitas vezes foram privados da minha companhia devido aos meus compromissos e dedicação com a pesquisa.

A minha mãe Ione, e a meu irmão Diego, pelo apoio recebido nos momentos difíceis dos últimos anos.

A CAPES, pela bolsa recebida, e pela UEPG pelas instalações onde o trabalho foi desenvolvido .

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate, pela oportunidade de aprendizado proporcionada, e pelo incentivo para que eu fizesse estagio doutoral no exterior.

A professora Dra. Ana Cláudia Barana, que se tornou uma ótima companheira e amiga durante o período nos Estados Unidos

Ao Dr. Lamsal, pela orientação no trabalho desenvolvido na *Iowa State University*

Aos professores Dr. Alessandro Nogueira, Dr. Luiz Gustavo Lacerda e Dra, Marina Tolentino Marinho, pelas valiosas correções com a escrita científica.

À Denise Mendes, sempre solícita e sorridente ao ajudar com as análises físico-químicas.

As colegas de turma: Cristina Soltvski, Cleoci Beninca, Ana Paula Travalini, Vivian Cristina Ito, Daniani Marinho Zardo e Lorene Yassin, pela troca mútua de experiências.

As alunas, agora já Engenheira de Alimentos, Amanda Chezini e Leticia Ronco, pela ajuda com as análises.

Aos colegas que colaboraram com esse estudo: Acácio Zielinski e José Pedro Wojeicchowski.

Aos colegas do Grupo de Estudos do Amido, pelas colaborações durante nossos encontros semanais.

A empresa Invicta Consultoria, de Carambeí, pela doação das amostras de feijão.

A todos os que de alguma forma auxiliaram no desenvolvimento do trabalho.

Muito obrigada

*“Seja forte e corajoso! Não se
apavore, nem desanime, pois o Senhor, o seu
Deus, estará contigo por onde andar.”*

Josué 1:9

RESUMO

Feijão Carioca é consumido diariamente no Brasil como alimento base por grande parte da população, devido ao seu baixo custo e alto valor nutricional, como fonte de proteína e energia. Como alternativa para o uso de grãos sub-valorizados de feijão Carioca, devido ao escurecimento que ocorre durante o armazenamento em condições inadequadas ou decorrente do envelhecimento, este trabalho propôs o estudo das frações amilácea e proteica, bem como a identificação dos principais compostos fenólicos presentes nos grãos. Três estudos foram conduzidos para a fração amilácea: (1) com amostras da cultivar Campos Gerais, produzido em diferentes áreas; (2) com as cultivares Campos Gerais, Tangara, Estilo, Dama e ANFC, produzidos numa área única e (3) com a cultivar Campos Gerais de safras distintas. O amido, extraído via úmida, foi analisado quanto ao teor de amilose, difração de raios X, morfologia dos grânulos, transição térmica de gelatinização, propriedades de pasta, poder de inchamento e solubilidade, sinérese e digestibilidade *in vitro*. O teor de amilose variou entre 40,06 e 42,60%. A retrogradação, calculada a partir da variação da entalpia de gelatinização e de reassociação do amido, oscilou entre 45,7 e 59,3%. Os amidos apresentaram alta suscetibilidade à sinérese e baixo poder de inchamento e solubilidade. O amido granular apresentou teor de amido resistente entre 82,96 e 88,64%. O estudo da proteína do feijão Carioca consistiu na aplicação de hidrólise enzimática a 6 e 9% de grau de hidrólise. A formação de frações proteicas de menor massa molar causou aumento na solubilidade, melhoria nas propriedades de emulsificação e de formação de espuma. O estudo desses parâmetros foi realizado em pH 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0. Foi possível demonstrar que os hidrolisados de feijão apresentaram características superiores a hidrolisados de soja para os parâmetros: solubilidade, hidrofobicidade, capacidade de emulsificação e atividade emulsificante. Para o estudo do perfil de fenólicos do feijão Carioca, foram otimizados métodos de extração utilizando metodologia de superfície de resposta. Os resultados da atividade antioxidante e o perfil de compostos fenólicos (cromatografia líquida de alta eficiência) foram analisados por Análise de Componentes Principais. As extrações propostas com acetona a 70% e metanol a 50% foram mais eficazes na extração de flavonoides e ácidos fenólicos, respectivamente. Evidenciou-se a presença de canferol e ácido clorogênico no feijão Carioca. O estudo do feijão Carioca permitiu uma melhor compreensão global das características dessa leguminosa para possibilitar o aproveitamento de excedentes de produção e de grãos de safras antigas pela indústria de alimentos.

Palavras-chave: amido de feijão envelhecido, hidrolisado proteico de feijão Carioca, compostos fenólicos, propriedades tecnológicas.

ABSTRACT

Carioca beans are consumed daily in Brazil as a staple food by a large part of the population, due to its low cost and high nutritional value, as a source of protein and energy. This work aims to study the starch, protein and phenolic compounds of *Carioca* beans. The information obtained can lead to an alternative to the use of depreciated grains due to the darkening, that occurs during storage under inadequate conditions, or due to aging. Three studies were conducted for the starch fraction: (1) using *Campos Gerais* cultivar samples, produced in different areas; (2) using *Campos Gerais*, *Tangara*, *Estilo*, *Dama* and *ANFC* cultivars, produced in a single area and (3) using *Campos Gerais* cultivar samples from different harvest. The starch was extracted by wet method. Amylose content, X-ray diffraction pattern, granule morphology, thermal transition of gelatinization, pasting properties, swelling power, solubility, syneresis and *in vitro* digestibility were analyzed. The amylose content ranged from 40.06 to 42.60%. The retrogradation, calculated using enthalpy of gelatinization and enthalpy of reassociation of starch, ranged from 45.7 to 59.3%. The samples showed high susceptibility to syneresis and low swelling power and solubility. The granular starch presented resistant starch content between 82.96 and 88.64%. The study of the *Carioca* bean protein consisted in the application of enzymatic hydrolysis at 6 and 9% degree of hydrolysis. The protein fractions of lower molar mass caused higher solubility, better emulsification and foaming properties. The study of these parameters was performed at pH values of 3.0, 5.0, 7.0 and 9.0. It was possible to demonstrate that the bean hydrolysate had superior characteristics to the soybean hydrolysate for the parameters: solubility, hydrophobicity, emulsification capacity and emulsifying activity. For the study of the phenolic profile of the *Carioca* bean, extraction methods were optimized using response surface methodology. The results antioxidant activity and phenolic compounds profile (high performance liquid chromatography) were analyzed by Principal Component Analysis. The extractions with 70% acetone and 50% methanol were more effective in the extraction of flavonoids and phenolic acids, respectively. The presence of kampferol and chlorogenic acid in *Carioca* beans was evidenced. The study of *Carioca* beans allowed a better global comprehension of the characteristics of this legume to allow the use of excess production and grains of old crops by the food industry.

Keywords: aged bean starch, *Carioca* bean hydrolysate, phenolic compounds, technological properties

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Estrutura básica dos flavonoides.....	24
Figura 2.1 Chemical compounds in bean seed.....	41
Figura 3.1 Padrões de difração de raios X das amostras de amido de feijão Carioca do estudo 2.....	65
Figura 3.2 Imagens obtidas por MEV das amostras de amido de feijão do Estudo 2.....	66
Figura 3.3 Sinérese das amostras de amido de feijão Carioca do Estudo 1.....	71
Figura 4.1 Curva de hidrólise de proteína de feijão Carioca (CBH) e proteína de soja (SBH) com diferentes graus de hidrólise.....	90
Figura 4.2 O perfil eletroforético das proteínas de feijão Carioca e soja hidrolisadas e controle.....	92
Figura 4.3 Solubilidade das amostras de proteína de feijão Carioca e de proteína de soja.....	97
Figura 4.4 Hidrofobicidade de superfície de proteína de feijão Carioca e proteína de soja	99
Figura 4.5 Capacidade de emulsificação das amostras de proteína de feijão Carioca e proteína de soja.....	101
Figura 5.1 3-D response surfaces plots to evaluate interaction effects of: acetone, methanol and methanol:HCl as solvent.....	125
Figura 5.2 Principal component analysis of extraction methods and total phenolic compounds, flavonols contents, antioxidant capacity and phenolic compounds.....	128
Figura 5.3 Chromatogram obtained by HPLC – DAD analysis of an extract from beans (assay-4) at 320 nm.....	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Classes de flavonoides.....	25
Tabela 1.2 Estrutura dos ácidos fenólicos.....	26
Tabela 2.1 Chemical composition (% m/m, on dry basis) of raw (uncooked) common beans (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	43
Tabela 2.2 Bioactivity potential of common beans.....	47
Tabela 3.1 Descrição das amostras de feijão Carioca.....	57
Tabela 3.2 Transição térmica de gelatinização e de dissociação do amido retrogradado, porcentagem de retrogradação, cristalinidade relativa (RC-%) e teor de amilose (%).....	64
Tabela 3.3 Poder de inchamento (g/g) e solubilidade (%) das amostras de amido de feijão Carioca.....	69
Tabela 3.4 Propriedade de pasta das amostras de amido de feijão Carioca.....	73
Tabela 3.5 Digestibilidade de amido granular de feijão Carioca do Estudo 2.....	75
Tabela 4.1 Teor de aminoácidos livres (μmol/g) das amostras de proteína de feijão Carioca e proteína de soja submetidas a diferentes graus de hidrólise.....	94
Tabela 4.2 Atividade de Emulsificação (EA) e Estabilidade da Emulsão (Δ_{0-15} e ES-60) – valores relativos.....	104
Tabela 4.3 Propriedades de formação de espuma das amostras de proteína de feijão Carioca e proteína de soja.....	106
Tabela 5.1 RSM design experiments and the evaluated response variable: total phenolics compounds, flavonoids content and in vitro antioxidant assays from Carioca beans.....	121
Tabela 5.2 Effects of independent variables (sample:solvent ratio, temperature and solvent concentration) for dependent variables evaluated by RSM using acetone, methanol and methanol:HCl as solvent.....	122
Tabela 5.3 Comparison between in vitro antioxidant assays, and phenolic profile from Carioca beans obtained by RSM1, RSM2 and RSM3 and others extractions methods.....	126

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
OBJETIVOS.....	14
CAPÍTULO 1 –REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 FEIJÃO	15
1.2 AMIDO.....	16
1.3 PROTEÍNA.....	21
1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	23
REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO 2 - BEANS (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.): WHOLE SEEDS WITH COMPLEX CHEMICAL COMPOSITION.....	40
2.1 INTRODUCTION	40
2.2 STARCH AND FIBER.....	41
2.3 PEPTIDES	44
2.4 PHENOLIC COMPOUNDS.....	45
2.5 FATTY ACIDS, TOCOPHEROLS, AND CAROTENOIDS	46
2.6 ANTINUTRITIONAL FACTORS	47
2.7 CONCLUSION.....	49
REFERENCES AND RECOMMENDED READING.....	50
CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO DE FEIJÃO CARIOCA PRODUZIDO EM DIFERENTES ÁREAS, DE DIFERENTES CULTIVARES E DE SAFRAS DISTINTAS	54
3.1 INTRODUÇÃO.....	55
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	56
3.2.1 Materiais	56
3.2.2 Métodos	57
3.2.2.1 Extração do amido	58
3.2.2.2 Propriedades químicas e estruturais do amido.....	58
3.2.2.2.1 Teor de amilose.....	58
3.2.2.2.2 Difração de raios X.....	59
3.2.2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura	59
3.2.2.3 Propriedades térmicas do amido	59
3.2.2.4 Propriedades tecnológicas do amido.....	60
3.2.2.4.1 Poder de inchamento e solubilidade em água	60
3.2.2.4.2 Sinérese	61
3.2.2.4.3 Propriedades de Pasta.....	61
3.2.2.5 Digestibilidade <i>in vitro</i> do amido.....	61
3.2.2.6 Análise estatística.....	62
3.3 RESULTADOS.....	62

3.3.1 Teor de Amilose.....	62
3.3.2 Difração de Raios X.....	65
3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	66
3.3.4 Propriedades Térmicas do Amido.....	67
3.3.5 Poder de Inchamento e Solubilidade em Água	68
3.3.6 Sinérese	70
3.3.7 Propriedades de Pasta	71
3.3.8 Digestibilidade <i>In Vitro</i> do Amido	74
3.4 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS.....	77
 CAPITULO 4 - APLICAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNA DE FEIJÃO CARIOCA (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) PARA MELHORIA DE SUAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS.....	 81
4.1 INTRODUÇÃO	82
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	84
4.2.1 Materiais	84
4.2.2 Métodos	84
4.2.2.1 Extração da proteína	84
4.2.2.2 Hidrólise enzimática da proteína.....	85
4.2.2.3 Eletroforese SDS-PAGE.....	86
4.2.2.4 Aminoácidos livres	86
4.2.2.5 Solubilidade em água.....	87
4.2.2.6 Hidrofobicidade de superfície	87
4.2.2.7 Capacidade de emulsificação.....	87
4.2.2.8 Atividade de emulsificação e estabilidade da emulsão	88
4.2.2.9 Formação de espuma.....	88
4.2.2.10 Análise estatística.....	89
4.3 RESULTADOS.....	89
4.3.1 Curva de Hidrólise	89
4.3.2 Eletroforese SDS-PAGE	91
4.3.3 Aminoácidos Livres	93
4.3.4 Solubilidade em Água.....	95
4.3.5 Hidrofobicidade de Superfície	98
4.3.6 Capacidade de Emulsificação	100
4.3.7 Atividade de Emulsificação e Estabilidade da Emulsão	102
4.3.8 Formação de Espuma.....	105
4.4 CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS.....	109

CAPÍTULO 5 – EXTRACTION OPTIMIZATION OF PHENOLIC EXTRACTS FROM CARIOCA BEAN (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY	113
5.1 INTRODUCTION	114
5.2 MATERIALS AND METHODS.....	115
5.2.1 Materials	115
5.2.2 Methods	116
5.2.2.1 Extraction of phenolic compounds	116
5.2.2.2 Comparison of extraction methods	117
5.2.2.3 Determination of TPC and FC	117
5.2.2.4 Antioxidant capacity	117
5.2.2.5 RP-HPLC-DAD analysis	118
5.2.2.6 Data analysis	118
5.3 RESULTS AND DISCUSSION	120
5.3.1 Extraction of Phenolic Compounds	120
5.3.2 Comparison Between Methodologies	127
5.4 CONCLUSION.....	131
REFERENCES	133
CONSIDERAÇÕES GERAIS	137
ANEXOS.....	138

INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores mundiais de feijão. Na safra 2018/2019 foram produzidos 3,12 milhões de toneladas dessa leguminosa, para atender um consumo *per capita* de 17 kg/hab./ano, essencialmente na forma de grãos integrais cozidos.

O feijão, assim como outras leguminosas, apresenta alto teor de proteínas e de amido, sendo ainda rico em potássio, ferro, zinco e magnésio, e em compostos fenólicos. Seus macronutrientes, proteína e amido, têm sido estudados quanto às características físico-químicas, estruturais, e tecnológicas. Estudos sobre o potencial antioxidante dos compostos fenólicos presentes no tegumento, associam o consumo de feijão à redução do risco de doenças metabólicas, como doenças coronarianas, redução do risco de diabetes, e diminuição do risco de alguns tipos de câncer.

Contudo, mesmo o feijão Carioca sendo o mais representativo em produção e consumo no Brasil, poucos estudos sobre esse tipo de feijão estão disponíveis. O presente trabalho visa estudar os macronutrientes amido e proteína, e os compostos fenólicos do feijão com vistas a possíveis aplicações em alimentos.

O presente trabalho apresenta-se dividido em forma de capítulos. O capítulo 1 consta de uma revisão de literatura sobre o feijão, seus macronutrientes amido e proteína, e compostos fenólicos. O capítulo 2 traz o artigo de revisão “*Beans (Phaseolus vulgaris L.): whole seeds with complex chemical composition*”, publicado no periódico *Current Opinion in Food Science*. O capítulo 3 apresenta os resultados do estudo das características do amido de feijão Carioca, em forma de artigo a ser submetido a periódico científico de impacto relevante na área. O capítulo 4 apresenta os resultados do estudo sobre modificação enzimática da proteína de feijão Carioca, desenvolvido durante estágio doutoral na *Iowa State University*, nos Estados Unidos, financiado pelo Programa Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE. Por fim, o capítulo 5 traz o artigo “*Extraction Optimization of Phenolic Extracts from Carioca Bean (Phaseolus vulgaris L.) Using Response Surface Methodology*”, publicado no periódico *Food Analytical Methods*.

Os capítulos não publicados estão escritos em formato de artigo, em língua portuguesa. Os capítulos já publicados estão apresentados na língua da publicação (inglês) e em anexo, encontram-se as licenças de Direitos Autorais, acordadas entre autor principal e a editora.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar as características do amido, proteína e compostos fenólicos extraídos de feijão Carioca com vistas à aplicação na indústria alimentícia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Caracterizar* quanto às propriedades químicas, estruturais, térmicas e tecnológicas o amido de feijão Carioca cultivar Campos Gerais produzido em diferentes áreas; e produzido em área única, nas safras de 2016, 2017 e 2018;
- *Caracterizar* quanto às propriedades químicas, estruturais, térmicas, tecnológicas, e *estudar* a digestibilidade do amido de feijão Carioca de diferentes cultivares: Campos Gerais, Tangara, Estilo, Dama e ANFC;
- *Extrair e hidrolisar* parcialmente a proteína de feijão Carioca cultivar Campos Gerais e comparar as propriedades tecnológicas com as da proteína de soja;
- *Otimizar* um método para extração de compostos fenólicos de feijão Carioca utilizando Metodologia de Superfície de Resposta e *identificar* o perfil fenólico de feijão Carioca cultivar Campos Gerais.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 FEIJÃO

Leguminosas amiláceas (*Pulses*, em inglês) são definidas pela FAO como culturas que armazenam amido como fonte de reserva energética, produzidas especialmente para fornecimento de grãos secos, como feijões comuns, ervilhas, lentilhas, grão de bico. Excluem-se desse conceito culturas colhidas em fase imatura, como ervilha-torta e vagem, classificadas como olerícolas; e culturas que armazenam lipídeos, como soja e amendoim, classificadas como oleaginosas (HAVEMEIER; ERICKSON; SLAVIN, 2017).

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) figura entre uma das mais importantes leguminosas cultivadas mundialmente. O Brasil consta como o terceiro maior produtor mundial, depois de Myanmar e Índia, segundo dados da FAOSTAT (2017). De acordo com dados da CONAB (2019), na safra 2018/19 foram plantados 3,17 milhões de hectares de feijão no Brasil, gerando uma produção de 3,12 milhões de toneladas.

O feijão Carioca, que representa 60% do consumo no país, caracteriza-se por maior resistência à seca e fácil adaptação climática em todas as regiões do país (CONAB, 2019; SILVA et al., 2014).

Em 2018, o Ministério da Agricultura lançou o “Plano nacional de desenvolvimento da cadeia do feijão e *pulses*” para impulsionar o cultivo e o consumo de leguminosas. Entre os objetivos lançados estão o incentivo ao incremento do consumo de feijão em 5 kg *per capita*; o aumento da produção de *pulses* em 20%, com incremento de outras culturas agrícolas além do feijão, tais como grão de bico, lentilha e ervilha; e aumento nas exportação ao patamar de 500 mil toneladas até 2028 para países asiáticos, especialmente Índia, onde o consumo de *pulses* é significativo em todas as refeições (café-da-manhã, almoço e jantar) (MAPA, 2018).

O consumo de feijão apresenta relevância como alimento básico no Brasil e em países da África, Ásia e América Latina por ser uma importante fonte de proteína para populações de baixo poder aquisitivo (GANASCINI et al., 2019; SILVA et al., 2014; WANI et al., 2016). No Brasil, a combinação arroz-feijão faz parte da alimentação diária da população, sendo um dos símbolos da culinária popular (KATO et al., 2015). Do ponto de vista nutricional, essa combinação apresenta a vantagem de complementar a ingestão dos aminoácidos essenciais lisina, abundante no feijão, com o triptofano, ausente em leguminosas, mas presente em cereais como o arroz (DURANTI, 2006; HAVEMEIER; ERICKSON; SLAVIN, 2017).

Feijões caracterizam-se pelo alto teor de proteínas (17 a 40%), mas também pelo alto teor de carboidratos, de 40 a 50%. Além de fonte desses macronutrientes, o feijão fornece baixos teores de lipídios; contém compostos bioativos, potássio, magnésio, ferro e zinco; e não contém glúten (FAN et al., 2016; KAN et al., 2017; LIMA et al., 2014; MOJICA et al., 2015).

Vários estudos têm associado o consumo de feijão à diminuição dos níveis de colesterol, redução dos riscos de doenças cardiovasculares e metabólicas, redução da incidência de câncer de próstata, mama e cólon (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2014; HALL; HILLEN; ROBINSON, 2017; HAYAT et al., 2014; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ et al., 2009; MESSINA, 2014; SINGH et al., 2017). De acordo com Darmadi-Blackberry et al. (2004) um dos fatores de maior relevância na determinação da longevidade de certos grupos populacionais é o consumo de leguminosas, incluindo feijões, em comparação a outras classes de alimentos. A incorporação de leguminosas na dieta tem sido sugerida para reduzir o índice glicêmico e reduzir riscos de doenças cardiovasculares (JENKINS et al., 2012; JEONG et al., 2019; SIMONS; HALL; BISWAS, 2017).

O objetivo desse capítulo é abordar, de maneira sucinta, a definição, composição e aspectos de maior relevância para os principais compostos químicos constituintes do feijão Carioca.

1.2 AMIDO

Síntese do amido

O amido, um polímero de alta massa molar, constitui-se de moléculas de glicose, que durante sua polimerização liberam uma molécula de água, sendo quimicamente classificado como um polímero de glicose anidra (HAQ et al., 2019; PERIS-TORTAJADA, 2004). O amido organiza-se em grânulos semicristalinos compactos e microscópicos, com tamanho variável entre 1 a 100 μm . A massa de 1 g de amido contém aproximadamente 1 bilhão de grânulos, cada um contendo algo em torno de 10 trilhões de moléculas de glicose (TAGGART, 2004).

Nas plantas o amido está presente em vários tipos de tecidos e órgãos, como folhas, raízes, brotos, frutos, grãos e caules, como fonte de reserva energética (AVÉROUS; HALLEY, 2014). O amido, sintetizado pela fixação de carbono durante a fotossíntese, é consumido pela planta na ausência de luz, na forma de glicose. Até o momento de sua utilização, a glicose se polimeriza e se mantém empacotada na forma de grânulos de amido, apresentando assim uma

maior estabilidade. A síntese de amido ocorre nos cloroplastos, e o armazenamento no amiloplasto (PREISS, 2009; TAGGART, 2004; TAN; HALLEY, 2014).

Estrutura

A composição química do amido compreende cadeias predominantemente lineares de amilose e cadeias ramificadas de amilopectina, densamente empacotadas numa estrutura granular semicristalina. As proporções em que essas estruturas aparecem diferem entre as fontes botânicas, entre as variedades de uma mesma espécie e ainda, numa mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta e das condições de cultivo. Estas variações podem resultar em grânulos de amido com propriedades físico-químicas e tecnológicas diferenciadas, o que pode afetar sua aplicação industrial (LI et al., 2018; WANG; WHITE, 1994).

A amilose, um polímero de alta massa molar, constitui-se de 840 a 22.000 unidades de glicose unidas por ligação α 1-4. Apesar da amilose ser comumente denominada como uma molécula linear, ramificações formadas por ligações α 1-6, estão presentes a cada 170 a 500 unidades glicosídicas aproximadamente (HAQ et al., 2019; PREISS, 2009; SHRESTHA; HALLEY, 2014).

A amilopectina, uma das maiores macromoléculas encontradas na natureza, apresenta grau de polimerização médio de dois milhões de unidades glicosídicas, e massa molar aproximadamente mil vezes maior que da amilose (HAQ et al., 2019; KARIM; NORZIAH; SEOW, 2000).

O modelo mais aceito para a estrutura da amilopectina foi proposto por Hizukuri (1986). O modelo de *cluster* descreve que nos pontos de ramificação α 1-6 ocorrem cadeias laterais, chamadas cadeias B, de diversos tamanhos: B1, com 20 a 24 unidades de glicose; B2, com 42 a 48; B3, com 69 a 75; B4 com 104 a 115 moléculas de glicose. Essas cadeias podem ser separadas por cromatografia devido à diferença de massa molar; apresentam uma frequência de distribuição polimodal, e ocorrem em diferentes proporções em amidos de diferentes fontes, com predominâncias das cadeias B2 e B3 (HIZURURI, 1986; PÉREZ; BALDWIN; GALLANT, 2009).

A estrutura do grânulo de amido apresenta característica semicristalina, devido à alternância de lamelas amorfas e cristalinas, formadas concêntricamente a partir do hilo. A amilose encontra-se na parte amorfa, enquanto a amilopectina está presente em ambas as estruturas. As cadeias laterais de amilopectina, entrelaçadas em duplas hélices, formam a lamela

cristalina, e os pontos de ramificação compõe a fase amorfa, juntamente com a amilose (BELLO-PEREZ et al., 2018; SVIHUS; VERVIK, 2016).

A cristalinidade do grânulo pode ser comprovada pelo fenômeno da birrefringência, descrita como a habilidade da amostra refratar a luz polarizada em duas direções. O padrão de birrefringência, característico de todos os grânulos de amido nativos, representa o arranjo radial das moléculas de amilopectina, cujas cadeias formam ângulos de 90 ° com o terminal redutor do hilo. A birrefringência pode ser verificada em microscópio óptico pela formação da Cruz de Malta, e representa um alto grau de organização da região cristalina da molécula (PÉREZ; BALDWIN; GALLANT, 2009; SHRESTHA; HALLEY, 2014).

Gelatinização e retrogradação

Quando aquecido em presença de água, o amido passa por um processo irreversível de transição ordem-desordem molecular, chamado gelatinização, que provoca várias mudanças nos grânulos, como intumescimento, absorção de água, perda da cristalinidade e lixiviação da amilose (ANDRABI et al., 2016; BERTOFT, 2004; SÁRKA; DVORÁČEK, 2017).

Durante a gelatinização, a água se difunde pelo interior do grânulo sendo absorvida pela região amorfa que passa por um intumescimento, gerando estresse nas moléculas de amilopectina presentes na região cristalina. Esse estresse causa dissociação nas duplas hélices com a perda da estrutura cristalina, levando a perda da integridade do grânulo. A gelatinização inicia no hilo e rapidamente se espalha por toda a molécula. Ocorre inicialmente na região amorfa, favorecida pelas fracas ligações de hidrogênio dessa área (DONALD, 2004; MASON, 2009).

A gelatinização está associada ao desaparecimento da birrefringência devido à perda da ordenação molecular (BILIADERIS, 2009). A mudança da forma semicristalina para a forma amorfa aumenta a digestibilidade do amido, pois o torna mais acessível à ação enzimática (MA et al., 2017; TESTER et al., 2004).

A temperatura de transição e entalpia de gelatinização são características para cada tipo de amido. Além do teor de amilose, a diferença na estrutura da amilopectina influencia as propriedades do amido (WONG et al., 2003; WONG; JANE, 1997). Grandes proporções de cadeias laterais longas contribuem para uma alta estabilidade do grânulo, que necessita de maior temperatura para que ocorra a gelatinização (DU et al., 2014).

O intumescimento dos grânulos de amido e a lixiviação da amilose durante o processo de gelatinização levam à formação de uma rede tridimensional, e aumento da viscosidade de

pasta (SARKER et al., 2013). A pasta de amido formada caracteriza-se como uma massa viscosa que apresenta uma fase contínua de amilose e/ou amilopectina solubilizada e uma fase descontínua de grânulos de amido remanescentes (AMBIGAIPALAN et al., 2011).

Após a gelatinização e resfriamento da pasta de amido ocorre um processo de interação molecular denominado retrogradação, no qual as moléculas de amilose se associam a outras unidades de glicose e formam duplas hélices, enquanto a amilopectina se recristaliza pela associação das suas cadeias laterais curtas (HOOVER, 2000; SINGH et al., 2003; SHRESTHA; HALLEY, 2014).

As características estruturais do grânulo, como razão amilose:amilopectina, tamanho e distribuição das cadeias laterais da amilopectina e arranjo das moléculas, exercem influência nas propriedades de gelatinização e retrogradação, principais responsáveis pelo uso industrial dos amidos (SMITH, 2001).

Os amidos nativos mais comumente utilizados na alimentação humana são derivados de grãos (trigo, milho, arroz, cevada) e raízes/tubérculos (batata e mandioca) (PERIS-TORTAJADA, 2004). Recentemente outras fontes de amido têm sido estudadas e apresentam potencial de aplicação, como as frutas imaturas (banana e manga) e as leguminosas (ervilha, feijão, grão de bico) (ALCÁZAR-ALAY; MEIRELES, 2015; HOOVER et al., 2010; IZIDORO et al., 2011; OVANDO-MARTINEZ et al., 2011; WANI et al., 2016).

Amido de feijão

Du et al. (2014) descreveram o amido de feijão com formato oval, superfície lisa, sem fissuras aparentes, com diâmetro entre 25,3 a 27,4 μm . Esses autores estudaram o amido de quatro diferentes variedades de feijão e encontraram valores de amilose entre 32 e 45%, e temperatura de pico de gelatinização entre 71,7 e 73,6 $^{\circ}\text{C}$.

Demiate et al. (2016) caracterizaram amidos de feijão de diferentes variedades consumidos no Brasil, em relação a estrutura fina das moléculas de amilose e amilopectina. Os autores estudaram a morfologia dos grânulos, teor de amilose, tamanho das cadeias laterais da amilopectina e relacionaram essas características às propriedades de pasta, gelatinização, retrogradação e digestibilidade do amido. Foi demonstrado que o alto teor de amilose das amostras teve correlação positiva com a retrogradação; a entalpia de dissociação do amido retrogradado (ΔH_r) apresentou correlação negativa com as cadeias laterais curtas ($\text{DP } 6 \text{ a } 12$) e positiva com as cadeias laterais longas ($\text{DP} \geq 37$), ou seja, quanto maior o comprimento médio das cadeias laterais de amilopectina, maior o ΔH_r .

Em relação à digestibilidade do amido de feijão, Demiate et al. (2016) encontraram altos teores de SDS (amido de digestão lenta) e RS (amido resistente) após cozimento, em relação aos amidos de mandioca e milho, relacionados à presença de cadeias laterais curtas da amilopectina, que apresentam maior quantidade de ligações α 1-6 que as laterais longas, e dificultam ou atrasam a digestão enzimática.

Ferreira et al. (2017) estudaram o efeito do tempo de estocagem em diferentes condições de umidade e temperatura, em feijão preto, e observaram que a estocagem a alta umidade e alta temperatura causa degradação parcial na estrutura cristalina do grânulo, e consequente aumento do inchamento dos grânulos; mas causa decréscimo na solubilidade do amido e na dureza do gel. Feijões armazenados em condições não controladas de umidade e temperatura desenvolvem o defeito HTC (*hard to cook*). Os autores demonstraram que mesmo sob condições não ideais de armazenamento, feijões HTC podem apresentar características tecnológicas interessantes para serem utilizados na indústria de alimentos.

Amido de feijão Carioca

O estudo de Demiate et al. (2016) demonstrou que o feijão Carioca apresenta grânulos não perfeitamente esféricos, mas em formato ovalado, com diâmetro médio de 27,3 μ m. O alto teor de amilose (34,9%) do amido de feijão Carioca resultou em alta tendência à retrogradação (58,7%), menor claridade de pasta, resistência ao inchamento dos grânulos, e estabilidade ao cozimento sob agitação. O grau de polimerização (DP) médio das cadeias laterais de amilopectina de feijão carioca foi demonstrado em 21 unidades de glicose. A distribuição polimodal das cadeias laterais de amilopectina mostrou que 44% das cadeias apresentam DP 13-24; 29,9% DP 6-12; 13,9% DP $\geq$ 37 e 12,2% DP 25-36.

Rupollo et al. (2011) estudaram feijão carioca estocado em três diferentes condições: a 5 °C e condições herméticas, a 15 °C sob atmosfera modificada de nitrogênio e a 25 °C em atmosfera normal, e o efeito dessas condições nas características do amido. Esses autores demonstraram que as condições de armazenamento influenciaram algumas características do amido. Sob condições herméticas a 5 °C houve redução da cristalinidade e da entalpia de gelatinização do amido, e aumento da viscosidade *setback*.

Existem estudos sobre amido de diferentes tipos de feijão, como mexicano, fava, mungo, branco e preto (BETANCUR-ANCONA; LÓPEZ-LUNA; CHEL-GUERRERO, 2003; PUJOLÀ; FARRERAS; CASAÑAS, 2007; RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2014; WANG; RATNAYAKE, 2014; WU et al., 2016). Mas ainda há escassez de trabalhos publicados sobre

o feijão Carioca, visto se tratar de uma variedade típica brasileira (DEMIATE et al., 2016; GRANZA et al., 2015; RUPOLLO et al., 2011).

1.3 PROTEÍNA

Dentre os macronutrientes presentes nos alimentos, a proteína é percebida pela população como a mais nutritiva e com maior apelo de saudabilidade (SORIA-HERNÁNDEZ; SERNA-SALDÍVAR; CHUCK-HERNÁNDEZ, 2015).

O mercado de proteínas está segmentado em proteínas de origem animal, caracterizadas por possuir alto valor nutricional, mas alto custo; e de origem vegetal, que apesar do alto valor nutricional, muitas vezes apresentam problemas de baixa digestibilidade (ALMEIDA COSTA et al., 2006; BOYLE et al., 2018; DURANTI, 2006).

As proteínas vegetais, como ingredientes em alimentos, podem apresentar funções interessantes como melhoria de textura, gelificação, emulsificação, formação de espuma, entre outros (BRISHTI et al., 2017; SORIA-HERNÁNDEZ; SERNA-SALDÍVAR; CHUCK-HERNÁNDEZ, 2015). A proteína de soja, e nos últimos anos, a caseína, têm sido amplamente empregadas na indústria de alimentos para esses fins. Outras culturas ricas em proteína têm sido estudadas, incluindo as leguminosas: ervilhas, lentilha, feijão, grão de bico (ADEBOWALE et al., 2007; BETANCUR-ANCONA; LÓPEZ-LUNA; CHEL-GUERRERO, 2003; CARBONARO; MASELLI; NUCARA, 2015; CARRASCO-CASTILLA et al., 2012).

O teor de proteínas em legumes varia de 17 a 40%, muito superior ao conteúdo em cereais, de 7 a 14%, e comparável ao conteúdo em carnes, de 18 a 25% (ALMEIDA COSTA et al., 2006). Como fonte proteica uma porção de feijão (90 g) fornece aproximadamente 16% da necessidade nutricional diária. A importância do consumo se deve ao elevado teor do aminoácido essencial lisina, escasso nas proteínas de cereais. Uma porção de feijão fornece 25% da necessidade diária desse aminoácido (MESSINA, 2014). Por outro lado, as proteínas de leguminosas geralmente apresentam baixo teor de aminoácidos sulfurados, como metionina, cisteína e triptofano (DURANTI, 2006; HAVEMEIER; ERICKSON; SLAVIN, 2017; SWANSON, 1990).

Contudo, a disponibilidade dos aminoácidos de leguminosas é comprometida pela presença de fatores anti-nutricionais, incluindo inibidores de enzimas responsáveis pela hidrólise das proteínas, como tripsina, quimiotripsina e amilases. Os inibidores de enzima, porém, são facilmente inativados por etapas prévias ao consumo ou ao processamento, como

maceração, cozimento, ou outra forma de processamento térmico (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010; DURANTI, 2006).

O estudo das características químicas e funcionais de novas fontes de proteína com potencial uso industrial é importante para o desenvolvimento de novos ingredientes que possam ser utilizados na indústria de alimentos (SORIA-HERNÁNDEZ; SERNA-SALDÍVAR; CHUCK-HERNÁNDEZ, 2015).

Solubilidade, absorção de água e óleo, emulsificação, formação de espuma e outras propriedades tecnológicas das proteínas são determinadas pela composição em aminoácidos, estrutura, conformação, hidrofobicidade da superfície, razão hidrofobicidade:hidrofilicidade; assim como as condições de processo: pH, temperatura e interação das proteínas com outros compostos do alimento (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010; KINSELLA; MELACHOURIS, 1976).

A solubilidade da maioria das proteínas de leguminosas é alta em meio ácido ou alcalino, mas apresenta decréscimo próximo ao ponto isoelétrico (pH entre 4,0 e 6,0). (ADEBOWALE et al., 2007; BOYE; ZARE; PLETCH, 2010). O perfil de solubilidade fornece informações importantes sobre a desnaturação e a precipitação das proteínas, e pode ser influenciado principalmente pelo pH, concentração e força iônica. O conhecimento do perfil de solubilidade é essencial na determinação do tipo de alimento no qual a proteína pode ser incorporada (ADEBOWALE et al., 2007; KINSELLA; MELACHOURIS, 1976).

A atividade emulsificante (EA) e a estabilidade da emulsão (ES) são propriedades que refletem a habilidade das proteínas em prevenir coalescência, floculação e sedimentação de emulsões contendo óleo e água. As propriedades emulsificantes são afetadas pela razão hidrofobicidade:hidrofilicidade e pela conformação das proteínas (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010).

Isolados proteicos de leguminosas apresentam boa capacidade de gelificação e podem ser aplicados em alimentos como agentes estruturantes (SHAND; PIETRASIK; WANASUNDARA, 2007). As propriedades estruturais foram atribuídas às ligações cruzadas tridimensionais existentes no interior do gel proteico, que são sustentadas por meio de ligações dissulfeto, ligações de hidrogênio e interação hidrofóbica (AROGUNDADE et al., 2014; TOLSTOGUZOV, 1993).

O interesse no uso de proteínas de leguminosas tem aumentado principalmente devido aos fatores nutricionais e benéficos a saúde apresentado por essas culturas, e pelo aumento com a preocupação com alimentos alergênicos (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010; DURANTI, 2006; SINGH et al., 2017). O uso de proteínas de leguminosas pode ser interessante por não apresentar

restrições relativas à transgenia, como ocorre com a soja, nem mesmo questões relativas às proteínas alergênicas. Proteína de soja e caseína estão incluídas nas listas prioritárias de alergênicos, assim como amendoins, nozes em geral, ovos, peixes e crustáceos e cereais com glúten. Leguminosas, apesar do alto conteúdo em proteínas, e de possuírem algumas frações proteicas (em pequenas quantidades) consideradas alergênicas, como a glutelina, não figuram nas listas prioritárias de alergênicos (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010; MARTINEZ SAN IRENEO et al., 2000; TAN; YING-YUAN; GAN, 2014).

1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos são produtos secundários do metabolismo de plantas que se caracterizam por possuírem em sua estrutura pelo menos um anel aromático associado com um ou mais grupos hidroxílicos (ROCHA-GUZMÁN et al., 2007).

De acordo com Koes; Quattrocchio e Mol (1994) os compostos fenólicos apresentam diversas funções nas plantas: pigmentação das pétalas, tornando-as atrativas para insetos polinizadores; prevenção de ataques de patógenos devido à adstringência; proteção contra danos da radiação UV; e participação na reprodução sexual e na estrutura dos tecidos. Nos alimentos, os polifenóis contribuem com a coloração, adstringência, acidez, odor e amargor (BRAVO, 1998). Esses compostos podem ser encontrados em folhas, raízes, frutas, leguminosas e sementes (FAN et al., 2016; GÜLÇIN; ILHAMI, 2012; LIN et al., 2008; ROCHA-GUZMAN et al., 2007).

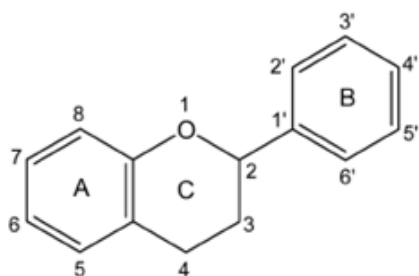
Além da contribuição nas características sensoriais dos alimentos, vários estudos têm relacionado os compostos fenólicos à atividade antioxidante e a efeitos antidepressivo, antibacteriano, anti-inflamatório, antidiarreico (BRAVO, 1998; GARCIA-LAFUENTE et al., 2014; MOJICA et al., 2015). Segundo Chen et al. (2015a), estudos evidenciam que os compostos fenólicos podem influenciar o índice glicêmico, já que compostos fenólicos ligados inibem a α -glucosidase e a lipase pancreática. De acordo com Hernández-Ramírez et al. (2009), estudos epidemiológicos demonstram que o consumo de polifenóis de feijão apresentam um efeito protetor contra câncer gástrico na população mexicana.

Estrutura química

Os flavonoides, compostos de baixa massa molar, constituídos de quinze átomos de carbono na configuração C6-C3-C6 (Figura 1.1) são formados a partir dos aminoácidos

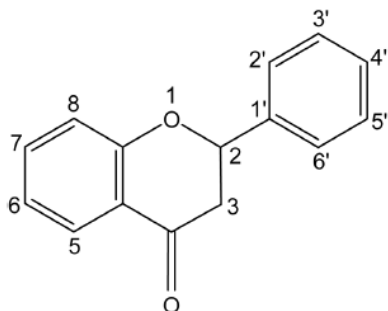
fenilalanina, tirosina e malonato. O anel aromático A deriva da via acetato/malonato, enquanto que o anel B deriva da fenilalanina por meio da via chiquimato. Variações nos compostos químicos substituintes do anel C resultam em diferentes classes de flavonoides, como flavonols, flavanols, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas (Tabela 1.1), dentre os quais flavonas e flavonols são os mais abundantes. Flavonoides, a maior classe de compostos fenólicos, podem ocorrer na forma aglicona, porém são mais comumente encontrados como derivados glicosídicos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; BRAVO, 1998; KOES; QUATTROCCHIO; MOL, 1994; STALIKAS, 2007).

Figura 1.1 Estrutura básica dos flavonoides



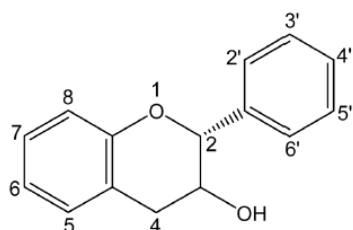
Fonte: STALIKAS (2007)

Tabela 1.1 Classes de flavonoides



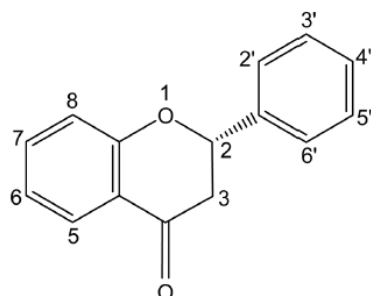
Flavonas

Posição	5	7	3'	4'
Apigenina	OH	OH	-	OH
Luteolina	OH	OH	OH	OH
Crisina	OH	OH	-	-



Flavan-3-óis

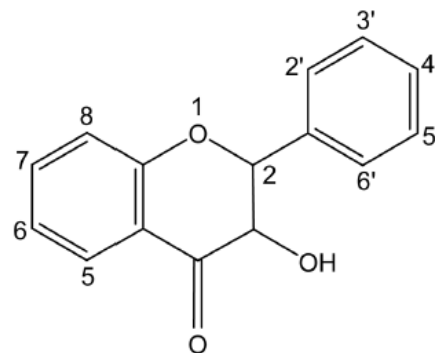
Posição	3	5	7	3'	4'
Catequina	β OH	OH	OH	OH	OH
Epicatequina	α OH	OH	OH	OH	OH
Epigallocatequina	α OH	OH	OH	OH	OH



Flavanonas

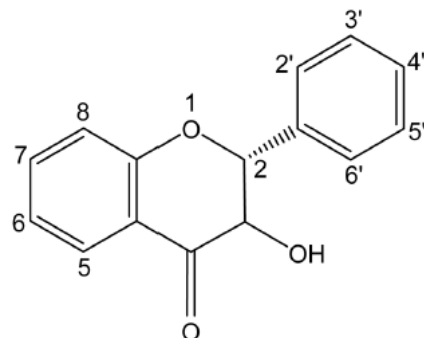
Posição	5	7	3'	4'
Naringenina	OH	OH	-	OH
Naringina	OH	O-Rha-Glu	-	OH
Hesperetina	OH	OH	OH	OCH ₃
Hesperidina	OH	O-Rha-Glu	OH	OCH ₃

Fonte: STALIKAS, 2007



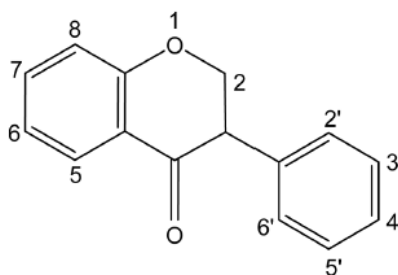
Flavonols

Posição	5	7	3'	4'	5'
Quercetina	OH	OH	OH	OH	-
Camferol	OH	OH	-	OH	-
Galantina	OH	OH	-	-	-
Fisetina	-	OH	OH	OH	-
Mircetina	OH	OH	OH	OH	OH



Flavanonol

Posição	5	7	3'	4'
Taxifolina	OH	OH	OH	OH

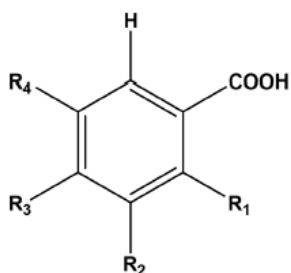


Isoflavonas

Posição	5	7	4'
Genisteina	OH	OH	OH
Genistina	OH	0-Glu	OH
Daidzeina	-	OH	OH
Daidzina	-	0-Glu	OH
Ononina	OH	0-Glu	CH ₃

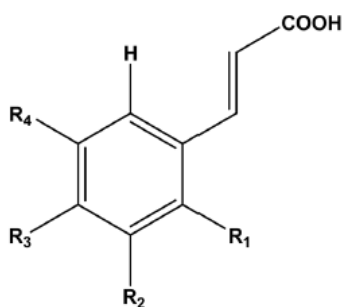
Os ácidos fenólicos, designados quimicamente como fenóis que se apresentam ligados a um grupo carboxílico, ocorrem naturalmente em duas classes: ácidos hidroxicinâmicos, que apresentam nove átomos de carbono e ácidos hidroxibenzóicos, com sete átomos de carbono (Tabela 1.2) (BRAVO, 1998).

Tabela 1.2 Estrutura dos ácidos fenólicos



Ácidos Hidroxibenzóicos

Posição	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ácido benzoico	H	H	H	H
Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzoico	H	H	OH	H
Ácido vanílico	H	OCH ₃	OH	H
Ácido gálico	H	OH	OH	OH
Ácido sirínico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácido gentísico	OH	H	H	OH
Ácido verátrico	H	OCH ₃	OCH ₃	H
Ácido salicílico	OH	H	H	H



Ácidos Hidroxicinâmicos

Posição	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ácido cinâmico	H	H	H	H
Ácido <i>o</i> -cumárico	OH	H	H	H
Ácido <i>m</i> -cumárico	H	OH	H	H
Ácido <i>p</i> -cumárico	H	H	OH	H
Ácido ferúlico	H	OCH ₃	OH	H
Ácido sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácido caféico	H	OH	OH	H

Fonte: STALIKAS, 2007

A estrutura química dos compostos fenólicos está diretamente relacionada à sua capacidade antioxidante. Em ácidos fenólicos, a atividade antioxidante depende do número e posição dos grupos hidroxílicos em relação ao grupo carboxil, e da substituição de outros grupamentos. A atividade antioxidante aumenta com o grau de hidroxilação, como no caso do ácido gálico, que apresenta três hidroxilas; e diminui com a substituição das hidroxilas por outros grupamentos, como o grupo metil no ácido vanílico e sirínico. Ácidos hidroxicinâmicos apresentam maior atividade antioxidante que ácidos hidroxibenzóicos devido à estrutura $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ ligado ao anel aromático, que garante maior habilidade de doação de H^+ e estabilização dos radicais livres que o grupo $-\text{COOH}$ presente nos ácidos hidroxibenzóicos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Nos flavonoides a relação da estrutura química com a atividade antioxidante é mais difícil de ser estabelecida, devido à própria complexidade da estrutura. De acordo com Van Acker et al. (1996), o anel B apresenta maior influência na atividade antioxidante que os anéis A e C. A maior atividade antioxidante se dá quando o anel B se apresenta na forma de grupo catecol (3'-OH e 4'-OH). Contudo, os anéis A e C influenciam a atividade antioxidante na ausência do grupo catecol no anel B. A presença da dupla ligação entre C2-C3 e da hidroxila no C3 (3-OH) no canferol, por exemplo, faz com que esse composto apresente capacidade antioxidante maior que compostos que não contém essa estrutura, mesmo não apresentando o grupo catecol. Por sua vez, a combinação da dupla ligação C2-C3, 3-OH e grupo catecol fazem da quercetina um composto com maior atividade antioxidante que outros compostos que apresentam o grupo catecol (VAN ACKER et al., 1996).

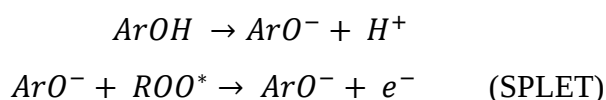
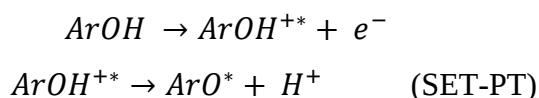
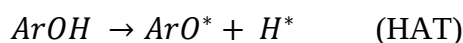
Mecanismo de ação

Radicais livres resultam da atividade metabólica normal, assim como da dieta e do ambiente a que as células estão expostas. Um desequilíbrio nos fatores causadores de radicais livres pode causar oxidação de lipídios, proteínas e DNA e resultar em aumento de riscos de doenças crônicas e degenerativas (GÜLÇİN; ILHAMI, 2012).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas à concentração do substrato oxidável, inibem ou atrasam significativamente a oxidação desse substrato (NIKI, 2010).

A ação antioxidante atribuída aos compostos fenólicos em geral reflete-se no auxílio do balanceamento do estresse oxidativo gerado pelos radicais livres, visto que os antioxidantes atuam diretamente como sequestradores dos radicais livres e como cofatores de enzimas que também exercem atividade antioxidante (MASISI; BETA; MOGHADASIAN, 2016).

Os antioxidantes ($ArOH$) atuam por sequestro dos radicais livres antes que esses possam atacar moléculas biologicamente essenciais às células. Os mecanismos mais aceitos de ação antioxidante descrevem a transferência de átomos de hidrogênio (HAT), a transferência de elétron seguida de transferência de próton (SET-PT), ambos gerando um composto estável (ArO°). Um terceiro mecanismo recentemente descoberto, transferência de elétrons por perda sequencial de prótons (SPLET), parece ocorrer em moléculas que apresentam várias espécies reativas, como flavonoides com vários grupamentos hidroxilas. (GÜLÇİN; ILHAMI, 2012; NIKI, 2010).



Métodos espectrofométricos têm sido amplamente utilizados para determinação da atividade antioxidante de alimentos. Entre os mais comuns encontram-se os ensaios de DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazil), ABTS (2,2' – azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), ORAC (Capacidade de absorção de radicais de oxigênio) e FRAP (Potencial antioxidante de redução do plasma). Os ensaios baseiam-se no mesmo princípio: a geração de um radical reativo colorido sinteticamente que será neutralizado pela amostra; e/ou a geração de um composto redox-ativo que será reduzido pela amostra, ambos monitorados por espectrofotômetro (UV-Vis-Fluorescência). A quantificação da capacidade antioxidante pode ser feita comparando-se a amostra a um padrão, como TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) ou vitamina C (FLOEGEL et al., 2011).

Compostos fenólicos em feijão

Vários pesquisadores têm estudado a capacidade antioxidante e o perfil fenólico de feijões de diferentes variedades. Entre esses compostos frequentemente encontrados figuram ácidos fenólicos, flavonols, flavanols, isoflavonas, antocianinas e taninos.

Os flavonols têm sido descritos como a maior classe de compostos fenólicos, e camferol como um dos mais abundantes compostos dessa classe, seguido de quercetina e rutina (GAN et al., 2016; LIN et al., 2008; RANILLA; GENOVESE; LAJOLO, 2009).

Entre os ácidos fenólicos predominam os ácidos hidroxicinâmicos, presentes como *p*-cumárico, ferúlico, clorogênico, cafeico, sinapco. Ácidos hidroxibenzóicos, como ácido vanílico, gálico, siríngico são encontrados em menor quantidade (LIN et al., 2008; LUTHRIA; PASTOR-CORRALES, 2006; RANILLA; GENOVESE; LAJOLO, 2009; MOJICA et al., 2015).

Antocianinas como cianidina, malvadina, delphinidina e pelargonina têm sido encontradas em feijões de casca escura (LIN et al., 2008; MOJICA et al., 2015).

As isoflavonas daidzina, daidzeina e genisteína foram identificadas em diferentes variedades de feijão por Lima et al. (2014) e Mojica et al. (2015).

Entre os fatores que influenciam quantitativa e qualitativamente o perfil fenólico de feijão pode-se citar variedade, genótipo das plantas, grau de germinação, além de fatores ambientais incluindo ocorrência de chuvas, incidência de luz e nutrição mineral (BRAVO, 1994; FAN et al., 2016; IGNAT; VOLF; POPA, 2011; OOMAH; CARDADOR-MARTÍNEZ; LOARCA-PIÑA, 2006; ROCHA-GUZMAN et al., 2007; STALIKAS, 2007).

Extração de compostos fenólicos

Diferenças nas estruturas químicas dos compostos influenciam suas características como polaridade, acidez, solubilidade e estabilidade. Por isso faz-se necessário escolher condições otimizadas de extração de acordo com propriedades a serem analisadas (NACZK; SHAHIDI, 2004; STALIKAS, 2007).

A solubilidade dos compostos fenólicos varia com a polaridade do solvente empregado, com o método de extração escolhido, temperatura, tempo, pH do meio, tamanho de partícula, razão amostra:solvente e com a matriz alimentar em que o composto está inserido (BELWAL et al., 2016; NACZK; SHAHIDI, 2004; ROCHA-GUZMAN et al., 2007).

A extração de compostos fenólicos tem sido proposta por uso de solventes orgânicos, especialmente etanol, metanol, propanol, acetona, acetato de etila em diferentes classes de alimentos, como cereais, legumes, frutas e vegetais (CHANDRASEKARA et al., 2016; GAN et al., 2016; LIN et al., 2008; NACZK; SHAHIDI, 2004).

O estudo da influência dessas variáveis pode ser conduzido pelo uso da Metodologia de superfície de resposta (RSM) para otimizar as condições de extração. O objetivo da RSM é avaliar simultaneamente a influência de múltiplas variáveis, em diversos níveis, na resposta de interesse (BEZERRA et al., 2008). Muitos estudos têm sido realizados com o uso dessa técnica para determinação de condições de extração de compostos fenólicos em diferentes classes de alimentos (ALBERTI et al., 2014; HANDA et al., 2016; HAYTA; ISÇMEN, 2017; MOJICA; BERHOW; DE MEJIA., 2017; ZIELINSKI et al., 2015).

1.5 CONCLUSÃO

O feijão Carioca destaca-se como um dos alimentos mais consumidos no Brasil, por sua alta qualidade nutricional, especialmente alto teores de proteína e amido. Essa revisão bibliográfica abordou aspectos de estrutura química, nutricional e tecnológica do amido, proteína e compostos fenólicos do feijão Carioca, para permitir uma melhor compreensão da necessidade de estudo dessas frações.

Através do estudo das características dos macronutrientes do feijão é possível determinar quais aspectos químicos e estruturais são importantes no futuro desenvolvimento de ingredientes tecnológicos que possam melhorar o aproveitamento dessa matéria-prima.

REFERÊNCIAS

- ADEBOWALE, Y. A.; ADEYEMI, I. A.; OSHODI, A. A.; NIRANJAN, K. Isolation, fractionation and characterisation of proteins from *Mucuna bean*. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 287–299, 2007.
- ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ZARDO, D. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A.; MAFRA, L. I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151–158, 2014.
- ALCÁZAR-ALAY, S. C.; MEIRELES, M. A. A. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 35, n. 2, p. 215-236, 2015.
- ALMEIDA COSTA, G. E.; DA SILVA QUEIROZ-MONICI, K.; PISSINI MACHADO REIS, S. M.; DE OLIVEIRA, A. C. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. **Food Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 327–330, 2006.
- AMBIGAIPALAN, P.; HOOVER, R.; DONNER, E.; LIU, Q.; JAISWAL, S.; CHIBBAR, R.; NANTANGA, K. K. M.; SEETHARAMAN, K. Structure of faba bean, black bean and pinto bean starches at different levels of granule organization and their physicochemical properties. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2962–2974, 2011.
- ANDRABI, S. N.; WANI, I. A.; GANI, A.; HAMDANI, A. M.; MASOODI, F. A. Comparative study of physico-chemical and functional properties of starch extracted from two kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and green gram cultivars (*Vigna radiata* L.) grown in India. **Starch/Stärke**, v. 68, n. 5–6, p. 416–426, 2016.
- AROGUNDADE, L. A.; MU, T.-H.; DENG, F.-M.; ABEGUNDE, O. K.; SUN, M.-J. Nutrition, gelation rheology and gel microstructure of isoelectric and ultrafiltered/diafiltered African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) protein isolates. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1018-1024, 2014.
- AVÉROUS; L. R.; HALLEY, P. J. Starch Polymers: From the Field to Industrial Products. In: HALLEY, P. J.; AVÉROUS, L. R. **Starch Polymers – From Genetic Engineering to Green Applications**. Burlington : Elsevier, 2014.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BELLO-PEREZ, L. A.; FLORES-SILVA, P. C.; AGAMA-ACEVEDO, E.; TOVAR, J. Starch digestibility : past, present, and future. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2018.
- BELWAL, T.; DHYANI, P.; BHATT, I. D.; RAWAL, R. S.; PANDE, V. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 207, n. June, p. 115–124, 2016.

BERTOFT, A. Analyzing starch structure. In: ELIASSON, A.C. **Starch in food: structure, functions and applications**. Boca Raton : CRC Press, 2004.

BETANCUR-ANCONA, D.; LÓPEZ-LUNA, J.; CHEL-GUERRERO, L. Comparison of the chemical composition and functional properties of *Phaseolus lunatus* prime and tailing starches. **Food Chemistry**, v. 82, n. 2, p. 217–225, 2003.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BILIADERIS, C. G. Structural Transitions and Related Physical Properties of Starch. In: **Starch: Chemistry and Technology**. 3rd ed. Burlington : Elsevier, 2009.

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

BOYLE, C.; HANSEN, L.; HINNENKAMP, C.; ISMAIL, B. P. Emerging Camelina Protein: Extraction, Modification, and Structural/Functional Characterization. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 95, n. 8, p. 1049–1062, 2018.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRISHTI, F. H.; ZAREI, M.; MUHAMMAD, S. K. S.; ISMAIL-FITRY, M. R.; SHUKRI, R.; SAARI, N. Evaluation of the functional properties of mung bean protein isolate for development of textured vegetable protein. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 4, p. 1595–1605, 2017.

CARBONARO, M.; MASELLI, P.; NUCARA, A. Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. **Food Research International**, v. 76, p. 19-30, 2015.

CARRASCO-CASTILLA, J.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A. J.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C.; JACINTO-HERNÁNDEZ, C.; ALAIZ, M.; GIRÓN-CALLE, J.; VIOQUE, J.; DÁVILA-ORTIZ, G. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1789-1795, 2012.

CHANDRASEKARA, A.; RASEK, O. A.; JOHN, J. A.; CHANDRASEKARA, N.; SHAHIDI, F. Solvent and Extraction Conditions Control the Assayable Phenolic Content and Antioxidant Activities of Seeds of Black Beans, Canola and Millet. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 2, p. 275–283, fev. 2016.

CHEN, P. X.; DUPUIS, J. H.; MARCONE, M. F.; PAULS, P. K.; LIU, R.; LIU, Q.; TANG, Y.; ZHANG, B.; TSAO, R. Physicochemical Properties and *in Vitro* Digestibility of Cooked Regular and Nondarkening Cranberry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Effects on Bioaccessibility, Phenolic Composition, and Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 48, p. 10448–10458, 2015a.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira - Grãos**, v. 6, n. 7, 2019.

DARMADI-BLACKBERRY, I.; WAHLQVIST, M. L.; KOURIS-BLAZOS, A.; STEEN, B.; LUKITO, W.; HORIE, Y.; HORIE, K. Legumes: the most important dietary predictor of survival in older people of different ethnicities. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 13, n. 2, p. 217-220, 2004.

DEMIATE, I. M.; FIGUEROA, A. M.; GUIDOLIN, M. E. B. Z.; DOS SANTOS, T. P. R.; YANGCHENG, H.; CHANG, F.; JANE, J.L. Physicochemical characterization of starches from dry beans cultivated in Brazil. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 812-820, 2016.

DONALD, A.M. Understanding starch structure and functionality. In: ELIASSON, A.C. **Starch in food: structure, functions and applications**. Boca Raton : CRC Press, 2004.

DU, S. KUI; JIANG, H.; YU, X.; JANE, J. L. Physicochemical and functional properties of whole legume flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 308–313, 2014.

DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, v. 77, n. 2, p. 67-82, 2006.

FAN, G. J.; NDOLO, V. U.; KATUNDU, M.; KERR, R. B.; ARNTFIELD, S.; BETA, T. Comparison of Phytochemicals and Antioxidant Capacity in Three Bean Varieties Grown in Central Malawi. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 204–210, 2016.

FAOSTAT Food and Agriculture Organization of the United Nations, statistics division. 2017. <http://faostat3.fao.org>. Acessado em 20 Feb 2018.

FERREIRA, C. D.; ZIEGLER, V.; EL HALAL, S. L. M.; VANIER, N. L.; ZAVAREZE, E. DA R.; DE OLIVEIRA, M. Characteristics of starch isolated from black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) stored for 12 months at different moisture contents and temperatures. **Starch/Stärke**, v. 69, n. 5–6, p. 1–10, 2017.

FLOEGEL, A.; KIM, D.-O.; CHUNG, S.-J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011.

GAN, R. Y.; DENG, Z. Q.; YAN, A. X.; SHAH, N. P.; LUI, W. Y.; CHAN, C. L.; CORKE, H. Pigmented edible bean coats as natural sources of polyphenols with antioxidant and antibacterial effects. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 168–177, 2016.

GANASCINI, D.; LAURETH, J. C. U. ; MENDES, I. S.; TOKURA, L. K.; SUTIL, E. L.; VILLA, B. ; ALOVISI, A. M. T.; CAON, I. L.; MERCANTE, E.; COELHO, S. R. M. Analysis of the Production Chain of Bean Culture in Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 7, p. 256–267, 2019.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; MORO, C.; MANCHÓN, N.; GONZALO-RUIZ, A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; ROSTAGNO, M.; MATEO-VIVARACHO, L. *In vitro* anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. **Food chemistry**, v. 161, p. 216-223, 2014.

GRANZA, A. G.; TRAVALLINI, A. P.; FARIAS, F. O.; COLMAN, T. A. D.; SCHNITZLER, E.; DEMIATE, I. M. Effects of acetylation and acetylation–hydroxypropylation (dual-modification) on the properties of starch from Carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 119, n. 1, p. 769-777, 2015.

GÜLÇİN, G., ILHAMI. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012.

HALL, C.; HILLEN, C.; ROBINSON, J. G. Composition, nutritional value, and health benefits of pulses. **Cereal Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 11–31, 2017.

HANDA, C. L.; DE LIMA, F. S.; GUELFI, M. F. G.; GEORGETTI, S. R.; IDA, E. I. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. **Food Chemistry**, v. 197, p. 175-184, 2016.

HAQ, F.; YU, H.; WANG, L.; TENG, L.; HAROON, M.; KHAN, R. U.; MEHMOOD, S.; SUMME, R.; KHAN, A.; NAZIR, A. Advances in chemical modifications of starches and their applications. **Carbohydrate Research**, v. 476, n. March, p. 12–35, 2019.

HAVEMEIER, S.; ERICKSON, J.; SLAVIN, J. Dietary guidance for pulses : the challenge and opportunity to be part of both the vegetable and protein food groups. v. 1392, p. 58–66, 2017.

HAYAT, I.; AHMAD, A.; MASUD, T.; AHMED, A.; BASHIR, S. Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An Overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 580–592, 2014.

HAYTA, M.; İŞÇİMEN, E. M. Optimization of ultrasound-assisted antioxidant compounds extraction from germinated chickpea using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 208–216, 2017.

HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, R. U.; GALVÁN-PORTILLO, M. V.; WARD, M. H.; AGUDO, A.; GONZÁLEZ, C. A.; OÑATE-OCAÑA, L. F.; HERRERA-GOEPFERT, R.; PALMA-COCA, O.; LÓPEZ-CARRILLO, L. Dietary intake of polyphenols, nitrate and nitrite and gastric cancer risk in Mexico City. **International journal of cancer**, v. 125, n. 6, p. 1424-1430, 2009.

HIZUKURI, S. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. **Carbohydrate research**, v. 147, n. 2, p. 342-347, 1986.

HOOVER, R. Acid-treated starches. **Food Reviews International**, v. 16, n. 3, p. 369-392, 2000.

HOOVER, R.; HUGHES, T.; CHUNG, H. J.; LIU, Q. Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 399–413, 2010.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

IZIDORO, D. R.; SIERALOWSKI, M. R.; HAMINIUK, C. W. I.; SOUZA, C. F. S.; SCHEER, A. P. Physical and chemical properties of ultrasonically, spray-dried green banana (*Musa cavendish*) starch. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 639-648, 2011.

JENKINS, D. J. A.; KENDALL, C. W. C.; AUGUSTIN, L. S. A.; MITCHELL, S.; SAHYE-PUDARUTH, S.; BLANCO MEJIA, S.; CHIAVAROLI, L.; MIRRAHIMI, A.; IRELAND, C.; BASHYAM, B.; VIDGEN, E.; DE SOUZA, R. J.; SIEVENPIPER, J. L.; COVENEY, J.; LEITER, L. A.; JOSSE, R. G. Effect of Legumes as Part of a Low Glycemic Index Diet on Glycemic Control and Cardiovascular Risk Factors in Type 2 Diabetes Mellitus. **Archives of Internal Medicine**, v. 172, n. 21, p. 1653, 2012.

JENKINS, P. J.; CAMERON, R. E.; DONALD, A. M. A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. **Starch-Stärke**, v. 45, n. 12, p. 417-420, 1993.

JEONG, D.; HAN, J.; LIU, Q.; CHUNG, H. Food Hydrocolloids Effect of processing, storage, and modification on *in vitro* starch digestion characteristics of food legumes: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 90, n. December 2018, p. 367–376, 2019.

KAN, L.; NIE, S.; HU, J.; WANG, S.; CUI, S. W.; LI, Y.; XU, S.; WU, Y.; WANG, J.; BAI, Z.; XIE, M. Nutrients, phytochemicals and antioxidant activities of 26 kidney bean cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 467–477, 2017.

KARIM, A. A.; NORZIAH, M. H.; SEOW, C. C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 9–36, 2000.

KATO, L. S.; DE NADAI FERNANDES, E. A.; BACCHI, M. A.; SARRIÉS, G. A.; REYES, A. E. L. Elemental characterization of Brazilian beans using neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 306, n. 3, p. 701–706, 2015.

KINSELLA, J. E.; MELACHOURIS, N. Functional properties of proteins in foods: a survey. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 219-280, 1976.

KOES, R. E.; QUATTROCCHIO, F.; MOL, J. N. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. **BioEssays**, v. 16, n. 2, p. 123-132, 1994

LI, P.; DHITAL, S.; ZHANG, B.; HE, X.; FU, X. Food Hydrocolloids Surface structural features control *in vitro* digestion kinetics of bean starches. **Food Hydrocolloids**, v. 85, n. June, p. 343–351, 2018.

LIMA, P. F.; COLOMBO, C. A.; CHIORATO, A. F.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; CARBONELL, S. R. A. M. Occurrence of isoflavonoids in Brazilian common bean germplasm (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 40, p. 9699-9704, 2014. ISSN 0021-8561.

LIN, L. Z.; HARNLY, J. M.; 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.

LUTHRIA, D. L.; PASTOR-CORRALES, M. A. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Journal of food composition and analysis**, v. 19, n. 2, p. 205-211, 2006.

MA, M.; WANG, Y.; WANG, M.; JANE, J.; DU, S. Food Hydrocolloids Physicochemical properties and in vitro digestibility of legume starches. **Food hydrocolloids**, v. 63, p. 249–255, 2017.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Desenvolvimento da Cadeia do Feijão e Pulses**, Brasília, 2018.

MARTINEZ SAN IRENEO, M.; SANDÍN, I.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; MARANON LIZANA, F.; ROSALES FLETES, M. J.; EACUTE; LASO BORREGO, M. T. Specific IgE levels to *Cicer arietinum* (*Chick pea*) in tolerant and nontolerant children: evaluation of boiled and raw extracts. **International archives of allergy and immunology**, v. 121, n. 2, p. 137-143, 2000.

MASISI, K.; BETA, T.; MOGHADASIAN, M. H. Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. **Food chemistry**, v. 196, p. 90-97, 2016.

MASON, W. R. Starch Use in Foods. In: **Starch: Chemistry and Technology**. 3rd ed. Burlington : Elsevier, 2009.

MESSINA, V. Nutritional and health benefits of dried beans.: Discovery Service for Endeavour College of Natural Health Library. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, n. 1, p. 437, 2014.

MOJICA, L.; BERHOW, M.; DE MEJIA, E. G. Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. **Food Chemistry**, v. 229, p. 628-639, 2017.

MOJICA, L.; MEYER, A.; BERHOW, M. A.; DE MEJÍA, E. G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. **Food Research International**, v. 69, p. 38–48, 2015.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 95-111, 2004.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

OOMAH, B. D.; CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; LOARCA-PIÑA, G. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 6, p. 935-942, 2005.

OVANDO-MARTÍNEZ, M.; BELLO-PÉREZ, L. A.; WHITNEY, K.; OSORIO-DÍAZ, P.; SIMSEK, S. Starch characteristics of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in different localities.

Carbohydrate Polymers, v. 85, n. 1, p. 54–64, 2011.

PÉREZ, S.; BALDWIN, P. M.; GALLANT, D. J. Structural Features of Starch Granules. In: **Starch: Chemistry and Technology**. 3rd ed. Burlington : Elsevier, 2009.

PERIS-TORTAJADA, M. Measuring starch in foods. In: ELIASSON, A.C. **Starch in food: structure, functions and applications**. Boca Raton : CRC Press, 2004.

PREISS, J. Biochemistry and Molecular Biology of Starch Biosynthesis. In: **Starch: Chemistry and Technology**. 3rd ed. Burlington : Elsevier, 2009.

PUJOLÀ, M.; FARRERAS, A.; CASAÑAS, F. Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1034-1041, 2007.

RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A. K.; REYNOSO-CAMACHO, R.; MENDOZA-DÍAZ, S.; LOARCA-PIÑA, G. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. **Food Chemistry**, v. 161, p. 254–260, 2014.

RANILLA, L. G.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 13, p. 5734–5742, 2009.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROCHA-GUZMÁN, N. E.; HERZOG, A.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; IBARRA-PÉREZ, F. J.; ZAMBRANO-GALVÁN, G.; GALLEGOS-INFANTE, J. A. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 521–527, 2007.

RUPOLLO, G.; VANIER, N. L.; DA ROSA ZAVAREZE, E.; DE OLIVEIRA, M.; PEREIRA, J. M.; PARAGINSKI, R. T.; DIAS, A. R. G.; ELIAS, M. C. Pasting, morphological, thermal and crystallinity properties of starch isolated from beans stored under different atmospheric conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1403–1409, 2011.

SÁRKA, E.; DVORÁČEK, V. New processing and applications of waxy starch (a review). **Journal of Food Eng**, v. 206, p. 77–87, 2017.

SARKER, M. Z. I.; ELGADIR, M. A.; FERDOSH, S.; AKANDA, M. J. H.; ADITIAWATI, P.; NODA, T. Rheological behavior of starch-based biopolymer mixtures in selected processed foods. **Starch-Stärke**, v. 65, n. 1-2, p. 73-81, 2013.

SHAND, P.; YA, H.; PIETRASIK, Z.; WANASUNDARA, P. Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1119-1130, 2007.

SHRESTHA, A. K.; HALLEY, P. J. Starch Modification to Develop Novel Starch-Biopolymer Blends: State of Art and Perspectives. In: HALLEY, P. J; AVÉROUS, L. R. **Starch Polymers – From Genetic Engineering to Green Applications**. Burlington : Elsevier, 2014.

SILVA, E. M. M. DA; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. DE; TAKEITI, C. Y.; BERRIOS, J. DE J. Physical characteristics of extrudates from corn flour and dehulled *Carioca* bean flour blend. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 620–626, 2014.

SIMONS, C.; HALL, C.; BISWAS, A. Characterization of pinto bean high-starch fraction after air classification and extrusion. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2017.

SINGH, B.; SINGH, J. P.; SHEVKANI, K.; SINGH, N.; KAUR, A. Bioactive constituents in pulses and their health benefits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 858–870, 2017.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219–231, 2003.

SMITH, A. M. The biosynthesis of starch granules. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 2, p. 335-341, 2001.

SORIA-HERNÁNDEZ, C.; SERNA-SALDÍVAR, S.; CHUCK-HERNÁNDEZ, C. Physicochemical and functional properties of vegetable and cereal proteins as potential sources of novel food ingredients. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 269–277, 2015.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268–3295, 2007.

SVIHUS, B.; HERVIK, A. K. Digestion and metabolic fates of starch , and its relation to major nutrition-related health problems: A review. p. 302–313, 2016.

SWANSON, B. G. Pea and lentil protein extraction and functionality. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, n. 5, p. 276-280, 1990.

TAGGART, P. Starch as an ingredient: manufacture and applications. In: ELIASSON, A.C. **Starch in food: structure, functions and applications**. Boca Raton : CRC Press, 2004.

TAN, I.; HALLEY, P. H. “Structure-Property” – Relationships of Genetically Modified Starch. In: HALLEY, P. J; AVÉROUS, L. R. **Starch Polymers – From Genetic Engineering to Green Applications**. Burlington : Elsevier, 2014.

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

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch - composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151-165, 2004.

TOLSTOGUZOV, V. Functional properties of food proteins. Role of interactions in protein systems. **Food Protein Structure and Functionality**, p. 203-209, 1993.

VAN ACKER, S. A.; TROMP, M. N.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

WANG, H.; RATNAYAKE, W. S. Physicochemical and thermal properties of *Phaseolus vulgaris* L. var. Great Northern bean starch. **Journal of food science**, v. 79, n. 3, p. C295-C300, 2014.

WANG, L.; WHITE, P. Structure and properties of amylose, amylopectin, and intermediate materials of oat starches. **Cereal Chemistry**, v. 71, n. 3, p. 263-268, 1994.

WANI, I. A.; SOGI, D. S.; HAMDANI, A. M.; GANI, A.; BHAT, N. A.; SHAH, A. Isolation, composition, and physicochemical properties of starch from legumes: A review. **Starch-Stärke**, v. 68, n. 9-10, p. 834-845, 2016.

WONG, K. S.; JANE, J.-L. Quantitative analysis of debranched amylopectin by HPAEC-PAD with a post column enzyme reactor. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 20, n. 2, p. 297-310, 1997.

WONG, K. S.; KUBOT, A.; JANE, J. J.; HARADA, K.; SATOH, H.; NAKAMURA, Y. Structures and properties of amylopectin and phytoglycogen in the endosperm of sugary-1 mutants of rice. **Journal of Cereal Science**, v. 37, n. 2, p. 139-149, 2003.

WU, K.; DAI, S.; GAN, R.; CORKE, H.; ZHU, F. Thermal and rheological properties of mung bean starch blends with potato, sweet potato, rice, and sorghum starches. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 8, p. 1408-1421, 2016.

ZIELINSKI, A. A. F.; GRANATO, D.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; HAMINIUK, C. W. I. Modelling the extraction of phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of mixtures of green, white and black teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 11, p. 6966-6977, 2015.

CAPÍTULO 2 - BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.): WHOLE SEEDS WITH COMPLEX CHEMICAL COMPOSITION

ABSTRACT

Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are economically important edible seeds cultivated and consumed worldwide. *P. vulgaris* stands out as a source of protein, starch and dietary fiber. Bean starch slower digestibility is vastly reported, compared with cereal starches. This desirable behavior of bean starch associates with its amylose contents, amylopectin branch chain length and tendency to retrograde. Furthermore, bean composition also includes phenolic compounds, tocopherols, unsaturated fatty acids, peptides, among other constituents. Bean chemical composition is associated with important biological activities reported in the literature, including antioxidant, antimicrobial, antihyperglycemic and anticancer effects. Therefore, this review summarizes the nutritional and functional properties of common beans whole seeds associated with their complex chemical composition.

Keywords: pulses; resistant starch; dietary fiber; peptides; phenolic compounds.

HIGHLIGHTS

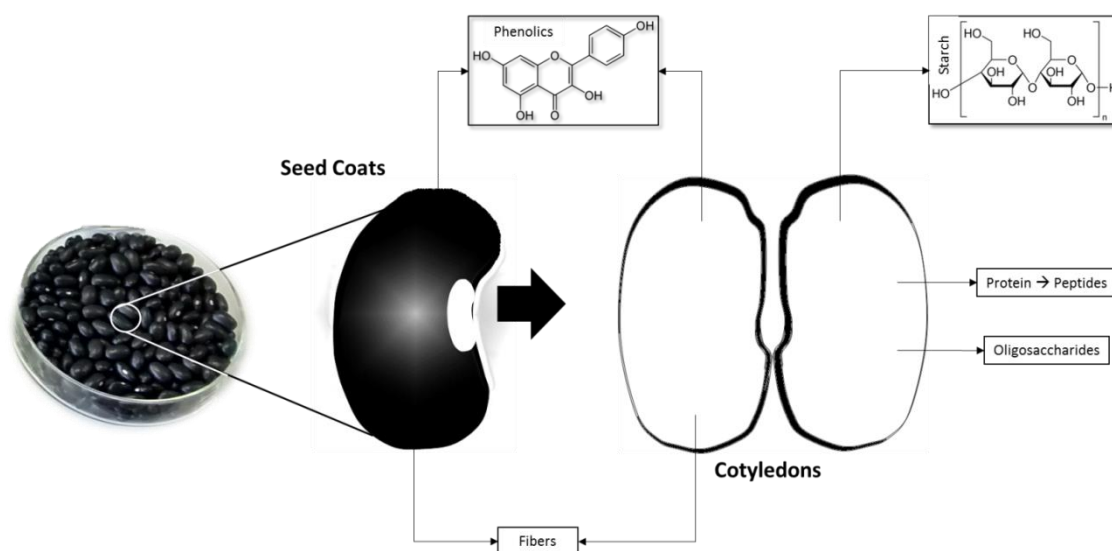
- Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are economically important edible seeds
- Dietary fiber, resistant starch and protein are valuable compounds from beans
- Several bioactive compounds are present in beans

2.1 INTRODUCTION

Dry beans are included in the group of starchy legume seeds (pulses), which are important sources of protein, as well as energy (starch) and dietary fiber for millions of people, mainly in developing countries. They are cheaper sources of protein when compared with animal origin foods and can be added to different food formulations (SANTIAGO-RAMOS et al., 2018). Phenolic compounds, tocopherols, peptides, aminoacids, dietary fiber, resistant starch, unsaturated fatty acids, minerals (Ca, 3 g/kg; Fe, 40 mg/kg; Zn, 35 mg/kg) (CHÁVEZ-MENDOZA; SÁNCHEZ, 2017) among others, are important compounds present in beans and

can provide biological activities (HALL; HILLEN; ROBINSON, 2017; PEDROSA et al., 2015). The main chemical compounds of bean seeds are illustrated in Figure 2.1.

Figure 2.1. Chemical compounds in bean seeds.



Many studies have associated beans consumption with health improvement. Reduction on metabolic and cardio-vascular diseases risk, decrease on serum cholesterol level and hyperglycemia, and prevention of colon, breast and prostate cancer could be associated with some non-nutritional substances from beans (DUEÑAS et al., 2016; HALL; HILLEN; ROBINSON, 2017; JENKINS et al., 2012; MESSINA, 2014; MOJICA; LUNA-VITAL; GONZÁLEZ DE MEJÍA, 2017; REVERRI et al., 2017; SINGH et al., 2017).

This review aims to describe the main chemical compounds from *Phaseolus vulgaris* that, when included in human diet, exert biological activity.

2.2 STARCH AND FIBER

Common beans are major sources of dietary fiber. They have two to three times more fiber per 100 g of edible portion than other dietary staples. The consumption of beans in developed countries, however, has been replaced by other foods (cereals, meats, dairy products) and dietary fiber ingestion dropped significantly (CHEN et al., 2016). Common beans resistant starch, dietary fiber and their fermentation products are associated with protection of the human digestive tract, mainly the colon health (CHEN et al., 2015a; DUEÑAS et al., 2016).

Common beans (black beans and Carioca beans) together with white rice are part of the daily diet of Brazilians (CHEN et al., 2015a). The glycemic response to black beans and chickpeas as part of a rice meal considering a randomized cross-over trial was studied with 12 adult healthy women (WINHAM; HUTCHINS; THOMPSON, 2017). The cross-over study included three treatments containing a portion with 50 g of available carbohydrate: white rice (control), black beans and white rice, and chickpeas and white rice. Whole blood was collected after 30, 60, 90 and 120 min after treatment and both glucose and insulin concentrations were determined. After 60, 90 and 120 min postprandial timepoint differences occurred with lower values for black beans + white rice if compared with the control meal (only white rice). The study indicated that the consumption of a 1/2 cup per day of beans can produce reduction in postprandial glycemia. Other benefits are the ingestion of vegetable origin protein and important amounts of dietary fiber, which potentially decrease the risk of chronic diseases.

Bean starch presents C-type polymorphism as well as higher amylose contents if compared with most regular starches available to the industry and this influences its digestibility. Starch digestibility can also be influenced by phytic acid, tannins and α -amylase inhibitors from beans (FERREIRA et al., 2017; SANTIAGO-RAMOS et al., 2018).

Demiate et al. (2016) studied structural features and in vitro digestibility of starches from different beans (*Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata*) cultivated in Brazil (DEMIATE et al., 2016). High amylose contents were reported for the beans, in the range 27.0–35.9%. The results showed different behavior of starch digestibility between the beans, white kidney beans showing the highest resistant starch content (7.2%) whereas red kidney bean had the lowest rapid digestible starch level (89.7%).

After analyzing the chemical composition, functional properties, starch digestibility of 25 dry bean varieties cultivated in the state of Michigan (USA), the production of bean-based cookies was studied. The high level of resistant starch, the protein content as well as the gluten-free status of the cookies were highlighted and the use of bean flours showed very promising for that kind of food (AI et al., 2017).

Large amounts of carbohydrates (55–65%, dry basis) are reported for common beans, predominantly starch, but also dietary fiber and oligosaccharides. A fraction of the polysaccharides is slowly digested and another is not digested, that is, resistant starch and fiber, which can be fermented in the large intestine (SUÁREZ-MARTÍNEZ et al., 2016).

When compared with cereals (corn, wheat, rice), beans show considerable higher amounts of resistant starch, which may be associated with amylose contents, amylopectin branch chain length, degree of crystallinity and size of the starch granules. Besides that, the

high contents of fiber as well as of amylase inhibitors and phytates may also contribute to decrease the rate and degree of starch digestibility (HAYAT et al., 2014). According to these authors, the use of beans as ingredients in functional foods should be promoted as it would be a cheap and effective approach to improve health. Low glycemic cookie bars using kidney beans, for example, were successfully produced by Lestari; Huriyati and Marsono (2017).

The inclusion of beans in meals as well as in the formulation of processed foods may decrease their glycemic loads and bring considerable advantages to human health (WINHAM; HUTCHINS; THOMPSON, 2017). The presence of dietary fiber and a higher proportion of slowly digestible starch if compared with other carbohydrate rich foods contribute to the low glycemic index of beans.

A study with patients with metabolic syndrome confirmed that including whole black beans in meals improved satiety, increased protein and other nutrients and also added bioactive compounds potentially beneficial to health (REVERRI et al., 2017). The chemical composition of whole beans is showed in Table 2.1.

Table 2.1. Chemical composition (% m/m, on dry basis) of raw (uncooked) common beans (*Phaseolus vulgaris* L.).

Sample description	Ash	Lipids	Protein	Total carbohydrates*	Insoluble dietary fiber	Soluble dietary fiber	Total dietary fiber	Reference
Dark bean seeds	3.8 ± 0.0	1.1 ± 0.1	17.7 ± 0.5	77.4	21.5 ± 3.4	5.8 ± 1.1	27.2	(DUEÑAS et al., 2016)
Common black beans	3.9 ± 0.10	2.7 ± 0.06	23.0 ± 0.25	70.3	-	-	-	(SANTIAGO-RAMOS et al., 2018b)
Common black beans	5.7 ± 0.0	1.8 ± 0.3	24.2 ± 1.1	66.6	-	-	1.7 ± 0.3**	(HAYAT et al., 2014)
Common black beans	-	-	-	45.6 ± 1.12***	32.8 ± 0.78	2.9 ± 0.67	35.7	(LESTARI; HURIYATI ; MARSON O, 2017)
Common beans	4.1	1.9	21.7	58.8	-	-	4.0**	(SÁNCHEZ - ARTEAGA et al., 2015)
Black beans	4.6	1.7	20.3	73.4	-	-	-	(RAMÍREZ -JIMÉNEZ et al., 2014)
‘Carioca’ beans	3.9	0.7	22.5	72.9	-	-	-	(RAMÍREZ -JIMÉNEZ et al., 2014)
Common beans	3.2 ± 0.06	2.7 ± 0.09	24.1 ± 0.97	44.8 ± 0.69***	-	-	3.9 ± 0.04**	(BETANCUR-ANCONA et al., 2012)
Common black beans	4.0	1.5	26.8	65.4	-	-	2.3**	(TELLES; KUPSKI; FURLONG, 2017)

*Calculated by difference; **Crude fiber; ***total starch.

2.3 PEPTIDES

Peptides are released *in vivo* by proteolytic hydrolysis during gastrointestinal digestion. They also can be produced by controlled hydrolysis of protein using enzymes or proteolytic microorganisms and by fermentation (DI BERNARDINI et al., 2011; NGOH; GAN, 2018).

Many studies have demonstrated that beans peptides can provide antimicrobial, antioxidant, antithrombotic, antihypertensive functions (MOJICA; LUNA-VITAL; GONZÁLEZ DE MEJÍA, 2017; NGOH; GAN, 2016; RUI et al., 2012). *In vivo* and *in vitro* studies have suggested that beans peptides (Table 2.2) can inhibit some enzymes related with chronic diseases, like dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), α -amylase and α -glucosidase, related with type-2 diabetes; angiotensin converting enzyme (ACE), associated with hypertension (MOJICA; CHEN; DE MEJÍA, 2015; OSEGUERA TOLEDO et al., 2016).

The most related bioactive property of peptides is the ACE inhibition. ACE (angiotensin I-converting enzyme) is a critical enzyme to control of the blood pressure pathway. It catalyses the conversion of angiotensin I to angiotensin II. Angiotensin II has a dual responsibility in raising blood pressure: acts as a vasoconstrictor, and degrade a vasodilator, named bradykinin, thus contributing to elevate blood pressure (RUI et al., 2012).

Ruiz-Ruiz et al. (2013) demonstrated that hard-to-cook bean's ACE inhibitory activity is higher as lower is the molecular weight of the peptide fraction. Lower molecular weight peptides also presented better α -amylase inhibition and antioxidant activity than higher molecular weight peptides (NGOH; GAN, 2016).

Mojica; Chen and De Mejía (2015) firstly report α -amylase and α -glucosidase inhibition capacity by common beans peptides. These authors demonstrated that ACE inhibition activity common bean was not affected by thermal processing. In the other hand DPP-IV inhibition was shown to decrease on precooked beans sample.

Jakubczyk et al. (2017) show that peptides from 3.5 to 7 kDa produced by fermentation presented lipase, α -amylase and ACE inhibitory capacity. However, the fermentation condition to produce the better results for ACE and α -amylase inhibition was different from the conditions to obtain lipase inhibitory peptides.

Ngoh; Tye and Gan (2017) studied the α -amylase inhibitor capacity of commercial Pinto bean peptides on a pancreatic cell (AR42J). The lowest value of IC₅₀ (0.31 mM) was found for a 1.6 kDa molecular weight peptide. The inhibitors of α -amylase and α -glucosidase reduce the activity of these enzymes, decreasing the availability of glucose and act to control or minimize the type-2 diabetes (NGOH; TYE; GAN, 2017).

Beans peptides also can be related to control type-2 diabetes by inhibition of DPP-IV, and enzyme that inactive GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) and GLP-1 (glucagon-like peptide-1) hormones. These hormones play an important role on glucose homeostasis, promoting delay on gastric emptying and appetite control (NGOH; GAN, 2018). Oseguera-Toledo et al. (2016) demonstrated that beans peptides inhibited lipid accumulation in adipocytes and contributed to the control of glucose absorption by stimulating insulin secretion by pancreatic cells. These authors suggested that beans peptides can be a promising alternative on type-2-diabetes prevention.

Bean peptides can also prevent some conditions as hyperglycemia, by blocking glucose transporters (GLUT 2 and SGLT1) and hypercholesterolemia, by inhibiting Niemann- Pick C1 Like-1 (NPC1L1), a cholesterol receptor (HERNANDEZ; MEJIA, 2017; YAO et al., 2016). Mojica et al. (2017) recently studied the effect of black bean hydrolyzed protein and peptides on glucose absorption on Wistar rats. The authors demonstrated a reduction of 22.7–47.7% postprandial glucose levels on rats induced to diabetes. The reduction on glucose level was caused by translocation of glucose transporters GLUT2 and SGLT1. The peptides that presented GLUT2 and SGLT1 blocking capacity are shown in Table 2.2.

2.4 PHENOLIC COMPOUNDS

The phenolic compounds commonly found in beans include flavonoids, anthocyanins, flavonols, flavanols, iso-flavones, flavanones, proanthocyanidins, and tannins, as well as a wide range of phenolic acids (FAN; BETA, 2016; NGOH; GAN, 2016). These compounds are present in the edible beans in free form, extracted mainly by hydrophilic solvent water mixtures (e.g. 80% methanol). Moreover, these compounds can be insoluble conjugated form, bound with soluble oligosaccharides and peptides (can be released upon alkaline hydrolysis), and insoluble-bound form that are esterified to cell wall polysaccharides (CHEN et al., 2015b). Furthermore, Chen and co-workers (CHEN et al., 2015c) showed that flavonoids are mainly found in free forms, while phenolic acids in conjugated and bound forms. The authors also reported a variation from 7 to 59%, from 28 to 76%, and from 8 to 18% for free, conjugated and bound phenolics, respectively, according to the bean varieties.

Giusti et al. (2017) determined by HPLC-DAD the levels of phenolic compounds in different pulses. In fourteen varieties of *P. vulgaris* the levels reported were: gallic acid from 3.1 to 7.1 mg/kg, chlorogenic acid from 24 to 239.2 mg/kg, catechin from 10 to 614.3 mg/kg, epicatechin from 17.7 to 279.2 mg/kg, syringic acid from 3.7 to 12.6 mg/kg, kaempferol-3-

glucoside from 24.5 to 1486.3 mg/kg, ferulic acid from 1.7 to 21.5 mg/kg. Between all beans evaluated only in black beans had anthocyanins in their composition (delphinidin 3,5-diglucoside and cyanidin-3-glucoside) totaling 649.5 mg/kg. However, Verdolino beans was the variety that showed the highest percentage of antiradical scavenging activity measured by DPPH.

It is important to stand out that before consumption, common beans are usually cooked or germinated; the thermal treatment results in modification of the phenolic composition. López et al. (2013) reported that raw dark beans had the highest concentration of phenolic compounds, which corresponds to anthocyanins. After boiling, however, a reduction of 68% was observed, whereas after seven days of germination, the total concentration of anthocyanins was similar that of raw beans.

Guajardo-Flores; Serna-Saldívar and Gutiérrez-Urbe (2013) reported that phenolic content and antioxidant activity in germinated black beans were higher when obtained from seed coats in the third day of germination. Jiménez-Monreal et al. (2009) also showed that green beans kept their antioxidant activity after being submitted to home cooking methods.

Furthermore, nowadays it is important to propose natural alternatives to supplement and preserving food products in substitution to synthetic additives or preservatives. Gan et al. (2016) reported that flavonoids and proanthocyanidins from pigmented bean coat extracts showed high antioxidant and antibacterial activity, which can be potential candidates as food preservatives. Then, a suggestion for the recovery these compounds it is the use from products with lower market value, as hard-to-cook beans, a defect reported commonly in legumes.

2.5 FATTY ACIDS, TOCOPHEROLS, AND CAROTENOIDS

Seven varieties of cranberry beans (*P. vulgaris*) showed oil contents ranging from 1.73 to 1.98%. Even if common beans are not oil seeds, they have high proportion of unsaturated fatty acids, with linolenic (C18:3n3) and linoleic (C18:2n6) acids as the main fatty acids (62–83% of total fatty acids), followed by palmitic (C16:0) and oleic (C18:1n9) acids (CHEN et al., 2015b). The high proportion of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in beans results in a desirable low omega-6/omega-3 ratio with potential health benefits. The analysis of tocopherols in cranberry beans showed the exclusive presence of γ -tocopherol, which contribute with antioxidant activity to protect unsaturated fatty acids; when considering carotenoids, present in limited amounts, the only species detected was β -carotene (CHEN et al., 2015b).

Table 2.2. Bioactivity potential of common beans.

Bean cultivar	Bioactivity potencial	Principal biological compounds / Notes	References
Black bean var.Jamapa	ACE inhibition; Antioxidant activity	Peptides <1 kDa showed highest inhibition than 1-3, 3-5, 5-10 and >10 kDa peptides	(GIUSTI et al., 2017)
Black bean Pinto bean Red bean Navy bean Great Northern bean	ACE inhibition; DPP-IV inhibition; α -amylase and α -glucosidase inhibition; Antioxidant activity	Amino acid sequence: TyrGlyAsnTrpuTyrLysLysLeuLeuLeuArgArgLeuGln LeuAlaProProGln ArgGluTyrLeuLeuValAlaGln SerProTyrCysTyrGlyLeuArgGluAsnAsnpLysLeuMetLeu LeuGluLeuLys ArgTrpAlaGluLys ArgLeuLeuLysLeuArgGln	(NGOH; GAN, 2018)
Pinto-Bayacora; Pinto-Bravo; Pinto-Centenario; Pinto-Salttillo; Flor de Junio Leon; Flor de Junio Marcela; Flor de MayoEugenia; Flor de Mayo 67; Flor de Mayo 199; Flor de Mayo 202; Negro-Frijozac; Negro-Otomi; Carioca BRS-Horizonte, Carioca BRS-Pontal and Carioca Perola	ACE inhibition; DPP-IV inhibition; Antioxidant activity	SerGlyMetAla LeuLeuAlaHis AspSerSerGly TyrValAlaThr GluProThrGlu LysProLysLeu	(LÓPEZ et al., 2013)
Pinto bean	α -amylase inhibition; Antioxidant activity	ProProHisMetLeuPro ProProMetHisLeuPro GlyAspAlaAlaCysCysGlyLeuProLeuLeuPro AlaCysSerAsnHisSerProLeuGlyTrpArgGlyHis	(MOJICA; CHEN; DE MEJÍA, 2015)
Black bean	NPC1L1 binding affinity	TyrAlaAlaAlaThr GluArgAlaPhe LysAsp PheAlaTheGlyThr	(RUIZ-RUIZ et al., 2013)
Black bean	GLUT 2 and SGLT1 blocking; Antioxidant activity	AlaLysSerProLeuPhe AlaThrAsnLeuPhe PheGluGluLeuAsn LeuSerLysSerValLeu	(JAKUBCZYK et al., 2017)
DimetaNafiriraNanyati	Antioxidant activity	Protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, catechin, delphinidin 3-O-glucoside, cyanidin 3-O-glucoside, pelargonidin derivatives.	(NGOH; TYE; GAN, 2017)
Tolosana	Antioxidant activity, Neuroprotective ability, Anticancer ability	Galic acid, protocatechuic acid, Ferulylaldaric acid, trans ferulic acid, p-coumarylaldaric acid, trans p-coumaric acid, sinapylaldaric acid, sinapic acid, procyanidins, hesperetin derivatives, naringenin derivatives, quercetin derivatives, kaempferol derivatives, myricetin derivatives, apigenin derivatives, biochanins, daidzein derivatives, genistein derivatives, trans resveratrol glucoside, delphinidin 3-glucoside, cyanidin 3-glucoside, pelargonidin derivatives, petunidin derivatives, malvidin derivatives	(MOJICA et al., 2017)

2.6 ANTINUTRITIONAL FACTORS

Despite the relevant potential for human and animal nutrition, beans present several anti-nutritional factors — nowadays, explored also as bioactive compounds carrying on health benefits (SINGH et al., 2017), including phytic acid, trypsin inhibitor, lectins and some

oligosaccharides, which affect the digestibility and bioavailability of nutrients and limit their consumption (WORKU; SAHU, 2017).

Raffinose, stachyose and verbascose are the main compounds of the raffinose family oligosaccharides (RFO's), found in common beans and considered prebiotic components, that stimulate the activity of bifidobacterial and lactobacilli in the colon, thus their consumption is thought to be beneficial (CHEN et al., 2016). Monogastric animals do not have α -galactosidase in the small intestine. Because of that, the RFOs pass into the large intestine, where fermentation process occurs with flatus formation (RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2014; SINGH et al., 2017). Although the flatus formation is a concern, oligosaccharides are non-toxic, may be reduced by pre-soaking the beans (AI et al., 2017; KELKAR et al., 2012), besides the prebiotic effect mentioned earlier. Along with dietary fiber, resistant/indigestible starch, oligosaccharides contributes to slow down glucose release into the bloodstream, resulting in lower glycemic index (SINGH et al., 2017). Worku; Sahu (2017) performed an open fermentation process to reduce antinutritional factors of the bean seeds and improving protein digestibility. The elimination of oligosaccharides might be due to lactic acid organisms that use raffinose and stachyose for their metabolism.

Phytic acid (PA) is an antioxidant found in cereals, vegetables, nuts and natural oils, ranging from 0.4% to 0.6% by weight on beans (NIKMARAM et al., 2017). It can be considered an antinutritional component due its ability to chelate with mineral cations like calcium, iron, magnesium and zinc, which hinders absorption in the gastrointestinal tract. However, Silva and Bracarense (2016) showed several recent studies that show the preventive and therapeutic effects of PA on different diseases, due to its capacity in inhibiting radical oxygen species, resulting in preventive and therapeutic effects on different diseases (SILVA; BRACARENSE, 2016).

Trypsin inhibitors constitute an important class of protease inhibitors. As described by Adeyemo and Onilude (2015), the presence of trypsin inhibitors in human foods interfere in protein digestion, causing pancreatic hyperplasia and metabolic disturbance. Protease inhibitors delay protein digestion, resulting in protein excretion and decreased bioavailability of sulfur-containing amino acids (NIKMARAM et al., 2017). To reduce the quantity and undesirable effects of this and other antinutritional factors, thermal treatments are applied (LI et al., 2014).

The binding between tannins and minerals or proteins affect digestion process, resulting in reduced absorption and limited availability of nutrients. The complex formed (tannin–protein) is result of a series of hydrogen bonds between the hydroxyl groups of tannins and the carbonyl groups of proteins. Because tannins bind to dietary proteins and also to digestive

enzymes, formed complexes are not easily digestible (NIKMARAM et al., 2017; RAES et al., 2014).

Lectins (hemagglutinins) are sugar-binding proteins with high carbohydrate selectivity that can agglutinate red blood cells (YIN; WONG; NG, 2015). Lectins prejudice animal growth by interfering with the digestion and absorption of nutrients in the gastrointestinal tract (NIKMARAM et al., 2017). Nciri et al. (2015) studied toxicity of Common beans. They reported that in human, consumption of non-completely-cooked beans have been linked to transient gastrointestinal disturbances, carrying on symptoms as nausea, vomiting and diarrhea. However, the lectins content on beans can be reduced by processing. Kelkar et al. (2012) demonstrated that extrusion at 85 °C and steam cooking at 82 °C caused significant reduction (>90%) in phytohemagglutinin (PHA) in comparison to raw bean flour. Likewise, the combination of soaking and cooking/autoclaving reduces PHA content, according to Nciri et al. (2015).

2.7 CONCLUSION

Common beans are known for presenting high contents of protein and dietary fiber, roughly twice the levels found in cereals. They also contain plenty of bioactive substances that are considered non-nutrient food constituents and others often known as anti-nutritional factors, but that also show bioactivity. Dietary fiber, resistant starch and bioactive phytochemicals make beans suitable for application in a wide range of healthy food products. Common beans have a limited shelf-life and become hard-to-cook a few months after harvest, losing their commercial value. Studies that promote the use of these low value seeds by the food industry must be stimulated.

CONFLICTS OF INTEREST:

No conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support (Grant N. 445476/2014-1) and to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES/Brazil) for the financial support and scholarships. AAFZ is research fellow from CAPES/PNPD. AN and IMD are research fellows from CNPq.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

- ADEYEMO, S. M.; ONILUDE, A. A. Enzymatic Reduction of Anti-nutritional Factors in Fermenting Soybeans by *Lactobacillus plantarum* Isolates from Fermenting Cereals. **Nigerian Food Journal**, v. 31, n. 2, p. 84–90, 2015.
- AI, Y.; JIN, Y.; KELLY, J. D.; NG, P. K. W. Composition, functional properties, starch digestibility, and cookie-baking performance of dry bean powders from 25 Michigan-grown varieties. **Cereal Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 400–408, 2017.
- BETANCUR-ANCONA, D.; SEGURA-CAMPOS, M. R.; ROSADO-RUBIO, G.; SARMIENTO-FRANCO, L.; CHEL-GUERRERO, L. Chemical Composition and Anti-Nutritional Factors in Five Tropical Legume Seeds. n. February 2016, p. 117–141, 2012.
- CHÁVEZ-MENDOZA, C.; SÁNCHEZ, E. Bioactive Compounds from Mexican Varieties of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for Health. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1360, 2017.
- CHEN, P. X.; DUPUIS, J. H.; MARCONE, M. F.; PAULS, P. K.; LIU, R.; LIU, Q.; TANG, Y.; ZHANG, B.; TSAO, R. Physicochemical Properties and in Vitro Digestibility of Cooked Regular and Nondarkening Cranberry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Effects on Bioaccessibility, Phenolic Composition, and Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 48, p. 10448–10458, 2015a.
- CHEN, P. X.; TANG, Y.; MARCONE, M. F.; PAULS, P. K.; ZHANG, B.; LIU, R.; TSAO, R. Characterization of free, conjugated and bound phenolics and lipophilic antioxidants in regular- and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 185, p. 298–308, 2015b.
- CHEN, P. X.; BOZZO, G. G.; FREIXAS-COUTIN, J. A.; MARCONE, M. F.; PAULS, P. K.; TANG, Y.; ZHANG, B.; LIU, R.; TSAO, R. Free and conjugated phenolic compounds and their antioxidant activities in regular and non-darkening cranberry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1047–1056, 2015c.
- CHEN, Y.; MCGEE, R.; VANDEMARK, G.; BRICK, M.; THOMPSON, H. Dietary Fiber Analysis of Four Pulses Using AOAC 2011.25: Implications for Human Health. **Nutrients**, v. 8, n. 12, p. 829, dez. 2016.
- DEMIATE, I. M.; FIGUEROA, A. M.; ZORTÉA GUIDOLIN, M. E. B.; RODRIGUES DOS SANTOS, T. P.; YANGCHENG, H.; CHANG, F.; JANE, J. LIN. Physicochemical characterization of starches from dry beans cultivated in Brazil. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 812–820, 2016.
- DI BERNARDINI, R.; HARNEDY, P.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; MULLEN, A. M.; HAYES, M. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1296–1307, 2011.
- DUEÑAS, M.; SARMENTO, T.; AGUILERA, Y.; BENITEZ, V.; MOLLÁ, E.; ESTEBAN, R. M.; MARTÍN-CABREJAS, M. A. Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and lentils (*Lens culinaris* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 72–78, 2016.
- FAN, G.; BETA, T. Proximate Composition, Phenolic Profiles and Antioxidant Capacity of Three Common Bean Varieties (*Phaseolus Vulgaris* L.). **Journal of Food Chemistry and Nanotechnology**, v. 2, n. 1, p. 147–152, 2016.
- FERREIRA, C. D.; ZIEGLER, V.; EL HALAL, S. L. M.; VANIER, N. L.; ZAVAREZE, E. DA R.; DE OLIVEIRA, M. Characteristics of starch isolated from black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) stored for

12 months at different moisture contents and temperatures. **Starch/Staerke**, v. 69, n. 5–6, p. 1–10, 2017.

GAN, R. Y.; DENG, Z. Q.; YAN, A. X.; SHAH, N. P.; LUI, W. Y.; CHAN, C. L.; CORKE, H. Pigmented edible bean coats as natural sources of polyphenols with antioxidant and antibacterial effects. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 168–177, 2016.

GIUSTI, F.; CAPRIOLI, G.; RICCIUTELLI, M.; VITTORI, S.; SAGRATINI, G. Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. **Food Chemistry**, v. 221, p. 689–697, 2017.

GUAJARDO-FLORES, D.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1497–1503, 2013.

HALL, C.; HILLEN, C.; ROBINSON, J. G. Composition, nutritional value, and health benefits of pulses. **Cereal Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 11–31, 2017.

HAYAT, I.; AHMAD, A.; MASUD, T.; AHMED, A.; BASHIR, S. Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An Overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 580–592, 2014.

HERNANDEZ, L. M. R.; MEJIA, E. G. D. Bean peptides have higher in silico binding affinities than ezetimibe for the N-terminal domain of cholesterol receptor Niemann-Pick C1 Like-1. **Peptides**, v. 90, p. 83–89, 2017.

JAKUBCZYK, A.; KARAŚ, M.; ZŁOTEK, U.; SZYMANOWSKA, U. Identification of potential inhibitory peptides of enzymes involved in the metabolic syndrome obtained by simulated gastrointestinal digestion of fermented bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. **Food Research International**, v. 100, p. 489–496, 2017.

JENKINS, D. J. A.; KENDALL, C. W. C.; AUGUSTIN, L. S. A.; MITCHELL, S.; SAHYE-PUDARUTH, S.; BLANCO MEJIA, S.; CHIAVAROLI, L.; MIRRAHIMI, A.; IRELAND, C.; BASHYAM, B.; VIDGEN, E.; DE SOUZA, R. J.; SIEVENPIPER, J. L.; COVENEY, J.; LEITER, L. A.; JOSSE, R. G. Effect of Legumes as Part of a Low Glycemic Index Diet on Glycemic Control and Cardiovascular Risk Factors in Type 2 Diabetes Mellitus. **Archives of Internal Medicine**, v. 172, n. 21, p. 1653, 2012.

JIMÉNEZ-MONREAL, A. M.; GARCÍA-DIZ, L.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; MARISCAL, M.; MURCIA, M. A. Influence of cooking methods on antioxidant activity of vegetables. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 3, p. 97–103, 2009.

KELKAR, S.; SIDDIQ, M.; HARTE, J. B.; DOLAN, K. D.; NYOMBAIRE, G.; SUNIAGA, H. Use of low-temperature extrusion for reducing phytohemagglutinin activity (PHA) and oligosaccharides in beans (*Phaseolus vulgaris* L .) cv . Navy and Pinto. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1636–1639, 2012.

LESTARI, L. A.; HURIYATI, E.; MARSONO, Y. The development of low glycemic index cookie bars from foxtail millet (*Setaria italica*), arrowroot (*Maranta arundinacea*) flour, and kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1406–1413, 2017.

LI, H.; QIU, J.; LIU, C.; REN, C.; LI, Z. Milling characteristics and distribution of phytic acid, minerals, and some nutrients in oat (*Avena sativa* L.). **Journal of Cereal Science**, v. 60, n. 3, p. 549–554, 2014.

LÓPEZ, A.; EL-NAGGAR, T.; DUEÑAS, M.; ORTEGA, T.; ESTRELLA, I.; HERNÁNDEZ, T.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P.; PALOMINO, O. M.; CARRETERO, M. E. Effect of cooking and

germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 547–555, 2013.

MESSINA, V. Nutritional and health benefits of dried beans.: Discovery Service for Endeavour College of Natural Health Library. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, n. 1, p. 437, 2014.

MOJICA, L.; GONZALEZ DE MEJIA, E.; GRANADOS-SILVESTRE, M. Á.; MENJIVAR, M. Evaluation of the hypoglycemic potential of a black bean hydrolyzed protein isolate and its pure peptides using in silico, in vitro and in vivo approaches. **Journal of Functional Foods**, v. 31, p. 274–286, 2017.

MOJICA, L.; CHEN, K.; DE MEJÍA, E. G. Impact of Commercial Precooking of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) on the Generation of Peptides, After Pepsin-Pancreatin Hydrolysis, Capable to Inhibit Dipeptidyl Peptidase-IV. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 1, p.188–198, 2015.

MOJICA, L.; LUNA-VITAL, D. A.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. Characterization of peptides from common bean protein isolates and their potential to inhibit markers of type-2 diabetes, hypertension and oxidative stress. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 8, p. 2401–2410, 2017.

NCIRI, N.; CHO, N.; MHAMDI, F. EL; ISMAIL, H. BEN; MANSOUR, A. BEN; SASSI, F. H.; AISSA-FENNIRA, F. BEN. Toxicity Assessment of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Widely Consumed by Tunisian Population . **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 9, p. 1049–1064, 2015.

NGOH, Y. Y.; GAN, C. Identification of Pinto bean peptides with inhibitory effects on alfa-amylase and angiotensin converting enzyme (ACE) activities using an integrated bioinformatics-assisted approach. **Food Chemistry**, v.267, p. 124–131, 2018.

NGOH, Y. Y.; GAN, C. Y. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and alfa-amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). **Food Chemistry**, v. 190, p. 331–337, 2016.

NGOH, Y. Y.; TYE, G. J.; GAN, C. Y. The investigation of α -amylase inhibitory activity of selected Pinto bean peptides via preclinical study using AR42J cell. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 641–647, 2017.

NIKMARAM, N.; LEONG, S. Y.; KOUBAA, M.; ZHU, Z.; BARBA, F. J.; GREINER, R.; OEY, I.; ROOHINEJAD, S. Effect of extrusion on the anti-nutritional factors of food products: An overview. **Food Control**, v. 79, p. 62–73, 2017.

OSEGUERA TOLEDO, M. E.; GONZALEZ DE MEJIA, E.; SIVAGURU, M.; AMAYA-LLANO, S. L. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides increased insulin secretion, inhibited lipid accumulation, increased glucose uptake and reduced the phosphatase and tensin homologue activation in vitro. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 160–177, 2016.

PEDROSA, M. M.; CUADRADO, C.; BURBANO, C.; MUZQUIZ, M.; CABELLOS, B.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; ASENSIO-VEGAS, C. Effects of industrial canning on the proximate composition, bioactive compounds contents and nutritional profile of two Spanish common dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 166, p. 68–75, 2015.

RAES, K.; KNOCKAERT, D.; STRUIJS, K.; VAN CAMP, J. Role of processing on bioaccessibility of minerals: Influence of localization of minerals and anti-nutritional factors in the plant. **Trends in Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 32–41, 2014.

RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A. K.; REYNOSO-CAMACHO, R.; MENDOZA-DÍAZ, S.; LOARCA-PIÑA, G. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. **Food Chemistry**, v. 161, p. 254–260, 2014.

REVERRI, E. J.; RANDOLPH, J. M.; KAPPAGODA, C. T.; PARK, E.; EDIRISINGHE, I.; BURTON-FREEMAN, B. M. Assessing beans as a source of intrinsic fiber on satiety in men and women with metabolic syndrome. **Appetite**, v. 118, p. 75–81, 2017.

RUI, X.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K.; PRASHER, S. O. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of *Phaseolus vulgaris* bean hydrolysates: Effects of different thermal and enzymatic digestion treatments. **Food Research International**, v. 49, n. 2, p. 739–746, 2012.

RUIZ-RUIZ, J.; DÁVILA-ORTÍZ, G.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory And Antioxidant Peptide Fractions From Hard-To-Cook Bean Enzymatic Hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 26–35, 2013.

SÁNCHEZ-ARTEAGA, H. M.; URÍAS-SILVAS, J. E.; ESPINOSA-ANDREWS, H.; GARCÍA-MÁRQUEZ, E. Effect of chemical composition and thermal properties on the cooking quality of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **CYTA - Journal of Food**, v. 13, n. 3, p. 385–391, 2015.

SANTIAGO-RAMOS, D.; FIGUEROA-CÁRDENAS, J. DE D.; VÉLES-MEDINA, J. J.; SALAZAR, R. Physicochemical properties of nixtamalized black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. **Food Chemistry**, v. 240, n. February 2017, p. 456–462, 2018.

SILVA, E. O.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Phytic Acid: From Antinutritional to Multiple Protection Factor of Organic Systems. **Journal of food science**, v. 81, n. 6, p.1357–1362, 2016.

SINGH, B.; SINGH, J. P.; SHEVKANI, K.; SINGH, N.; KAUR, A. Bioactive constituents in pulses and their health benefits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 858–870, 2017.

SUÁREZ-MARTÍNEZ, S. E.; FERRIZ-MARTÍNEZ, R. A.; CAMPOS-VEGA, R.; ELTON-PUENTE, J. E.; DE LA TORRE CARBOT, K.; GARCÍA-GASCA, T. Bean seeds: Leading nutraceutical source for human health. **CYTA - Journal of Food**, v. 14, n. 1, p. 131–137, 2016.

TELLES, A. C.; KUPSKI, L.; FURLONG, E. B. Phenolic compound in beans as protection against mycotoxins. **Food Chemistry**, v. 214, p. 293–299, 2017.

WINHAM, D. M.; HUTCHINS, A. M.; THOMPSON, S. V. Glycemic response to black beans and chickpeas as part of a rice meal: A randomized cross-over trial. **Nutrients**, v. 9, n. 10, 2017.

WORKU, A.; SAHU, O. Significance of fermentation process on biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* (red beans). **Biotechnology Reports**, v. 16, p. 5–11, 2017.

YAO, Y.; HU, Y.; ZHU, Y.; GAO, Y.; REN, G. Comparisons of phaseolin type and α -amylase inhibitor in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in China. **Crop Journal**, v. 4, n. 1, p. 68–72, 2016.

YIN, C.; WONG, J. H.; NG, T. B. Isolation of a Hemagglutinin with Potent Antiproliferative Activity and a Large Antifungal Defensin from *Phaseolus vulgaris* cv. Hokkaido Large Pinto Beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 22, p. 5439–5448, 2015.

**CAPÍTULO 3 - ESTUDO DO AMIDO DE CULTIVARES DE FEIJÃO
CARIOCA (*Phaseolus vulgaris*) PRODUZIDAS NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS
NAS SAFRAS DE 2016, 2017 E 2018**

RESUMO

O estudo das características de amido de feijão Carioca pode contribuir para a redução de perdas econômicas decorrentes de problemas como escurecimento e envelhecimento dos grãos. O objetivo desse estudo foi caracterizar o amido de feijão Carioca: (1) da cultivar Campos Gerais produzido em diferentes áreas; (2) das cultivares Campos Gerais, Tangará, Estilo, Dama e ANFC, produzidos numa mesma área e (3) da cultivar Campos Gerais produzida em safras distintas. O amido, extraído via úmida, foi analisado quanto ao teor de amilose, padrão de cristalinidade por difração de raios X, morfologia dos grânulos, transição térmica de gelatinização e de reassociação, propriedades de pasta, poder de inchamento e solubilidade, sinérese e digestibilidade *in vitro*. O amido de feijão Carioca apresentou elevados teores de amilose, entre 40,06 e 42,60%, o que influenciou suas características tecnológicas, como alta sinérese, e limitada solubilidade e poder de inchamento. O estudo da transição térmica demonstrou altas temperaturas de gelatinização, entre 70,8 e 76,6 °C e alta retrogradação, determinada pela razão entre a entalpia de gelatinização e entalpia de dissociação do amido retrogradado, avaliado após sete dias de armazenamento a 4 °C. Pela avaliação da digestibilidade *in vitro* do amido granular foi evidenciado alto teor de amido resistente, que pode atuar como fibra, ao não ser digerido no intestino delgado. O alto teor de amido resistente na forma granular sugere que amido de feijão Carioca pode ser utilizado em produtos de panificação onde não ocorre gelatinização.

Palavras-chave: amido de feijão envelhecido, cultivares de feijão Carioca, amido resistente

ABSTRACT

The study of the characteristics of *Carioca* bean starch can contribute to reduction of economic losses due problems such as darkening and aging of beans. The objective of this study was to characterize the *Carioca* bean starch: (1) of *Campos Gerais* cultivar harvest in different areas; (2) of Campos Gerais, Tangara, Estilo, Dama and ANFC cultivars, produced in the same area and (3) of *Campos Gerais* cultivar produced in different harvest. The starch, extracted by

wet method, was analyzed for amylose content, X-ray diffraction pattern, granule morphology, thermal transition from gelatinization and reassociation, pasting properties, swelling power and solubility, syneresis and *in vitro* digestibility. *Carioca* bean starch presented high levels of amylose, ranging from 40,06 to 42,60%, which influenced its technological characteristics, such as high syneresis, and limited solubility and swelling power. The thermal transition study demonstrated high gelatinization temperatures, from 70,8 to 76,6 °C and high retrogradation, determined by the ratio between the enthalpy of gelatinization and enthalpy of retrograded starch dissociation, evaluated after seven days of storage at 4 °C. *In vitro* digestibility of the granular starch evidenced a high content of resistant starch, which can act as fiber, not being digested in the small intestine. The high level of resistant starch suggest that Carioca bean granular starch can be used in bakery products when gelatinization doesn't occur.

Keywords: aged bean starch, *Carioca* bean cultivars, resistant starch

3.1 INTRODUÇÃO

O feijão apresenta relevância como alimento básico no Brasil e em países da África, Ásia e América Latina por ser uma importante fonte de proteína e de energia para populações de baixo poder aquisitivo (GANASCINI et al., 2019; SILVA et al., 2014; WANI et al., 2016). No Brasil, a combinação arroz-feijão faz parte da alimentação diária da população, sendo um dos símbolos da culinária popular (KATO et al., 2015). Segundo dados da CONAB (2019), o consumo aparente desta leguminosa no Brasil consiste em 3,12 milhões de toneladas, com prevalência de 60% do feijão Carioca.

Feijão Carioca, uma classe comercial especificamente desenvolvida para o mercado brasileiro, caracteriza-se por tegumento marrom claro com listras marrom escuras. Pode ser produzido em todo o país, em mais de uma safra anual. Porém, após a colheita e durante o armazenamento, sofre rápido escurecimento e desenvolvimento do fenômeno *hard-to-cook* (HTC) (COELHO et al., 2013; SILVA et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2016).

O amido de feijão, assim como de outras leguminosas (ervilha, grão de bico e lentilha) vem sendo estudado quanto às suas características estruturais e tecnológicas dado ao crescente interesse em novos ingredientes para a indústria de alimentos (DEMIATE et al., 2016; DU et al., 2014; RUPOLLO et al., 2011). A utilização do amido de feijão representa uma alternativa de aproveitamento de grãos com baixo valor comercial devido à ocorrência de quebra do grão

devido a ruptura do tegumento durante os processos de colheita e pós-colheita, bem como do desenvolvimento do HTC (FERREIRA et al., 2017; VANIER et al., 2019).

Diversas variedades de feijão têm sido estudadas, de acordo com os interesses regionais de consumo ao redor do mundo, mas ainda existem poucos estudos sobre o uso de amido de feijão Carioca e sobre as variações nas características desse amido associado a aspectos genéticos e ambientais.

Assim sendo, este trabalho apresenta o objetivo de caracterizar o amido extraído de feijão Carioca quanto às propriedades químicas, estruturais, térmicas e tecnológicas; e estudar a digestibilidade do amido de feijões: (1) da cultivar Campos Gerais, produzido em diferentes áreas; (2) das cultivares Campos Gerais, Tangara, Estilo, Dama e ANFC, produzidos numa área única e (3) da cultivar Campos Gerais, produzido numa área única, nas safras 2016, 2017 e 2018.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

As amostras de feijão Carioca utilizadas nesse estudo foram doadas por produtores rurais da região de Ponta Grossa-PR, e estão descritas na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Descrição das amostras de Feijão Carioca

Estudo 1 – Amido de feijão Carioca cultivar <i>Campos Gerais</i> produzido em diferentes áreas			
Amostra	Cultivar	Safra	Coordenada geográfica
A1	Campos Gerais	2016	24°52'58''S, 50°19'25''O
A2	Campos Gerais	2016	24°53'49''S, 50°17'36''O
A3	Campos Gerais	2016	24°52'03''S, 50°16'12''O
A4	Campos Gerais	2016	24°52'03''S, 50°16'12''W
A5	Campos Gerais	2016	24°49'10''S, 50°14'40''O
A6	Campos Gerais	2016	25°22'15''S, 49°49'47''O
A7	Campos Gerais	2016	24°48'12''S, 50°15'06''O
Estudo 2 – Amido de feijão Carioca de diferentes cultivares			
Amostra	Cultivar		Coordenada geográfica
AA	Campos Gerais	2016	24°48'12''S, 50°15'06''O
AB	Tangará	2016	24°48'12''S, 50°15'06''O
AC	Estilo	2016	24°48'12''S, 50°15'06''O
AD	Dama	2016	24°48'12''S, 50°15'06''O
AE	ANFC	2016	24°48'12''S, 50°15'06''O
Estudo 3 – Amido de feijão Carioca cultivar <i>Campos Gerais</i> produzido em diferentes safras			
Amostra	Cultivar		Coordenada geográfica
4A	Campos Gerais	2016	24°52'03''S, 50°16'12''W
4B	Campos Gerais	2017	24°52'03''S, 50°16'12''W
4C	Campos Gerais	2018	24°52'03''S, 50°16'12''W

Enzimas α -amilase pancreática suína (E.C. 3.2.1.1, P7545) e amiloglucosidase de *Aspergillus niger* (E.C. 3.2.1.3, A7095) foram adquiridas da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Kit enzimático para amido total (K-TSTA 09/14) e GOPOD (R-GLC4 07/13) foram adquiridos da Megazyme International (Wicklow, Irlanda). Demais reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) e Fischer Scientific (Pittsburg, PA, USA).

3.2.2 Métodos

Após recebimento, as amostras foram manualmente classificadas, descartando-se materiais estranhos, grãos verdes e desidratados. O material foi seco até umidade inferior a 14% e armazenado em temperatura ambiente (25 °C, em média), em ausência de luz, por quatro meses antes da sua utilização, para promover o envelhecimento

3.2.2.1 Extração do amido

O amido foi extraído via úmida, de acordo com Marquezi et al. (2016), com modificações: os grãos (1:10 m/v) foram macerados em uma solução de meta-bissulfito de sódio a 0,16% por 8 h a 4 °C, e posteriormente o tegumento foi retirado manualmente. Os cotilédones foram processados em liquidificador, na razão 1:4 (amostra:água destilada), e a massa peneirada em 325 mesh. A massa retida na peneira foi submetida a sucessivas lavagens com água destilada, para máxima remoção de amido. A suspensão de amido, após decantação por uma hora, foi centrifugada a 8.500 $\times g$ por 10 minutos a 4 °C (Hettich, Rotina 420R, Tuttingen, Alemanha). O sobrenadante, composto por proteínas solúveis, e a primeira camada do precipitado, composto por proteínas insolúveis, foram reservados para uso posterior. A fração amilácea precipitada foi ressuspensa em água destilada e centrifugada repetidas vezes, até que não haver mais fração proteica na superfície do precipitado. O amido coletado foi filtrado a vácuo para remoção de sais. Após secagem a 40 °C por 12h, o amido foi tamisado a 60 mesh, acondicionados em sacos de polietileno e mantido em dessecador até o momento do uso.

3.2.2.2 Propriedades químicas e estruturais do amido

3.2.2.2.1 Teor de amilose

As amostras de amido foram desengorduradas em Soxhlet com solução de metanol a 90% (v/v), por 24 h. O teor de amilose foi determinado por método potenciométrico (Titrimo SM 848, Brinkmann Instrument, Westbury, NY), de acordo com metodologia de Schoch (1964). A análise baseia-se na complexação de iodo pela amilose, por meio da titulação de uma solução de amido com uma solução titulante contendo 0,2 mg I_2 /mL.

A titulação seguiu os seguintes parâmetros: volume inicial de titulante de 2,0 mL, pausa inicial de 90 s, razão de titulação de 2,0 mL em intervalos de 20 s, com variação máxima de potencial de 0,8 mV/min. As condições de término foram programadas para volume máximo de titulante de 150 mL ou potencial máximo de 300 mV. A reação ocorreu a 30 °C com agitação.

A diferença de potencial resultante da titulação foi relacionada à massa de iodo livre de cada amostra, por meio de curva de calibração previamente obtida pela titulação de uma solução EMF (contendo KCl e KI) com a solução titulante.

O iodo complexado na amostra foi calculado subtraindo-se o iodo livre na amostra, do iodo total adicionado na titulação. O coeficiente linear do gráfico Iodo livre x Iodo ligado representa a afinidade por iodo (IA) da amostra. O teor de amilose foi então determinado pela razão IA da amostra e IA da amilose pura, que representa aproximadamente 20% para a maioria das fontes botânicas (SCHOCH, 1964).

3.2.2.2.2 Difração de raios X

O padrão de difração de raios X das amostras foi determinado por difratômetro modelo Ultima IV (Rigaku, Tóquio, Japão), nas seguintes condições: Tubo de Raios X CuK α ; comprimento de onda de 1,5406 Å; 40 kV; 20 mA; com varredura de 3 a 40° (2 θ).

As amostras, analisadas em condições de saturação da umidade, foram previamente mantidas em cápsulas de alumínio abertas dentro de dessecador contendo água por aproximadamente sete dias, até atingirem massa constante.

A cristalinidade relativa (RC) dos grânulos, razão entre a área da região cristalina (Ac) e a área total (com Aa representando a área amorfa), foi calculada pela equação (1), conforme (NARA; KOMIYA, 1983):

$$\% RC = \frac{Ac}{Ac + Aa} \times 100 \quad (1)$$

3.2.2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos grânulos foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no equipamento Tescan – VEGA 3 (Kohoutovice, República Checa), nas amostras previamente metalizadas com ouro, a uma tensão de 15 kV (RATNAYAKE et al., 2001).

3.2.2.3 Propriedades térmicas do amido

As propriedades térmicas, analisadas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), foram obtidas de acordo com descrição de Demiate et al. (2016). O equipamento DSC-60 (Shimadzu, Quioto, Japão) foi previamente calibrado com Índio (99% de pureza, T_p = 156,6 °C, ΔH = 28,56 J.g⁻¹). As amostras, na proporção de 2 mg de amido (base seca) para 6 μ L de água destilada, foram mantidas em equilíbrio por 2 h a 25 °C em cadinhos de alumínio selados.

Aquecimento de 45 até 100 °C, a uma razão de aquecimento de 5 °C/min foi aplicado para determinar as temperaturas de início, de pico e de conclusão de gelatinização (T_0 , T_p e T_c) e a variação da entalpia de gelatinização (ΔH). Após a gelatinização, os cadinhos selados contendo as amostras foram mantidos a 4 °C por sete dias para determinação das propriedades térmicas após a retrogradação. A porcentagem de retrogradação foi determinada pela razão entre ΔH do amido retrogradado e ΔH do amido gelatinizado.

3.2.2.4 Propriedades tecnológicas do amido

3.2.2.4.1 Poder de inchamento e solubilidade em água

O poder de inchamento (SP) e a solubilidade em água (S) dos grânulos de amido foram determinados de acordo com metodologia utilizada por Aplevicz e Demiate (2007) com modificações. Em um tubo de centrífuga foram preparadas suspensões de 1% (m/v) de amido (base seca) em 40 mL de água deionizada, e aquecidas a 60, 70, 80 e 90 °C, em banho-maria com agitação constante por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2.000 $\times g$ (CELM Combate, São Paulo, Brasil) por 10 minutos.

A fração solúvel presente no sobrenadante foi coletada e seca em estufa a 60 °C por 24 h, e solubilidade em água (S) foi calculada pela razão entre a massa restante após a secagem (MS) e a massa de amostra (MA), conforme equação 2:

$$S = \frac{MS}{MA} * 100 \quad (2)$$

A porção decantada no tubo foi pesada (MC = massa centrifugada) e o poder de inchamento dos grânulos (SP) foi determinado proporcionalmente à massa que não foi solubilizada em água (MA – MS), pela equação 3:

$$SP = \frac{MC}{MA - MS} \quad (3)$$

3.2.2.4.2 Sinérese

O método proposto por Wosiacki e Cereda (1985) foi utilizado para determinação da sinérese das pastas de amido. Uma suspensão de amido a 10% (m/v) em água deionizada foi aquecida a 97 °C por 10 minutos sob agitação constante até completa gelatinização. Após a gelatinização as amostras foram armazenadas em tubos Falcon e pesadas.

Para o primeiro ciclo de congelamento-descongelamento as amostras foram resfriadas a 4 °C por 24 h, congeladas a -18 °C por 36 h e posteriormente descongeladas a 45 °C por 3 horas, em estufa com circulação de ar. Para o segundo e terceiro ciclos as amostras foram novamente congeladas a -18 °C por 36 h e descongeladas nas mesmas condições do primeiro ciclo. A cada ciclo a perda de água foi quantificada gravimetricamente e expressa em porcentagem em relação ao peso inicial da suspensão.

3.2.2.4.3 Propriedades de Pasta

As propriedades de pasta dos amidos foram determinadas em viscoamilógrafo Visco Analisador Rápido (RVA-4, Newport Scientific, Austrália), nas seguintes condições de análise: aquecimento contínuo de 50 a 95 °C, manutenção a 95 °C por 6 minutos e resfriamento contínuo até a finalização da análise em 23 minutos (Método STD-2) (DEMIATE et al., 2005). Foram preparadas 28 g de suspensão de amido a 8% (base seca) em água destilada. Os seguintes parâmetros foram avaliados: viscosidade máxima, viscosidade mínima, viscosidade de quebra, viscosidade final, viscosidade *setback*, temperatura de pasta.

3.2.2.5 Digestibilidade *in vitro* do amido

Apenas as amostras do estudo (2) foram avaliadas quanto à digestibilidade *in vitro*, de acordo com método proposto por Englyst; Kingman e Cummings (1992). Resumidamente, amostras de amido nativo desengordurado (900 mg) foram suspensas em 20 mL de tampão acetato 0,1M pH 5,2, em tubos Falcon contendo 50 mg de goma guar e cinco bolas de vidro (diâmetro 5mm). A hidrólise foi conduzida em banho térmico à 37 °C com agitação constante, adicionando-se 5 mL de extrato de enzimas α -amilase pancreática e amiloglucosidase (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA). O amido de rápida digestão (RDS) foi determinado após 20 minutos de hidrólise e o amido de digestão lenta (SDS) após 120 minutos, pelo uso de kit enzimático GOPOD (Megazyme, Wicklow, Ireland). O amido resistente (RS) foi obtido pela

porção de amido não hidrolisada ao final de 120 minutos, conforme equação 4. O amido total (TS) foi determinado de acordo com método AOAC 996.11, empregando-se kit para amido total K-TSTA Megazyme (Wicklow, Ireland).

$$RS = TS - RDS - SDS \quad (4)$$

3.2.2.6 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram avaliados por Anova unifatorial e as diferenças entre as amostras (nível de significância de 0,05%), foram determinadas por teste de Fisher, utilizando Software Statistica versão 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Teor de Amilose

O teor de amilose das amostras de feijão Carioca variou entre 40,06 e 42,60% (Tabela 3.1). Os resultados observados são condizentes com os dados de literatura para teor de amilose em leguminosas. Segundo Wani et al. (2016) o teor amilose em amido de leguminosas varia entre 17 e 52%. Du et al. (2014) relataram valores entre 32 a 45% para algumas variedades de feijão (*Pinto Bean*, *Red Kidney Bean*, *Navy Bean* e *Black Bean*). Demiate et al. (2016) encontraram teor de amilose de 35% para amido de feijão Carioca, empregando método de titulometria. Marquezi et al. (2016) relataram teor de amilose entre 49,25 e 51,11% em feijão Carioca, utilizando método rápido colorimétrico.

Observou-se que o teor de amilose não apresentou diferença significativa entre amostras em relação à área de cultivo, às cultivares e à safra. Contudo, alguns estudos relatam que diferentes variedades, condições e local de cultivo resultam em diferentes valores de amilose (HOOVER; RATNAYAKE, 2002; MARQUEZI et al., 2016; OVANDO-MARTÍNEZ et al., 2011; TESTER; KARKALAS, 2001).

Ovando-Martínez et al. (2011) demonstraram que duas variedades de feijão, cultivadas em diferentes regiões do México apresentaram diferença significativa no teor de amilose.

Contudo as condições de cultivo eram bastante distintas, sendo uma parcela cultivada sob irrigação e outra sem irrigação, e a época de cultivo variou de uma região para outra.

Em nosso estudo 1 a diferença no teor de amilose não foi evidenciada provavelmente devido à similaridade das regiões de cultivo e das condições meteorológicas, visto que todas as amostras foram cultivadas no mesmo período do ano. Dados da Análise Climática das Safras de Verão realizado pela Fundação ABC (Castro PR), mostraram que na safra 2016, entre setembro e abril, não houve variação entre a temperatura média do ar ($20,5 - 20,8\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a radiação solar média ($16,4 - 17,5\text{ MJ/m}^2$) entre as cidades onde as amostras foram cultivadas.

As amostras do estudo 2 (cultivares Campos Gerais, Tangará, Estilo, Dama e ANFC) desse trabalho foram produzidas em mesmo local e submetidas às mesmas condições de solo e manejo. Assim, ficou demonstrado que cultivares diferentes da mesma variedade de feijão (Carioca) apresentam teor de amilose similares.

Em relação ao estudo 3, em que amostras da mesma cultivar (Campos Gerais) foram produzidas em safras distintas, na mesma área, a similaridade no teor de amilose das amostras pode ser atribuída às características meteorológicas semelhantes durante o cultivo do feijão, nos anos de 2016, 2017 e 2018. De acordo com a Análise Climática das Safras de Verão, realizado pela Fundação ABC, em Carambeí- PR, a precipitação pluvial entre setembro e abril na região oscilou entre 1175 e 1236 mm. A radiação solar média no período do cultivo das amostras variou entre 17,9 e 18,5 MJ/m^2 , e a radiação solar disponível em superfície foi de 0,60 a 0,62%. A temperatura média do ar foi registrada em 20,4 $^{\circ}\text{C}$ em 2016, 18,8 $^{\circ}\text{C}$ em 2017 e 19,0 $^{\circ}\text{C}$ em 2018. Esses dados são relevantes para a fotossíntese das plantas e para a síntese do amido no feijão.

O teor de amilose influencia as propriedades funcionais do amido como gelatinização, retrogradação, formação de pasta, capacidade de inchamento (WANI et al., 2016). A determinação do conteúdo de amilose é importante para que, conhecendo-se as características do amido por ela influenciadas, seja possível determinar sua aplicação apropriada. Ainda, a proporção amilose-amilopectina é descrita como um dos fatores de maior influência na digestibilidade do amido (DUAN et al., 2012; MIRANDA et al., 2019).

Tabela 3.2 Transição térmica de gelatinização e de dissociação do amido retrogradado, porcentagem de retrogradação, cristalinidade relativa (RC - %) e teor de amilose (%).

Estudo 1 – Amido de feijão Carioca cultivar <i>Campos Gerais</i> produzido em diferentes áreas *											
Gelatinização				Dissociação do amido retrogradado				Retrogradação (%)	RC (%)	Amilose (%)	
Amostra	T_0 (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	ΔH (J/g)	T_{0R} (°C)	T_{pR} (°C)	T_{cR} (°C)				
A1	67,7 ± 0,4 ^d	74,7 ± 0,1 ^e	79,9 ± 0,3 ^{ab}	9,5 ± 0,6 ^c	43,6 ± 0,5 ^d	61,9 ± 0,1 ^a	68,4 ± 0,2 ^a	4,3 ± 0,2 ^c	45,7 ± 1,9 ^c	33,49 ± 0,93	41,13 ± 1,75
A2	72,0 ± 0,3 ^a	75,3 ± 0,1 ^b	79,4 ± 0,1 ^b	9,2 ± 0,4 ^c	46,3 ± 0,6 ^{abc}	59,1 ± 0,1 ^e	65,9 ± 0,1 ^c	5,3 ± 0,3 ^b	57,8 ± 2,7 ^{ab}	32,01 ± 0,74	41,67 ± 2,39
A3	69,1 ± 0,4 ^c	75,5 ± 0,1 ^a	79,8 ± 0,5 ^{ab}	10,2 ± 0,6 ^a	45,9 ± 0,7 ^{bc}	58,8 ± 0,1 ^f	67,0 ± 0,6 ^b	5,6 ± 0,3 ^{ab}	55,4 ± 1,0 ^b	33,87 ± 1,04	40,55 ± 0,76
A4	69,0 ± 0,2 ^c	74,8 ± 0,2 ^{de}	80,2 ± 0,8 ^a	9,7 ± 0,1 ^{ab}	46,8 ± 0,5 ^{ab}	55,6 ± 0,2 ^g	66,3 ± 0,2 ^c	5,7 ± 0,1 ^a	59,3 ± 0,5 ^a	34,08 ± 0,88	42,44 ± 2,35
A5	68,7 ± 0,3 ^c	74,9 ± 0,1 ^{cd}	79,9 ± 0,1 ^{ab}	9,5 ± 0,2 ^c	45,6 ± 1,1 ^c	60,5 ± 0,1 ^d	66,2 ± 0,2 ^c	4,4 ± 0,1 ^c	46,1 ± 1,3 ^c	32,58 ± 0,93	40,07 ± 4,45
A6	69,7 ± 0,1 ^b	75,0 ± 0,2 ^c	78,7 ± 0,2 ^c	9,5 ± 0,2 ^c	46,2 ± 0,5 ^{abc}	61,4 ± 0,1 ^b	63,6 ± 0,2 ^e	4,4 ± 0,2 ^c	46,0 ± 2,6 ^c	33,34 ± 1,13	40,83 ± 3,74
A7	69,8 ± 0,0 ^b	75,0 ± 0,1 ^c	79,9 ± 0,1 ^{ab}	7,9 ± 0,1 ^c	47,2 ± 0,2 ^a	60,9 ± 0,1 ^c	65,3 ± 0,1 ^d	4,6 ± 0,2 ^c	58,4 ± 1,9 ^{ab}	32,84 ± 1,02	41,41 ± 4,93
Estudo 2 – Amido de feijão Carioca de diferentes cultivares **											
Gelatinização				Dissociação do amido retrogradado				Retrogradação (%)	RC (%)	Amilose (%)	
Amostra	T_0 (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	ΔH (J/g)	T_{0R} (°C)	T_{pR} (°C)	T_{cR} (°C)				
AA	69,8 ± 0,0 ^b	75,0 ± 0,1 ^c	79,9 ± 0,1 ^c	7,9 ± 0,1 ^b	47,2 ± 0,2 ^a	60,9 ± 0,1 ^a	65,3 ± 0,1 ^c	4,6 ± 0,2	58,4 ± 1,9 ^a	32,84 ± 1,02	41,41 ± 4,93
AB	69,9 ± 0,2 ^b	75,9 ± 0,1 ^b	80,6 ± 0,1 ^{ab}	8,9 ± 0,1 ^a	45,4 ± 0,1 ^c	56,8 ± 0,1 ^b	68,5 ± 1,1 ^a	4,5 ± 0,2	50,8 ± 2,3 ^b	32,97 ± 0,64	42,22 ± 2,11
AC	69,8 ± 0,2 ^b	76,6 ± 0,2 ^a	81,0 ± 0,1 ^a	9,1 ± 0,1 ^a	42,8 ± 0,1 ^d	55,6 ± 0,1 ^c	66,8 ± 0,5 ^b	4,7 ± 0,2	51,5 ± 2,1 ^b	32,49 ± 0,62	42,44 ± 1,90
AD	69,7 ± 0,1 ^b	75,7 ± 0,1 ^b	80,2 ± 0,1 ^{bc}	7,9 ± 0,1 ^b	45,8 ± 0,1 ^b	54,1 ± 0,1 ^d	64,4 ± 0,9 ^c	4,4 ± 0,4	51,5 ± 5,2 ^{ab}	32,71 ± 0,96	41,63 ± 2,45
AE	70,7 ± 0,6 ^a	76,6 ± 0,2 ^a	80,8 ± 0,6 ^a	7,8 ± 0,2 ^b	45,2 ± 0,3 ^c	53,7 ± 0,1 ^e	67,1 ± 0,3 ^b	4,5 ± 0,2	57,5 ± 0,9 ^a	33,44 ± 0,46	42,60 ± 2,75
Estudo 3 – Amido de feijão Carioca cultivar <i>Campos Gerais</i> produzido em diferentes safras ***											
Gelatinização				Dissociação do amido retrogradado				Retrogradação (%)	RC (%)	Amilose (%)	
Amostra	T_0 (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	ΔH (J/g)	T_{0R} (°C)	T_{pR} (°C)	T_{cR} (°C)				
4A	69,0 ± 0,2 ^a	74,8 ± 0,2 ^a	80,2 ± 0,8 ^a	9,7 ± 0,1	46,8 ± 0,5	55,6 ± 0,2 ^c	66,3 ± 0,2 ^c	5,7 ± 0,1 ^a	59,3 ± 0,5 ^a	34,08 ± 0,88	42,44 ± 2,35
4B	65,3 ± 0,7 ^c	70,8 ± 0,1 ^c	76,7 ± 1,2 ^b	10,0 ± 0,5	46,6 ± 0,6	60,1 ± 0,1 ^a	68,3 ± 0,3 ^a	5,5 ± 0,1 ^b	54,5 ± 2,1 ^b	33,71 ± 0,99	41,33 ± 4,12
4C	67,2 ± 1,1 ^b	72,2 ± 0,1 ^b	78,0 ± 0,5 ^b	10,0 ± 0,2	46,4 ± 0,4	56,7 ± 0,3 ^b	67,1 ± 0,2 ^b	5,5 ± 0,1 ^b	55,2 ± 2,1 ^b	33,99 ± 0,41	40,06 ± 2,35

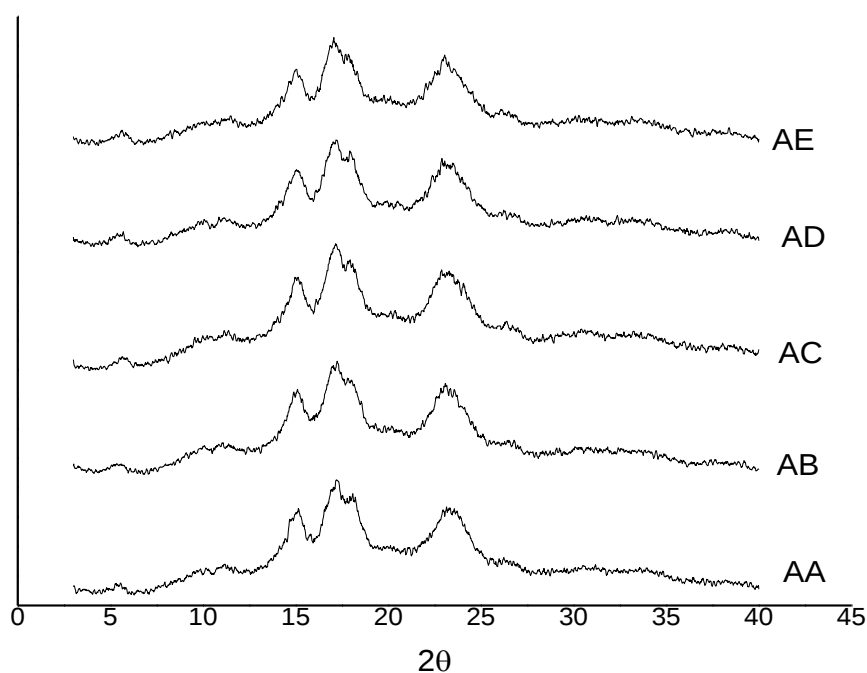
Nota: letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). Ausência de letras indica que não houve diferença significativa. T_0 – temperatura onset (início), T_p – temperatura de pico, T_c – temperatura de conclusão, ΔH – variação da entalpia de gelatinização. *Amostras Estudo 1: A1 a A7 – feijão Carioca cultivar Campos Gerais; **Amostras Estudo 2: AA – feijão Carioca cultivar Campos Gerais, AB – cultivar Tangará, AC – cultivar Estilo, AD – cultivar Dama e AE – cultivar ANFC. ***Amostras Estudo 3 – 4A – cultivar Campos Gerais safra 2016, 4B – cultivar Campos Gerais safra 2017, 4C – cultivar Campos Gerais safra 2018.

3.3.2 Difração de Raios X

O padrão de difração de raios X permite a classificação dos amidos entre tipos A (com ângulos em 2θ em aproximadamente 15.3° , 17.1° , 18.2° e 23.5° , tipo B (5.6° , 14.4° , 17.2° , 22.2° e 24°) e tipo C (5.6° , 15.3° , 17.3° , 18.1° e 23.5°), intermediário entre A e B (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006).

As amostras estudadas apresentaram padrão de cristalinidade tipo C (Figura 3.1), característico de amido de leguminosas, e RC entre 32,01 e 34,08% (Tabela 3.1).

Figura 3.1 Padrões de difração de raios X das amostras de amido de feijão Carioca do estudo 2



Nota: Amostras Estudo 2: AA – feijão Carioca cultivar Campos Gerais, AB – cultivar Tangará, AC - cultivar Estilo, AD – cultivar Dama e AE – cultivar ANFC

Lima et al. (2017) encontraram RC de 34% para feijão Carioca, similar aos resultados deste estudo.

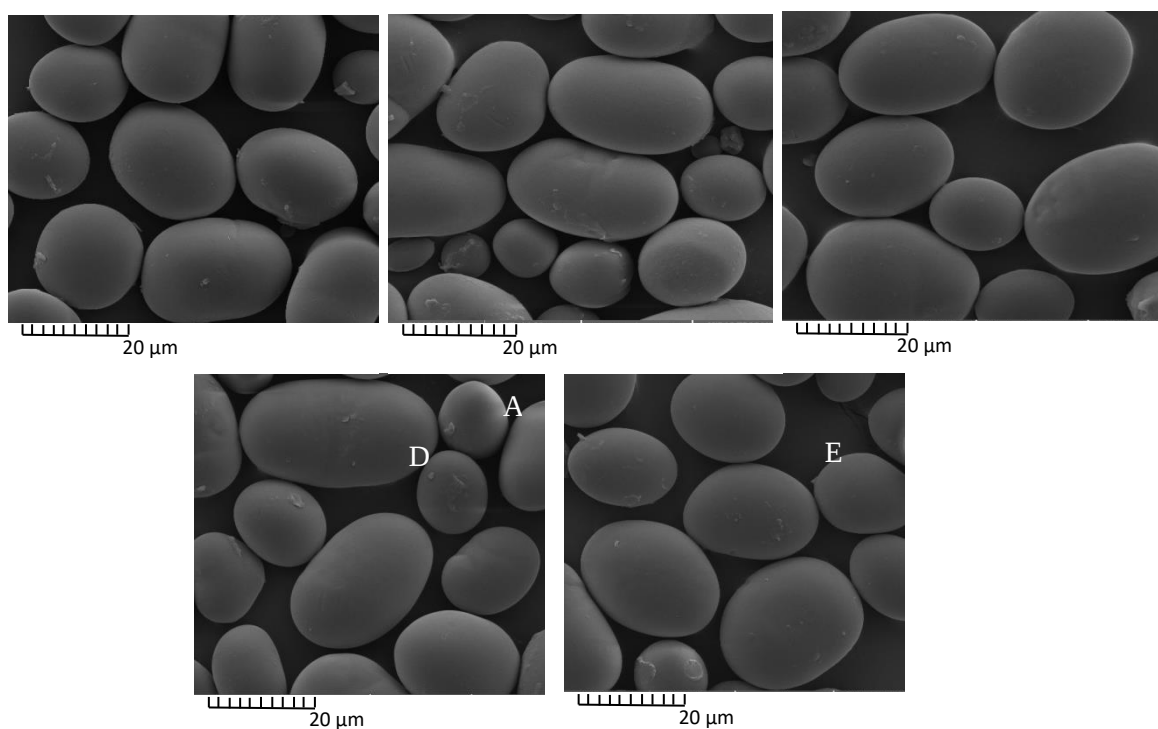
Diferenças no RC de feijões de diferentes cultivares podem ser atribuídas a fatores como tamanho e arranjo dos cristais; proporção da região cristalina e amorfa, orientação das duplas hélices das ramificações da amilopectina na região cristalina e grau de interação entre as duplas

hélices, e umidade (HOOVER et al., 2010; HOOVER; RATNAYAKE, 2002; VANIER et al., 2019).

3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para o Estudo 2 (Figura 3.2), mostraram grânulos de amido de feijão Carioca de formato ovalado e de superfície lisa. Não foram observadas ranhuras na superfície do grânulo, tampouco variação no formato dos grânulos de diferentes variedades.

Figura 3.2 Imagens obtidas por MEV das amostras de amido de feijão do Estudo 2.



Nota: Amostras Estudo 2: AA – feijão Carioca cultivar Campos Gerais, AB – cultivar Tangará, AC - cultivar Estilo, AD – cultivar Dama e AE – cultivar ANFC. Aumento 2000 x.

Imagens semelhantes foram obtidas por Demiate et al., 2016 e Vanier et al., 2019 para amido de feijão Carioca. A morfologia dos grânulos de amido pode interferir nas propriedades de pasta, na solubilidade do amido e na susceptibilidade à ação enzimática. Superfície lisa, sem ranhuras dificultam o acesso da enzima ao interior do grânulo e atrasam ou dificultam a ação enzimática (AMBIGAIPALAN et al., 2011; DARTOIS et al., 2010; VANIER et al., 2019).

3.3.4 Propriedades Térmicas do Amido

As propriedades térmicas dos amidos de feijão Carioca, determinadas por DSC, estão demonstradas na Tabela 3.1. O estudo foi conduzido de modo a se determinar a transição térmica de gelatinização do amido, e a transição térmica de dissociação do amido retrogradado.

Observou-se temperatura de pico de gelatinização (T_p) entre 70,8 e 76,6 °C, similar aos valores encontrados por Demiate et al., 2016 (73,2 °C), Rupollo et al., 2011 (entre 74,7 e 75,2 °C) e Vanier et al., 2019 (76,0 °C).

Amidos de padrão polimórfico tipo A apresentam temperatura de gelatinização maior que amidos tipo B, devido ao arranjo mais compacto dos cristais no grânulo. Em amidos tipo C, a alta temperatura de gelatinização deve-se à proporção de grânulos tipo A (HE; WEI, 2017).

A variação da entalpia de gelatinização oscilou entre 7,8 a 10,2 J/g, com valores significativamente diferentes entre as amostras, com exceção ao estudo 3. Os resultados observados são inferiores aos valores encontrados por Demiate et al. (2016) (13,3 J/g), mas superiores aos valores relatados por Rupollo et al. (2011) (1,7 a 3,5 J/g) para feijão Carioca. A endoterma de gelatinização está relacionada à gelatinização da lamela cristalina de amilopectina, mas não necessariamente à proporção de área cristalina, que corresponde à razão amilose:amilopectina, e sim à distribuição de cadeias de amilopectina no grânulo (DU et al., 2014; HOOVER et al., 2010; ; MA et al., 2017). A retrogradação calculada para as amostras de amido de feijão Carioca dos três estudos conduzidos nesse trabalho variou significativamente entre 45,7 e 59,3%. Valor similar foi relatado por Demiate et al. (2016) (58,7%) que encontraram correlação positiva entre retrogradação e teor de amilose, e entre variação de entalpia de dissociação (ΔH_r) e cadeias longas de amilopectina de amidos de diferentes feijões.

A retrogradação ocorre mais rapidamente e com maior intensidade nas moléculas de amilose, já que sua estrutura linear facilita a reassociação. A retrogradação depende da formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias. Na amilopectina, devido à estrutura altamente ramificada, as interações são mais fracas que nas moléculas lineares de amilose. Assim, amidos com alto teor de amilose apresentam maior tendência à retrogradação (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992; JEONG et al., 2019).

Após a gelatinização, as moléculas de amido perdem energia em função do tempo de estocagem e da diminuição da temperatura. As moléculas, então, começam a se reassociar para atingir um estado mais ordenado, de maior estabilidade, formando simples e duplas hélices. Na amilose, as hélices então desordenadas durante a gelatinização, se agregam rapidamente para formar estruturas ordenadas. Durante a retrogradação a amilose pode formar uma matriz

ordenada, na qual as cadeias laterais de amilopectina podem lentamente se associar, para formação de uma rede. Como consequência da retrogradação, a viscosidade de pasta aumenta e forma-se um gel elástico e opaco (FU et al., 2015; MIRANDA et al., 2019).

3.3.5 Poder de Inchamento e Solubilidade em Água

Os resultados do poder de inchamento e solubilidade das amostras de amido de feijão Carioca encontram-se na Tabela 3.2. Foi possível observar diferença significativa entre as amostras dos três estudos realizados. Andrabi et al. (2016) e Chung et al. (2008) relataram diferença significativa em poder de inchamento e solubilidade entre amostras de feijão de diferentes variedades.

Tabela 3.3 Poder de inchamento (g/g) e solubilidade (%) das amostras de amido de feijão Carioca

Estudo 1 – Amido de feijão Carioca cultivar <i>Campos Gerais</i> produzido em diferentes áreas *								
<i>Poder de Inchamento (g/g)</i>					<i>Solubilidade (%)</i>			
<i>Amostra</i>	60 (°C)	70 (°C)	80 (°C)	90 (°C)	60 (°C)	70 (°C)	80 (°C)	90 (°C)
A1	2,46 ± 0,09 ^c	2,70 ± 0,58 ^b	5,24 ± 0,86 ^c	11,41 ± 0,77 ^{ab}	2,51 ± 0,08 ^b	2,68 ± 0,02 ^b	4,31 ± 0,03 ^d	10,58 ± 0,03 ^a
A2	2,86 ± 0,05 ^b	3,54 ± 0,16 ^a	5,99 ± 0,17 ^b	11,68 ± 0,54 ^a	1,86 ± 0,10 ^d	2,62 ± 0,18 ^{bc}	5,30 ± 0,08 ^a	10,63 ± 0,00 ^a
A3	2,94 ± 0,14 ^{ab}	3,61 ± 0,10 ^a	5,69 ± 0,36 ^{bc}	10,75 ± 0,23 ^{bc}	2,23 ± 0,09 ^c	2,42 ± 0,07 ^c	4,90 ± 0,04 ^b	8,80 ± 0,43 ^c
A4	3,12 ± 0,20 ^a	3,34 ± 0,07 ^a	5,39 ± 0,18 ^{bc}	10,98 ± 0,26 ^b	2,94 ± 0,11 ^a	3,17 ± 0,08 ^a	4,27 ± 0,11 ^d	10,73 ± 0,09 ^a
A5	2,98 ± 0,19 ^{ab}	3,39 ± 0,19 ^a	5,94 ± 0,13 ^b	9,20 ± 0,08 ^d	1,78 ± 0,07 ^d	2,12 ± 0,06 ^d	4,53 ± 0,08 ^c	8,54 ± 0,48 ^c
A6	3,08 ± 0,07 ^{ab}	3,34 ± 0,08 ^a	5,78 ± 0,13 ^{bc}	11,31 ± 0,11 ^{ab}	1,60 ± 0,05 ^e	2,52 ± 0,16 ^{bc}	4,85 ± 0,10 ^b	9,99 ± 0,30 ^b
A7	2,96 ± 0,15 ^{ab}	3,24 ± 0,10 ^a	6,99 ± 0,04 ^a	10,30 ± 0,18 ^c	1,10 ± 0,03 ^f	2,40 ± 0,25 ^c	4,30 ± 0,03 ^d	10,06 ± 0,16 ^b
Estudo 2 – Amido de feijão Carioca de diferentes cultivares **								
<i>Poder de Inchamento (g/g)</i>					<i>Solubilidade (%)</i>			
<i>Amostra</i>	60 (°C)	70 (°C)	80 (°C)	90 (°C)	60 (°C)	70 (°C)	80 (°C)	90 (°C)
AA	2,96 ± 0,15 ^b	3,24 ± 0,10 ^{ab}	6,99 ± 0,04 ^a	10,30 ± 0,18 ^b	1,10 ± 0,03 ^e	2,40 ± 0,25 ^{bc}	4,30 ± 0,03 ^b	10,06 ± 0,16 ^b
AB	2,99 ± 0,08 ^b	3,66 ± 0,45 ^a	5,86 ± 0,37 ^{bc}	12,12 ± 0,22 ^a	1,46 ± 0,02 ^c	2,13 ± 0,06 ^d	4,36 ± 0,09 ^b	11,17 ± 0,32 ^a
AC	3,62 ± 0,19 ^a	3,12 ± 0,13 ^{bc}	5,29 ± 0,20 ^d	10,00 ± 0,06 ^b	2,09 ± 0,11 ^b	2,53 ± 0,06 ^b	4,39 ± 0,01 ^b	9,52 ± 0,01 ^c
AD	2,89 ± 0,10 ^b	2,65 ± 0,36 ^c	5,39 ± 0,13 ^{cd}	9,20 ± 0,05 ^c	1,31 ± 0,10 ^d	2,26 ± 0,09 ^{cd}	4,89 ± 0,26 ^a	7,74 ± 0,21 ^d
AE	2,38 ± 0,05 ^c	3,65 ± 0,26 ^a	6,11 ± 0,41 ^b	10,62 ± 0,77 ^b	2,84 ± 0,07 ^a	2,98 ± 0,05 ^a	4,57 ± 0,23 ^b	9,50 ± 0,30 ^c
Estudo 3 – Amido de feijão Carioca cultivar <i>Campos Gerais</i> produzido em diferentes safras ***								
<i>Poder de Inchamento (g/g)</i>					<i>Solubilidade (%)</i>			
<i>Amostra</i>	60 (°C)	70 (°C)	80 (°C)	90 (°C)	60 (°C)	70 (°C)	80 (°C)	90 (°C)
4A	3,12 ± 0,20 ^a	3,34 ± 0,07 ^b	5,39 ± 0,18 ^c	10,98 ± 0,26 ^a	2,94 ± 0,11 ^a	3,17 ± 0,08 ^a	4,27 ± 0,11 ^b	10,73 ± 0,09 ^a
4B	2,75 ± 0,13 ^b	4,03 ± 0,13 ^a	6,03 ± 0,14 ^b	11,11 ± 0,22 ^a	0,52 ± 0,02 ^c	2,62 ± 0,13 ^b	3,50 ± 0,40 ^c	9,44 ± 0,26 ^b
4C	2,63 ± 0,05 ^b	3,10 ± 0,01 ^c	7,27 ± 0,19 ^a	10,09 ± 0,27 ^b	1,24 ± 0,08 ^b	1,33 ± 0,19 ^c	5,68 ± 0,13 ^a	8,88 ± 0,18 ^c

Nota: letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras (p < 0,05).

Amostras Estudo 1: A1 a A1 – feijão Carioca cultivar Campos Gerais; Amostras Estudo 2: AA – feijão Carioca cultivar Campos Gerais, AB – cultivar ‘Tangará’, AC – cultivar Estilo, AD – cultivar Dama e AE – cultivar ANFC. Amostras Estudo 3 – 4A – cultivar Campos Gerais safra 2016, 4B - cultivar Campos Gerais safra 2017, 4C - cultivar Campos Gerais safra 2018.

Conforme Hoover et al. (2010), amidos de leguminosas apresentam poder de inchamento praticamente imensurável abaixo de 60 °C, com valores crescentes em função do aumento da temperatura. Esses autores relataram poder de inchamento de *Pinto Bean* de 2,8; 4,6; 9,5 e 12,2 g/g a temperaturas de 60, 70, 80 e 90 °C. Rupollo et al. (2011) obtiveram valores de poder de inchamento a 90 °C entre 9,24 e 10,05 g/g para amido de feijão Carioca armazenado sob diferentes condições. Contudo a solubilidade a 90 °C relatada por esses autores (2,50 a 2,67%) difere dos valores encontrados neste estudo.

De acordo com Singh et al. (2003), o poder de inchamento e a solubilidade do amido são influenciados pela razão amilose:amilopectina, pelo tamanho e distribuição das cadeias de amilopectina, e estrutura dos grânulos.

Ao ser aquecida em excesso de água, a estrutura cristalina do grânulo rompe-se e as moléculas de água ligam-se às hidroxilas expostas devido ao rompimento da amilose e amilopectina, causando aumento na solubilidade e no inchamento do grânulo. O inchamento dos grânulos aumenta ainda após se atingir a temperatura de gelatinização (SINGH et al., 2003), razão pela qual os estudos de inchamento e solubilidade são geralmente realizados até 90 °C e não somente até a temperatura de gelatinização (inferior a 80 °C, no caso de feijão Carioca). Segundo Hoover et al. (2010) em grânulos com alto teor de amilose, como em leguminosas, as cadeias de amilose apresentam-se fortemente empacotadas na região amorfa, necessitando de mais energia para o rompimento das ligação de hidrogênio, e para a lixiviação da amilose. Assim, alto teor de amilose resulta em baixa solubilidade e baixo poder de inchamento, em relação à grânulos com baixo teor de amilose (WANI et al., 2016).

3.3.6 Sinérese

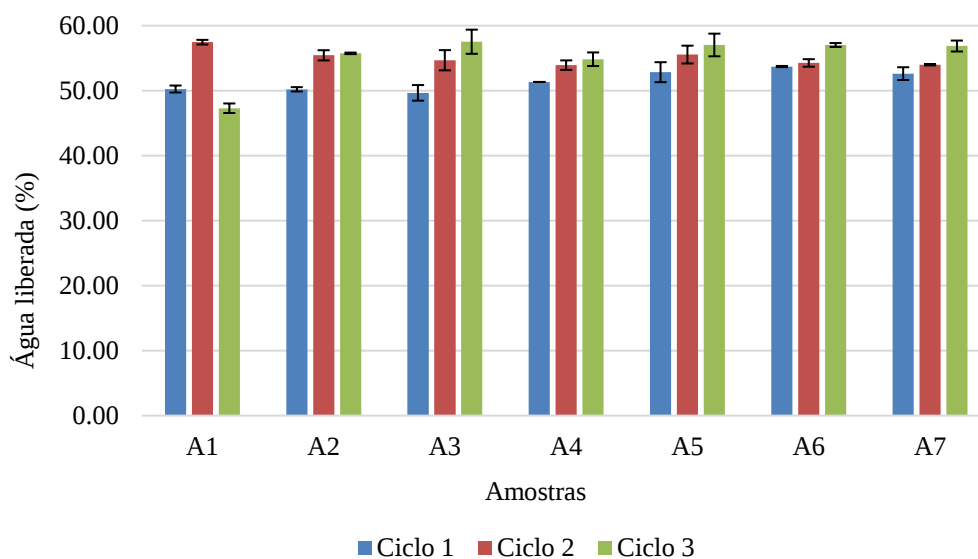
Sinérese refere-se à exsudação espontânea de líquido para fora da estrutura de um gel. Inicialmente no processo de formação de gel ou pasta, a água adicionada encontra-se retida fisicamente entre as estruturas das moléculas de amido. Com o resfriamento, ocorre a liberação da água devido à contração do gel. O grau de sinérese tem sido usado para prever o comportamento do amido quando usado em determinados alimentos (WANI et al., 2016).

Os resultados de sinérese em três ciclos de congelamento-descongelamento mostraram alto grau de liberação de água, próximos a 50%, em todas as amostras, para os três estudos. A Figura 3.3 mostra os resultados apresentados pelo estudo 1. Esse comportamento deve-se ao alto teor de amilose do amido de feijão, já que a amilose apresenta comportamento instável em

água e precipita rapidamente. A susceptibilidade de géis de amido à sinérese fornece um indicador da intensidade da retrogradação (WANI et al., 2016).

O grau de sinérese varia com a concentração da pasta ou gel de amido, temperatura de armazenamento, número de ciclos congelamento-descongelamento, tempo e velocidade de centrifugação e método de ciclos empregado (HOOVER et al., 2010).

Figura 3.3 Sinérese das amostras de amido de feijão Carioca do Estudo 1



Nota: Amostras Estudo 1: A1 a A7 – feijão Carioca cultivar Campos Gerais produzidas em diferentes áreas

Estudos de géis de amido de leguminosas mostraram valores altos de sinérese. Ovando-Martínez et al. (2011) relataram valores de sinérese próximos a este estudo, variando entre 45,5 a 54,9% após 5 ciclos de congelamento-descongelamento de feijão preto e feijão Pinto a 2%. Hoover, Ratnayake, (2002) demonstraram valores de até 70% de sinérese em *Kidney Bean* a 6%. Géis de amido de cereais e tubérculos geralmente apresentam menor sinérese que amidos de leguminosas, principalmente devido ao teor de amilose e à distribuição de cadeias laterais de amilopectina (HOOVER et al., 2010; OVANDO-MARTÍNEZ et al., 2011).

3.3.7 Propriedades de Pasta

Todos os parâmetros de propriedades de pasta apresentaram diferença significativa entre as amostras de diferentes áreas de cultivo, de diferentes cultivares e de diferentes safras (Tabela 3.3). Esse comportamento também foi relatado por Chung et al. (2008); Du et al. (2014); Marquezi et al. (2016). As diferenças nos parâmetros de propriedade de pasta entre amidos de

leguminosas podem ser atribuídas à pureza do amido, à razão amilose:amilopectina, tamanho do grânulo, interação entre duplas hélices nos grânulos (MA et al., 2017). Em nosso estudo, o teor de amido total nas amostras (Tabela 3.4) parece ser um fator importante na diferença dos parâmetros de pasta.

A temperatura de pasta indica a temperatura mínima requerida para cozimento do amido e a temperatura na qual a viscosidade começa a aumentar (MA et al., 2017). Entre os três estudos realizados, a temperatura de pasta variou de 75,1 a 82,6 °C, próximos aos valores de temperatura de gelatinização obtidos por DSC.

A viscosidade de pico indica a máxima capacidade de inchamento, onde se atinge a máxima viscosidade antes da desintegração do grânulo (MA et al., 2017). A maior variação de viscosidade de pico (1231 a 2238 cP) foi observada para as amostras de feijão Carioca de diferentes cultivares, sendo a cultivar ANFC a amostra com menores valores para todos os parâmetros de propriedade de pasta.

Tabela 3.4 Propriedade de pasta das amostras de amido de feijão Carioca

Estudo 1 – Amido de feijão Carioca cultivar <i>Campos Gerais</i> produzido em diferentes áreas *						
Amostra	Viscosidade (cP)					Temperatura de Pasta (°C)
	Pico	Mínima	Quebra	Final	Setback	
A1	1923,0 ± 38,0 ^a	1506,7 ± 43,50 ^b	416,7 ± 5,51 ^a	2563,7 ± 50,50 ^b	1057,0 ± 7,00 ^b	79,20 ± 0,05 ^{cd}
A2	1979,7 ± 21,50 ^a	1719,7 ± 2,52 ^a	260,0 ± 24,00 ^c	2375,7 ± 340,50 ^{bc}	656,0 ± 43,00 ^d	79,98 ± 0,02 ^b
A3	1799,0 ± 127,0 ^b	1463,7 ± 106,50 ^b	335,7 ± 20,50 ^b	2383,7 ± 165,50 ^{bc}	920,0 ± 59,00 ^c	80,55 ± 0,20 ^a
A4	1540,0 ± 7,0 ^c	1360,7 ± 2,52 ^c	179,7 ± 4,51 ^e	2318,0 ± 22,00 ^{bc}	957,7 ± 19,50 ^c	78,98 ± 0,17 ^{de}
A5	1578,0 ± 34,64 ^c	1283,0 ± 6,00 ^c	295,0 ± 26,00 ^c	2392,0 ± 12,00 ^{bc}	1109,0 ± 36,59 ^b	78,93 ± 0,17 ^e
A6	1542,7 ± 60,50 ^c	1332,7 ± 40,50 ^c	210,0 ± 20,00 ^{de}	2287,7 ± 97,50 ^c	955,0 ± 57,00 ^c	79,40 ± 0,20 ^c
A7	1973,0 ± 10,00 ^a	1720,0 ± 26,00 ^a	253,0 ± 16,00 ^{cd}	2923,0 ± 15,00 ^a	1203,0 ± 11,00 ^a	78,38 ± 0,02 ^f
Estudo 2 – Amido de feijão Carioca de diferentes cultivares **						
Amostra	Viscosidade (cP)					Temperatura de Pasta (°C)
	Máxima	Mínima	Quebra	Final	Setback	
AA	1973,0 ± 10,00 ^{bc}	1720,0 ± 26,00 ^b	253,0 ± 16,00 ^c	2923,0 ± 15,00 ^c	1203,0 ± 11,00 ^c	78,38 ± 0,02 ^d
AB	1853,7 ± 145,50 ^c	1562,0 ± 65,00 ^c	291,7 ± 25,50 ^b	2684,7 ± 164,50 ^d	1122,7 ± 129,50 ^c	80,38 ± 0,42 ^c
AC	2238,5 ± 9,50 ^a	1981,5 ± 29,50 ^a	257,0 ± 20,00 ^c	3556,0 ± 9,00 ^a	1574,5 ± 20,50 ^a	81,70 ± 0,20 ^b
AD	2018,0 ± 9,00 ^b	1716,5 ± 15,50 ^b	301,5 ± 6,50 ^a	3181,5 ± 13,50 ^b	1465,0 ± 2,00 ^b	80,60 ± 0,20 ^c
AE	1231,0 ± 28,00 ^d	1150,5 ± 30,50 ^d	80,5 ± 2,50 ^d	1790,0 ± 45,00 ^e	639,5 ± 14,50 ^d	82,60 ± 0,20 ^a
Estudo 3 – Amido de feijão Carioca cultivar <i>Campos Gerais</i> produzido em diferentes safras ***						
Amostra	Viscosidade (cP)					Temperatura de Pasta (°C)
	Máxima	Mínima	Quebra	Final	Setback	
4A	1540,0 ± 7,00 ^c	1360,7 ± 2,52 ^c	179,7 ± 4,51 ^b	2318,0 ± 22,00 ^c	957,7 ± 19,50 ^b	78,98 ± 0,18 ^a
4B	1814,5 ± 80,50 ^b	1692,5 ± 43,50 ^b	122,0 ± 13,00 ^c	2666,0 ± 126,00 ^b	973,5 ± 82,50 ^b	75,18 ± 0,38 ^c
4C	2287,5 ± 21,50 ^a	1919,5 ± 58,50 ^a	368,0 ± 37,00 ^a	3411,5 ± 11,50 ^a	1492,0 ± 47,00 ^a	75,98 ± 0,03 ^b

Nota: letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

Amostras Estudo 1: A1 a A1 – feijão Carioca cultivar Campos Gerais; Amostras Estudo 2: AA – feijão Carioca cultivar Campos Gerais, AB – cultivar ‘Tangará’, AC – cultivar Estilo, AD – cultivar Dama e AE – cultivar ANFC. Amostras Estudo 3 – 4A – cultivar Campos Gerais safra 2016, 4B - cultivar Campos Gerais safra 2017, 4C - cultivar Campos Gerais safra 2018.

Os altos valores encontrados para a viscosidade *setback* são característicos de amidos de leguminosas. Ocorrem porque a amilose se reassocia mais fácil e rapidamente que a amilopectina, causando aumento na viscosidade durante o resfriamento (RUPOLLO et al., 2011). O parâmetro *setback* indica tendência à retrogradação. Contudo, não se pode considerar que os conceitos *setback* e retrogradação sejam iguais, pois o tempo de resfriamento no viscoamilógrafo é insuficiente para que haja completa reassociação das moléculas.

A viscosidade de quebra (*breakdown*) indica o grau de desintegração dos grânulos após o inchamento, sendo calculado pela diferença entre a viscosidade de pico e a viscosidade mínima. Quanto menor o valor de *breakdown* maior a resistência ao cisalhamento, e maior a estabilidade do amido em processos que envolvem aquecimento (ANDRABI et al., 2016). A viscosidade de quebra média das amostras analisadas foi de 270,0 cP para o estudo 1; 247,7 cP para o estudo 2 e 239,9 cP para o estudo 3. Esses valores são menores ao relatado por Demiate et al. (2016) para feijão Carioca (429,5 cP), e por Rupollo et al. (2011) (entre 887 e 962 cP).

De acordo com Demiate et al. (2016), a lixiviação da amilose que ocorre durante o cozimento do amido é de fundamental importância no preparo do feijão. Variedades de feijão com alto teor de amilose podem resultar em maior dureza após o cozimento. Vanier et al. (2019) relataram que feijões com maior teor de amilose resultaram em menor viscosidade de pico, devido à amilose dificultar a capacidade de inchamento dos grânulos.

3.3.8 Digestibilidade *In Vitro* do Amido

A digestibilidade do amido granular de feijão Carioca de diferentes cultivares (estudo 2) encontra-se descrita na Tabela 3.4. A extração das amostras resultou em teor de amido total entre 88,74 a 97,07% em relação à matéria seca. Os resultados de RDS, SDS e RS foram expressos em relação percentual ao teor de amido total de cada amostra. Observaram-se baixos valores de RDS e SDS e alto valor de RS para as amostras. Para os resultados de RS foi evidenciada diferença significativa entre as amostras, com valores entre 82,96 a 88,64%. Yao et al. (2019) encontraram diferença significativa para digestibilidade de amostras de *Mung Bean* de diferentes cultivares. De acordo com esses autores, altos valores de RS em amido cru são esperados pelo fato do grânulo se apresentar intacto, com as regiões amorfas e cristalinas bem organizadas. Ao contrário, RS em amido cozido diminui drasticamente devido ao inchamento dos grânulos e quebra do arranjo molecular, permitindo o acesso das enzimas às moléculas de amilose e amilopectina, antes fortemente empacotadas.

Tabela 3.5 Digestibilidade de amido granular de feijão Carioca do Estudo 2

Amostra	TS (%)	RDS (%)	SDS (%)	RS (%)
AA	97,07 ± 0,57 ^a	4,20 ± 0,17 ^b	7,16 ± 0,42 ^b	88,64 ± 0,59 ^a
AB	88,74 ± 1,77 ^d	5,42 ± 0,02 ^a	7,35 ± 0,90 ^b	87,22 ± 0,88 ^b
AC	92,80 ± 0,77 ^b	5,09 ± 0,90 ^a	6,48 ± 0,01 ^b	88,43 ± 0,90 ^{ab}
AD	90,40 ± 0,13 ^{cd}	4,99 ± 0,01 ^a	7,58 ± 0,55 ^b	87,42 ± 0,56 ^{ab}
AE	91,30 ± 0,53 ^{bc}	5,24 ± 0,19 ^a	11,80 ± 0,96 ^a	82,96 ± 0,77 ^c

Nota: letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). Ausência de letras indica que não houve diferença significativa. TS: amido total, RDS: amido de digestão rápida, SDS – amido de digestão lenta, RS: amido resistente

Amostras Estudo 2: AA – feijão Carioca cultivar Campos Gerais, AB – cultivar Tangará, AC - cultivar Estilo, AD – cultivar Dama e AE – cultivar ANFC.

Os valores de RS encontrados são superiores aos relatados por Du et al. (2014) para amido de feijão cru (entre 72,1 e 78,3%). Mesmo após o cozimento o teor de amido resistente de feijão continua alto comparado a outras fontes de amido como cereais e tuberosas. Em um estudo comparativo entre feijões de diversas variedades, lentilha e grão de bico, Ma et al. (2017) relataram valores de RS entre 56,2 a 80,8% em amido cru e 8,0 a 10,7% em amido cozido. Demiate et al. (2016) obtiveram 2,6% de RS para amido cozido de feijão Carioca, e 0% para amidos cozidos de mandioca e de milho.

O alto teor de amido resistente de leguminosas pode ser atribuído à uma combinação de diversos fatores. O padrão de cristalinidade tipo C (com alta proporção de cristais de tipo B) dos feijões resulta em menor digestibilidade que amidos que apresentam padrão de cristalinidade tipo A, como cereais, principalmente devido à distribuição das cadeias laterais de amilopectina nas regiões amorfa e cristalina. A estrutura dos grânulos de amido de leguminosas auxilia na baixa digestibilidade já que a ação enzimática inicia na superfície. Amidos de cereais contêm poros e canais, que facilitam a penetração da enzima, enquanto a superfície lisa, com ausência de poros, característica de amido de leguminosas, dificulta o acesso da enzima ao interior do grânulo. As cadeias longas de amilose, presentes em alto teor no amido de feijão, são capazes de formar duplas hélices altamente estáveis, que dificultam a ação enzimática. Ainda, a presença de inibidores enzimáticos, como ácido fítico, polifenóis e lectinas, em leguminosas reduzem a digestibilidade do amido (ASHWAR et al., 2016; JEONG et al., 2019).

A relação baixa digestibilidade do amido e baixo índice glicêmico pode ser associada à prevenção de doenças metabólicas como diabetes e doenças coronarianas. RDS, por ser rapidamente digerido no intestino delgado, pode levar ao aumento do nível de glicose no sangue. SDS, digerido no intestino delgado em taxas mais lentas que o RDS, não provoca hiperglicemia e aumenta a sensação de saciedade. RS, porção do amido não digerida no

intestino delgado, mas fermentada no intestino grosso, produz ácidos graxos de cadeia curta que favorecem o crescimento de bactérias benéficas ao trato intestinal e impedem o crescimento de células cancerígenas. A redução do pH do intestino promovida pela fermentação do RS auxilia ainda na absorção de íons de cálcio, zinco e magnésio (MA; BOYE, 2018).

De acordo com Du et al. (2014) o amido de feijão nativo pode ser utilizado como uma fonte de amido resistente em formulações onde se pretende obter benefícios similares aos de fibra. De fato, o alto teor de RS em amido de feijão cru aponta essa fonte botânica como um potencial ingrediente em processos que aplicam cocção branda ou em formulações com ausência de água em que não ocorre a gelatinização do amido, como em cookies e em massas folheadas.

3.4 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou não haver diferença significativa nas características morfológicas e no teor de amilose do amido de feijão Carioca cultivar Campos Gerais cultivado em diferentes áreas e em diferentes safras, bem como em amido de feijão Carioca de diferentes cultivares produzidas numa única área, devido à similaridade das amostras e das condições meteorológicas dos locais de cultivo.

A diferença nos demais parâmetros avaliados, como transição térmica, poder de inchamento, solubilidade, sinérese e propriedades de pasta pode ser decorrente ao teor de amido total distinto entre as amostras.

O amido de feijão nativo pode não ser, no momento, de grande interesse para a indústria de alimentos, devido à sua restrição de aplicação dado à sua característica de alta sinérese. Contudo a sua aplicação visando atender as necessidades do consumidor parecem ser promissoras, devido ao seu elevado teor de amido de baixa digestibilidade e amido resistente. O amido de feijão pode ser interessante para aplicação em produtos onde não ocorre completa gelatinização, devido ao baixo teor ou ausência de água na formulação, como em produtos de panificação que não demandam expansão, como cookies, brownies e produtos de massa folhada.

REFERÊNCIAS

- AMBIGAIPALAN, P.; HOOVER, R.; DONNER, E.; LIU, Q.; JAISWAL, S.; CHIBBAR, R.; NANTANGA, K. K. M.; SEETHARAMAN, K. Structure of faba bean, black bean and pinto bean starches at different levels of granule organization and their physicochemical properties. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2962–2974, 2011.
- ANDRABI, S. N.; WANI, I. A.; GANI, A.; HAMDANI, A. M.; MASOODI, F. A. Comparative study of physico-chemical and functional properties of starch extracted from two kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and green gram cultivars (*Vigna radiata* L.) grown in India. **Starch/ Stärke**, v. 68, n. 5–6, p. 416–426, 2016.
- APLEVICZ, K. S.; DEMIATE, I. M. Caracterização de amidos de mandioca nativos e modificados e utilização em produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 478–484, 2007.
- ASWAR, B. A.; GANI, A.; SHAH, A.; WANI, I. A.; MASOODI, F. A. Preparation, health benefits and applications of resistant starch – a review. **Starch/ Stärke**, v. 68, p. 287–301, 2016.
- CHUNG, H. J.; LIU, Q.; PETER PAULS, K.; FAN, M. Z.; YADA, R. In vitro starch digestibility, expected glycemic index and some physicochemical properties of starch and flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Canada. **Food Research International**, v. 41, n. 9, p. 869–875, 2008.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira - Grãos**, v. 6, n. 7, 2019.
- COELHO, S. R. M.; PRUDENCIO, S. H.; CHRIST, D.; SILVIO, C.; SCHOENINGER, V. Physico-chemical properties of common beans under natural and accelerated storage conditions. **Ciencia e Investigación Agraria** v. 40, n. 3, p. 629–636, 2013.
- DARTOIS, A.; SINGH, J.; KAUR, L.; SINGH, H. Influence of guar gum on the in vitro starch digestibility-rheological and Microstructural characteristics. **Food Biophysics**, v. 5, n. 3, p. 149–160, 2010.
- DEMIATE, I. M.; FIGUEROA, A. M.; ZORTÉA GUIDOLIN, M. E. B.; RODRIGUES DOS SANTOS, T. P.; YANGCHENG, H.; CHANG, F.; JANE, J. L. Physicochemical characterization of starches from dry beans cultivated in Brazil. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 812–820, 2016.
- DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P.; MESTRES, C. Viscographic characteristics of chemically modified cassava starches assessed by RVA. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 11, n. 01, 2005.
- DU, S. KUI; JIANG, H.; YU, X.; JANE, J. L. Physicochemical and functional properties of whole legume flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 308–313, 2014.
- DUAN, D. X.; DONNER, E.; LIU, Q.; SMITH, D. C.; RAVENELLE, F. Potentiometric titration for determination of amylose content of starch - A comparison with colorimetric method. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1142–1145, 2012.

ENGLYST, H. N.; KINGMAN, S. M.; CUMMINGS, J. H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, p. S33–S50, 1992.

FERREIRA, C. D.; ZIEGLER, V.; EL HALAL, S. L. M.; VANIER, N. L.; ZAVAREZE, E. DA R.; DE OLIVEIRA, M. Characteristics of starch isolated from black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) stored for 12 months at different moisture contents and temperatures. **Starch/ Stärke**, v. 69, n. 5–6, p. 1–10, 2017.

FU, Z.; CHEN, J.; LUO, S.; LIU, C.; LIU, W. Effect of food additives on starch retrogradation: A review. **Starch/ Stärke**, p. 69–78, 2015.

GANASCINI, D.; LAURETH, J. C. U. ; MENDES, I. S.; TOKURA, L. K.; SUTIL, E. L.; VILLA, B. ; ALOVISI, A. M. T.; CAON, I. L.; MERCANTE, E.; COELHO, S. R. M. Analysis of the Production Chain of Bean Culture in Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 7, p. 256–267, 2019.

HE, W.; WEI, C. Progress in C-type starches from different plant sources. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 162–175, 2017.

HOOVER, R.; HUGHES, T.; CHUNG, H. J.; LIU, Q. Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 399–413, 2010.

HOOVER, R.; RATNAYAKE, W. S. Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil, navy bean and pinto bean cultivars grown in Canada. **Food Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 489–498, 2002.

JEONG, D.; HAN, J.; LIU, Q.; CHUNG, H. Food Hydrocolloids Effect of processing, storage, and modification on *in vitro* starch digestion characteristics of food legumes: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 90, n. December 2018, p. 367–376, 2019.

KATO, L. S.; DE NADAI FERNANDES, E. A.; BACCHI, M. A.; SARRIÉS, G. A.; REYES, A. E. L. Elemental characterization of Brazilian beans using neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 306, n. 3, p. 701–706, 2015.

LIMA, K. O.; BIDUSKI, B.; SILVA, W. M. F. DA; FERREIRA, S. M.; MONTENEGRO, L. M. P.; DIAS, A. R. G.; BIANCHINI, D. Incorporation of tetraethylorthosilicate (TEOS) in biodegradable films based on bean starch (*Phaseolus vulgaris*). **European Polymer Journal**, v. 89, n. September 2016, p. 162–173, 2017.

MA, M.; WANG, Y.; WANG, M.; JANE, J.; DU, S. Food Hydrocolloids Physicochemical properties and *in vitro* digestibility of legume starches. **Food hydrocolloids**, v. 63, p. 249–255, 2017.

MA, Z.; BOYE, J. I. Research advances on structural characterization of resistant starch and its structure-physiological function relationship: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** v. 8398, 2018.

MARQUEZI, M.; GERVIN, V. M.; WATANABE, L. B.; BASSINELLO, P. Z.; AMANTE, E. R. Physical and chemical properties of starch and flour from different common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, n. 0, 2016.

MIRANDA, J. A. T.; CARVALHO, L. M. J.; CASTRO, I. M.; CARVALHO, J. L. V.; GUIMARÃES, A. L. DE A.; VIEIRA, A. C. DE MA. Starch Granules from Cowpea, Black, and Carioca Beans in Raw and Cooked Forms. **Legume crops**, v. i, p. 13, 2019.

NARA, S.; KOMIYA, T. Studies on the Relationship Between Water-saturated State and Crystallinity by the Diffraction Method for Moistened Potato Starch. **Starch - Stärke**, v. 35, n. 12, p. 407–410, 1983.

OVANDO-MARTÍNEZ, M.; BELLO-PÉREZ, L. A.; WHITNEY, K.; OSORIO-DÍAZ, P.; SIMSEK, S. Starch characteristics of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in different localities. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 54–64, 2011.

RATNAYAKE, W. S.; HOOVER, R.; SHAHIDI, F.; PERERA, C.; JANE, J. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of starches from four field pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. **Food Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 189–202, 2001.

RUPOLLO, G.; VANIER, N. L.; DA ROSA ZAVAREZE, E.; DE OLIVEIRA, M.; PEREIRA, J. M.; PARAGINSKI, R. T.; DIAS, A. R. G.; ELIAS, M. C. Pasting, morphological, thermal and crystallinity properties of starch isolated from beans stored under different atmospheric conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1403–1409, 2011.

SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Resistant Starch — A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 1–17, 2006.

SCHOCH, T. J. Iodimetric determination of amylose. Potentiometric titration: Standard method. In: Whistler, R. L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. IV. Orlando: Academic Press, p. 157–160, 1964.

SILVA, E. M. M. DA; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. DE; TAKEITI, C. Y.; BERRIOS, J. DE J. Physical characteristics of extrudates from corn flour and dehulled carioca bean flour blend. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 620–626, 2014.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219–231, 2003.

SIQUEIRA, B. DOS S.; BASSINELLO, P. Z.; SANTOS, S. C.; MALGARESI, G.; FERRI, P. H.; RODRIGUEZ, A. G.; FERNANDES, K. F. Do enzymatic or non-enzymatic pathways drive the postharvest darkening phenomenon in carioca bean tegument? **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 593–600, 2016.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J. The effects of environmental conditions on the structural features and physico-chemical properties of starches. **Starch/ Stärke**, v. 53, n. 10, p. 513–519, 2001.

VANIER, N. L.; DE OLIVEIRA, J. P.; BRUNI, G. P.; EL HALAL, S. L. M.; VILLANOVA,

F. A.; ZAVAREZE, E. DA R.; DIAS, A. R. G.; BASSINELLO, P. Z. Characteristics of starch from different bean genotypes and its effect on biodegradable films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 3, p. 1207–1214, 2019.

WANI, I. A.; SOGI, D. S.; HAMDANI, A. M.; GANI, A.; BHAT, N. A.; SHAH, A. Isolation, composition, and physicochemical properties of starch from legumes: A review. **Starch/Stärke**, v. 68, n. 9–10, p. 834–845, 2016.

WOSIACKI, G.; CEREDA, M. Characterization of pinhão starch. Part I. Extraction and properties of the starch granules. **Starch-Stärke**, v. 37, n. 7, p. 224-227, 1985.

YAO, M.; TIAN, Y.; YANG, W.; HUANG, M.; ZHOU, S.; LIU, X. The multi-scale structure, thermal and digestion properties of mung bean starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 871–878, 2019

CAPITULO 4 - APLICAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNA DE FEIJÃO CARIOCA (*Phaseolus vulgaris* L.) PARA MELHORIA DE SUAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS

RESUMO

O estudo da proteína do feijão Carioca consistiu na aplicação de hidrólise enzimática a 6 e 9% de grau de hidrólise, por método do pH-stat, visando melhorar as características funcionais. A formação de frações proteicas de menor massa molar, comprovada por eletroforese em gel (SDS-Page), permitiu melhora no perfil de solubilidade, redução na hidrofobicidade, melhora nas propriedades de emulsificação (capacidade de emulsificação, atividade de emulsificação e estabilidade da emulsão), e nas propriedades de formação de espuma (capacidade de formação de espuma, taxa de líquido incorporado à espuma e taxa de drenagem de líquido). O estudo desses parâmetros das amostras hidrolisadas e amostras controle foi realizado em pH 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0. Comparando-se a proteína de feijão Carioca com a proteína de soja hidrolisadas foi possível demonstrar que os hidrolisados de feijão apresentaram características superiores aos hidrolisados de soja para os parâmetros: solubilidade, hidrofobicidade, capacidade de emulsificação e atividade emulsificante. Observou-se ainda que a proteína de feijão hidrolisada apresentou valores semelhantes aos de proteína hidrolisada de soja, quanto aos parâmetros de formação de espuma.

Palavras-chave: proteína hidrolisada, feijão envelhecido, capacidade de emulsificação, capacidade de formação de espuma

ABSTRACT

The study of *Carioca* bean protein aims to improve its functional characteristics by applying enzymatic hydrolysis at 6 and 9% of degree of hydrolysis using pH-stat method. The production of protein fractions of lower molar mass, evidenced by gel electrophoresis (SDS-Page), allowed an increase in the solubility profile, reduction in hydrophobicity, improvement in the emulsification properties (emulsification capacity, emulsification activity and emulsion stability), and in the foaming properties (foaming ability, liquid rate incorporated into the foam and liquid drainage rate). The study of these parameters of hydrolyzed samples and control samples was performed at pH 3.0, 5.0, 7.0 and 9.0. Comparing *Carioca* bean protein with

soybean protein, it was possible to demonstrate that bean hydrolysates presented higher characteristics than the soy hydrolysates for the parameters: solubility, hydrophobicity, emulsification capacity and emulsifying activity. It was also observed that hydrolyzed bean protein presented similar values to those of soy hydrolyzed protein to foam formation parameters.

Keywords: bean hydrolysate, aged bean, emulsification capacity, foaming capacity

4.1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) destaca-se como uma das mais importantes leguminosas cultivadas mundialmente. A safra nacional 2018/2019 produziu 3,12 milhões de toneladas, exclusivamente destinadas ao mercado interno (CONAB, 2019). O consumo de feijão situa-se em aproximadamente 9,0 kg *per capita* na América Latina, África e Sul da Ásia, maiores consumidores mundiais (AI et al., 2017), enquanto no Brasil o consumo encontra-se aproximadamente em 15 kg/hab/ano. Produzido apenas no Brasil, o feijão Carioca, caracterizado pelo tegumento marrom claro rajado, representa 60% do consumo total dessa leguminosa (CONAB, 2019).

Apesar das excelentes propriedades nutricionais, como alto teor de proteína, amido, fibras e minerais como ferro, zinco, potássio e magnésio e baixo teor de lipídios; e das recentes pesquisas elencando propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-hipertensivas e anticancerígenas (HALL; HILLEN; ROBINSON, 2017; HAYAT et al., 2014; SINGH et al., 2017), o alto tempo de preparo, a ocorrência de escurecimento pós-colheita e do fenômeno “*hard-to-cook*” (HTC), afetam o mercado para consumo direto. Feijão HTC apresenta grande rejeição pelo consumidor e tem causado expressivas perdas econômicas (ALMEIDA et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2016).

A obtenção das frações de feijão Carioca, como amido e proteína, podem ser propostas como alternativas para utilização do feijão HTC (BETANCUR-ANCONA et al., 2014; TAN; YING-YUAN; GAN, 2014; TOEWS; WANG, 2013; ZANELLA PINTO et al., 2019).

Concentrados e isolados proteicos usados como ingredientes em alimentos são, geralmente, derivados de leite e soja. Porém, por restrições de dieta e/ou preferência, como alergias, vegetarianismo ou preceitos religiosos (como Halal), proteínas provenientes de fontes alternativas têm sido estudadas (TOEWS; WANG, 2013).

Segundo Boyle et al. (2018), a demanda global por proteína para uso como ingrediente irá atingir 6,8 milhões de toneladas até 2025. Espera-se crescimento expressivo da oferta de proteína de outras fontes vegetais além da soja, como leguminosas, milho, aveia e arroz, especialmente por questões de alergenicidade. O autor cita ainda o interesse da indústria em substituir ingredientes químicos, como estabilizantes, por proteínas com características funcionais, para satisfazer um nicho de mercado que demanda por redução de insumos químicos em alimentos.

O fato de o feijão não ser transgênico (*GMO-free*) e não constar na “*big eight*”, lista das oito classes de alimentos com maior grau de alergenicidade (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010), torna ainda mais interessante e promissor o uso de sua proteína como ingrediente.

A utilização de proteína em alimentos depende das propriedades funcionais que elas apresentam, e que podem definir as características finais do produto. Entre as propriedades funcionais desejáveis em proteínas, destacam-se a solubilidade, capacidade de emulsificação, capacidade de formação de espuma, gelificação e capacidade de absorção de água e óleo (BRISHTI et al., 2017).

A hidrólise enzimática, umas das técnicas de modificação de proteínas, pode ser utilizada para gerar melhoria nas suas propriedades funcionais para atendimento às necessidades especiais da indústria (ADLER-NISSEN; SEJR OLSEN, 1979; BETANCUR-ANCONA et al., 2014; EVANGELHO et al., 2017). A hidrólise limitada a até 10% tem gerado hidrolisados proteicos com melhores características funcionais que a proteína original (WANI et al., 2015), contudo, hidrólise excessiva (acima de 20%), pode levar a formação de peptídeos causadores de gosto amargo (ADLER-NISSEN; SEJR OLSEN, 1979; LAMSAL et al., 2006).

O controle do grau de hidrólise (DH) durante o processo mostra-se necessário pelo fato de ser este o fator de maior influência nas propriedades do hidrolisado, em comparação aos demais parâmetros como concentração do substrato, dosagem de enzima e temperatura (ADLER-NISSEN; ERIKSEN; OLSEN, 1983).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho consiste em promover a hidrólise enzimática controlada da proteína de feijão Carioca HTC, e relacionar o grau de hidrólise às mudanças nas propriedades funcionais da proteína.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

Feijão Carioca (*Phaseolus vulgaris*) variedade Campos Gerais safra 2018, produzido em Carambeí, Paraná-BR (24° 52' 03'' S, 50° 16' 12'' W) foi utilizado para extração da proteína. A amostra de feijão, após limpeza para remoção de material estranho, foi estocada em condições ambiente (20 °C e 77% UR) por quatro meses antes da sua utilização.

Reagentes químicos Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) foram utilizados para as análises. EZ Faast kit adquirido da Phenomenex (Torrance, CA, USA) foi empregado para determinação de aminoácidos livres. Enzima Bromelina, 2.000 GDU/g (*gelatin digestion units*), extraída de *Ananas comosus* foi doada pela Bio-Cat (Troy, VA, USA).

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Extração da proteína

O feijão, macerado em água (1:10 p/v) por 8 h a 25 °C, teve o tegumento removido manualmente, foi seco a 45 °C em estufa com circulação de ar (Tecnal, Piracicaba, SP, BR), e posteriormente moído em moinho de rotor tipo ciclone (Fortinox Star FT 51, Piracicaba, SP, BR).

A extração da proteína foi realizada de acordo com Oseguera-Toledo, Gonzalez de Mejia e Amaya-Llano (2015) com modificações. A farinha de feijão foi adicionada de NaOH 0,005 mol/L a uma proporção de 1:10 (p/v) e o pH foi ajustado para 8,0. A mistura foi solubilizada a 25 °C por 1 h com agitação mecânica (IKA RW 20; IKA-Werke, Staufen, Alemanha). Após o tempo de extração, a solução foi centrifugada a 8.000 ×g por 10 min (Rotina 420R, Hettich, Kirchleugern, Alemanha) e o sobrenadante foi coletado. O precipitado foi re-extraído nas mesmas condições, e ambos os sobrenadantes foram combinados. A fração proteica foi precipitada a pH 4,5 pela adição de HCl 0,1 mol/L e centrifugada a 8.000 ×g por 10 min. A proteína foi seca em estufa com circulação de ar a 45 °C por 8h e mantida em dessecador.

4.2.2.2 Hidrólise enzimática da proteína

O método do pH-stat baseia-se no controle do pH, pela adição de uma base, visto que durante a hidrólise da ligação peptídica há a liberação de H^+ , causando acidificação do meio (ADLER-NISSEN, 1986). A adição de base permite um monitoramento em tempo real do grau de hidrólise (JUNG; MURPHY; JOHNSON, 2005).

A hidrólise da proteína de feijão Carioca (em solução 1:10 m/v) foi realizada em pH 7,0 a 55 °C, sob agitação, até ser atingido o grau de hidrólise (DH) de 6 e 9%, controlado pelo método do pH-stat (ADLER-NISSEN, 1986) a partir da equação (1). Enzima Bromelina 2000 GDU/g (Bio-Cat, Troy, VA, USA) foi adicionada a 0,5% (m/m) para DH de 6%, e a 1% (m/m) para DH de 9%, em relação à massa de proteína da amostra, em base seca.

$$DH = \frac{V_{NaOH} * N_{NaOH}}{\alpha * M_p * h_{tot}} * 100 \quad (1)$$

Onde V = volume de NaOH a ser utilizado, N = normalidade do NaOH (2N), α = grau de dissociação dos grupos α -amino, M_p = massa de proteína na amostra, em base seca e h_{tot} = meqv de ligações peptídicas no substrato, por grama de proteína. O valor α , calculado a partir do pK médio dos grupos-amino liberados durante a hidrólise, varia significativamente com a temperatura e pH do meio, mas apresenta variação desprezível em relação à amostra. Para as condições da hidrólise realizada nesse experimento, pH 7,0 e 55 °C, o valor α foi de 0,49. O valor h_{tot} , dependente da composição de aminoácidos da amostra, foi de 7,8 para a proteína de soja (ADLER-NISSEN, 1986), e calculado em 7,4 para a proteína de feijão Carioca, considerando-se a composição de aminoácidos relatada por Ribeiro et al. (2007).

As seguintes amostras foram preparadas: CBH-6 (proteína de feijão Carioca hidrolisada a 6%), CBC-6 (proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 6%), CBH-9 (proteína de feijão Carioca hidrolisada a 9%), CBC-9 (proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 9%), e CBRP (proteína de feijão Carioca crua). Para comparação das propriedades funcionais da proteína de feijão, foram hidrolisadas amostras de isolado proteico de soja contendo 88% de proteína: SBH-6 (proteína de soja hidrolisada a 6%), SBC-6 (proteína de soja controle da hidrólise a 6%), SBH-9 (proteína de soja hidrolisada a 9%), SBC-9 (proteína de soja controle da hidrólise a 9%), e SBRP (proteína de soja crua). As amostras controle foram submetidas às mesmas condições das amostras hidrolisadas, com exceção à adição de enzima, para se avaliar o impacto do pH e da temperatura no grau de hidrólise. As amostras cruas não foram submetidas à processo algum. Após o atingimento do DH desejado, as amostras foram imersas em banho

de gelo para inativação da enzima, congeladas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizadas. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

4.2.2.3 Eletroforese SDS-PAGE

Eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada utilizando-se tampão SDS-Tris-glicina com gel de resolução a 13% e gel de empilhamento a 4%, em sistema vertical Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) de acordo com Laemmli (1970) e Wu et al. (1999). As amostras foram diluídas (1 mg/mL) em tampão contendo Tris-SDS 125 mM pH 6,8; ureia 5,0 M; 20% de glicerol (v/v); 0,2% de SDS (v/v); 0,01% de azul de bromofenol (v/v) e 0,04% de mercaptoetanol (v/v). Após aquecimento a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min para desnaturação das proteínas, seguido de centrifugação, o sobrenadante contendo a fração proteica foi depositado no gel, para separação a 300 V por 1h. Marcador de massa molar entre 66 e 6,5 kDa (M3913, Sigma, St. Louis, MO, USA) foi utilizado como padrão. Imediatamente após a separação, os géis foram corados por 1h, com agitação branda, em Comassie Blue 0,22% em solução metanol:água:ácido acético (50:40:10) e em seguida descorados, por 8h, com a mesma solução metanólica, sem adição de Comassie Blue. Após secagem, os géis foram digitalizados em scanner Biotech (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA).

4.2.2.4 Aminoácidos livres

Aminoácidos livres, exceto arginina e cisteína, foram quantificados, em triplicata, por Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Espectrometria de Massas (GC-MS Agilent 5937, Palo Alto, CA, USA).

Aproximadamente 20 mg de amostra foi suspensa em 400 μL de ácido tricloroacético a 10%, adicionada de 100 μL de padrão interno Norvalina 0,2mM e homogeneizada em vórtex por 10 min. Após centrifugação por 10 min a $13.000 \times g$, em microcentrífuga Labnet 24D (Edison, NJ, USA), 200 μL de sobrenadante foi coletado para extração dos amino ácido livres em fase sólida e derivatização utilizando-se o kit EZ-Faast (Phenomenex KG0-7166, Torrance, CA, USA) (BADAUY; MORGAN; TURNER, 2008).

A amostra (2 μL) foi injetada em modo divisão de fluxo (split) na razão 1:15, em coluna Zebron (ZB-AAA, 10 m e 0,25 mm de diâmetro), programada para aquecimento de $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ até $320\text{ }^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de $30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Gás Hélio com fluxo de 1,1 mL/min foi usado como gás de

arraste. Os espectros de massa foram registrados com ionização por impacto de elétrons a 70 eV e intervalo de massa entre 45 e 450 m/z.

Além do padrão interno, o padrão de calibração SD1 do kit Ez-Faast, contendo 200 nmoles/mL de 23 aminoácidos, foi utilizado para quantificação dos resultados.

4.2.2.5 Solubilidade em água

Para determinação da solubilidade, suspensões de amostra a 1% (p/v) em água destilada foram preparadas. O pH das suspensões foi ajustado para 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0 com HCl 2 mol/L ou NaOH 2 mol/L, mantendo-se agitação em agitador magnético por 1 hora, para máxima solubilização. Após centrifugação a 10.000 $\times g$ por 10 minutos a 20 °C, o teor de proteína do sobrenadante foi determinado por método de Bradford, com leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O teor inicial de proteína de cada amostra foi determinado por método de combustão (varioMAX CN, Elementar, Hanau, Alemanha), utilizando-se 6,25 como fator de correção (RICKERT; JOHNSON; MURPHY, 2004).

4.2.2.6 Hidrofobicidade de superfície

A hidrofobicidade de superfície das amostras, analisada em pH 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0, foi determinada conforme Rickert, Johnson e Murphy (2004) com adaptações. O sobrenadante obtido da análise de solubilidade foi diluído em tampão fosfato 0,01 mol/L, ajustado para cada pH analisado, até se obter uma concentração máxima de 1.000 $\mu\text{g/mL}$. À cada amostra diluída (3mL) foi adicionado 40 μL de solução de ácido naftaleno-2-sufônico (ANS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 8 mmol/L em tampão fosfato 0,01 mol/L para o respectivo pH. A intensidade de fluorescência (FI) das amostras foi lida em espectrofotômetro para microplacas (Biotek, Winooski, VT, USA) a 365 nm (excitação) e 484 nm (emissão). Uma solução contendo 15 μL de ANS em 3 mL de álcool metílico padronizada para 800 FI foi utilizada como padrão. A hidrofobicidade de superfície foi obtida pela inclinação da reta do gráfico fluorescência x concentração da amostra.

4.2.2.7 Capacidade de emulsificação

As amostras foram preparadas a 2% (m/v) e ajustadas para pH 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0. Uma alíquota de 25 mL da suspensão foi emulsionada em mixer a 12.000 rpm (Bamix, Mettlen,

Switzerland) com óleo de soja adicionado constantemente, a uma taxa de 0,5 g/s. A adição de óleo foi interrompida quando ocorreu a inversão da fase óleo em água para a fase água em óleo. A quantidade de óleo usada foi determinada por diferença de peso e a capacidade de emulsificação (EC) foi expressa em g de óleo por g de proteína na amostra (JUNG; MURPHY; JOHNSON, 2005).

4.2.2.8 Atividade de emulsificação e estabilidade da emulsão

A atividade de emulsificação (EA) e a estabilidade da emulsão foram determinadas de acordo com metodologia de Pearce e Kinsella (1978). Uma suspensão da amostra a 2% (21 mL) foi misturada a 7 mL de óleo de soja em mixer a 12.000 rpm (Bamix, Mettlen, Switzerland) por 1 minuto. Após a mistura, 100 µL da emulsão foram diluídos em 4900 µL de dodecil sulfato de sódio 0,1%, e agitados em vórtex. A leitura da absorbância a 500 nm foi feita em 0, 15, 30, 45 e 60 minutos.

A atividade emulsificante foi determinada pela absorbância no tempo 0 (Abs₀). A inclinação da reta entre a absorbância a 0 e a 15 minutos (Δ_{0-15}) indica a velocidade na queda da estabilidade, e a absorbância a 60 minutos (Abs₆₀) indica a estabilidade final (ES) da amostra num determinado tempo (60 minutos). As determinações foram feitas em pH 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0.

4.2.2.9 Formação de espuma

As propriedades de formação de espuma, determinadas pela capacidade de formação de espuma, taxa de líquido incorporado à espuma e taxa específica de drenagem de líquido, foram estudadas de acordo com Jung, Murphy e Johnson (2005). Uma suspensão de 0,5% (m/v) de amostra foi preparada em pH 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0 e agitada até completa dispersão, por aproximadamente 1h. A suspensão (80 mL) foi colocada em uma coluna de vidro graduada com válvula de entrada de gás acoplada na parte inferior. Gás nitrogênio foi adicionado à suspensão a 100 mL/min, até que a mistura atingisse a marca de 300 mL no topo da coluna.

A capacidade de formação de espuma, expressa em mL/mL, foi determinada por intermédio da equação 2:

$$FC = V_f / (f_r \times t_f) \quad (2)$$

A taxa de líquido incorporado à espuma, expressa em mL/min, foi calculada pela equação 3:

$$v_i = \frac{V_{max}}{t_f} \quad (3)$$

A taxa específica de drenagem de líquido, usada para descrever a estabilidade da espuma, foi determinada pela equação 4:

$$K = \frac{1}{V_{max} \times t_{1/2}} \quad (4)$$

V_f corresponde ao volume fixo da coluna de vidro (300 mL); f_r ao fluxo de gás (100 mL/min); t_f ao tempo necessário para se atingir V_f ; V_{max} ao volume de líquido incorporado à espuma; $t_{1/2}$ ao tempo necessário para a drenagem de metade do líquido incorporado à espuma.

4.2.2.10 Análise estatística

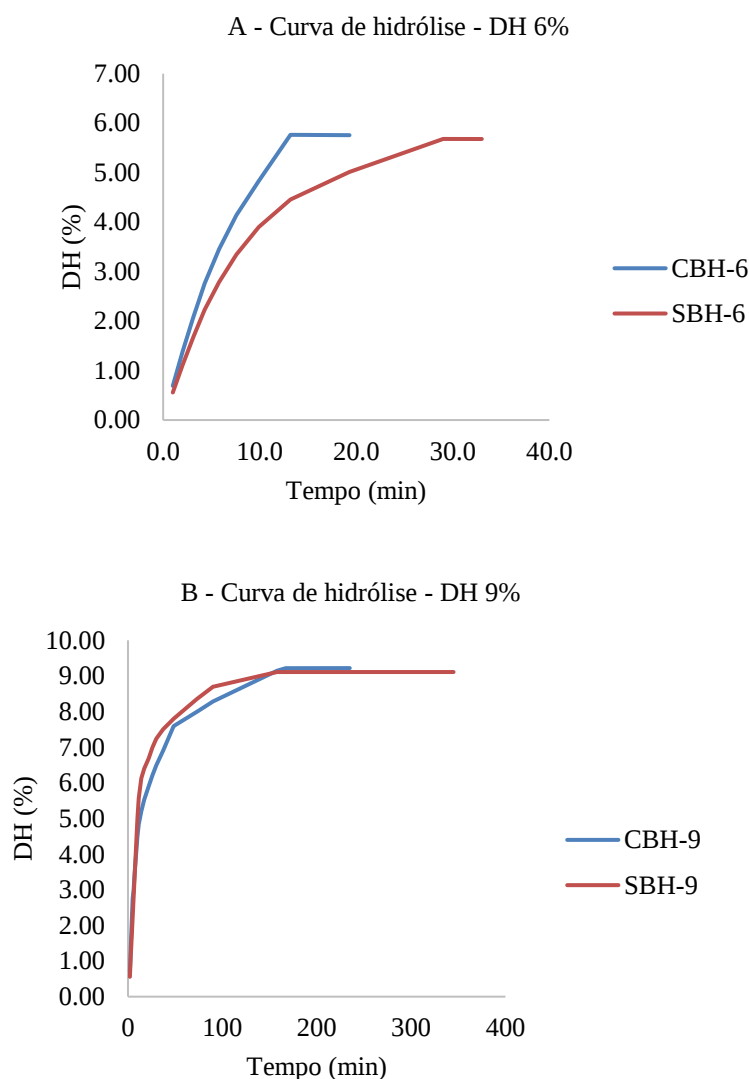
As análises foram realizadas em triplicata e os dados foram avaliados por Anova unifatorial. As diferenças significativas entre os tratamentos e entre os pHs estudados, a um nível de significância de 0,05%, foram determinadas por teste de Fisher, utilizando Software Statistica versão 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Curva de Hidrólise

A Figura 4.1 mostra a curva de hidrólise (média de três replicatas) da proteína de feijão Carioca (CBH) e da proteína de soja (SBH) até se atingir o grau de hidrólise desejado. A aplicação de hidrólise limitada a 6 e 9% visa comparar as propriedades funcionais da proteína de feijão Carioca quando submetidas a esse processo de modificação. Conforme citado por Wani et al. (2015), hidrolisados proteicos com DH até 10%, geralmente, apresentam melhores propriedades funcionais que a proteína original. Ao contrário, peptídeos de baixa massa molar (alto DH) não apresentam propriedades funcionais desejáveis, além de conferirem gosto amargo às preparações (LAMSAL et al., 2006).

Figura 4.1 Curva de hidrólise de proteína de feijão Carioca (CBH) e proteína de soja (SBH) com diferentes graus de hidrólise



Nota: CBH-6 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 6%, SBH-6 - proteína de soja hidrolisada a 6%, CBH-9 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 9%, SBH-9 - proteína de soja hidrolisada a 9%.

A hidrólise de proteínas ocorre numa fase inicialmente acelerada, seguida de uma diminuição na taxa de hidrólise e da estabilização em fase estacionária (BARAC et al., 2011; BETANCUR-ANCONA et al., 2014). Esse perfil foi observado nas hidrólises de proteína de feijão e de proteína de soja realizadas neste estudo. A Figura 4.1-A mostra que a hidrólise da proteína feijão Carioca ocorreu mais rapidamente que a de proteína de soja. A amostra CBH-6 atingiu 6% de hidrólise em 13,2 minutos, enquanto a amostra SBH-6 em 29 minutos, alcançando a estabilidade após esse tempo. Já para grau de hidrólise de 9% essa diferença não foi evidenciada. Ambas as amostras, CBH-9 e SBH-9 atingiram a hidrólise desejada em tempos similares, próximo a 160 minutos (Figura 4.1-B). Wani et al. (2015) promoveram hidrólise de

diferentes cultivares de feijão (*kidney bean*) com papaína e obtiveram graus de hidrólise entre 3,1 a 4,7% com 30 minutos, e 6,7 e 8,6% com 60 minutos de reação. Betancur-Ancona et al. (2014) relataram que hidrólise de feijão HTC com pancreatina por 15 minutos produziu hidrolisados com DH de 5%. Barac et al. (2011) produziram hidrolisados de ervilha a 4,7% de DH em 60 minutos. Lamsal et al. (2006) demonstraram que para proteína de soja, diferentes enzimas comerciais (bromelina- BR, *multifect neural*- MN e exopeptidase experimental C-EEC) apresentaram diferentes tempos de hidrólise para um DH de 4%, com bromelina sendo a mais eficaz.

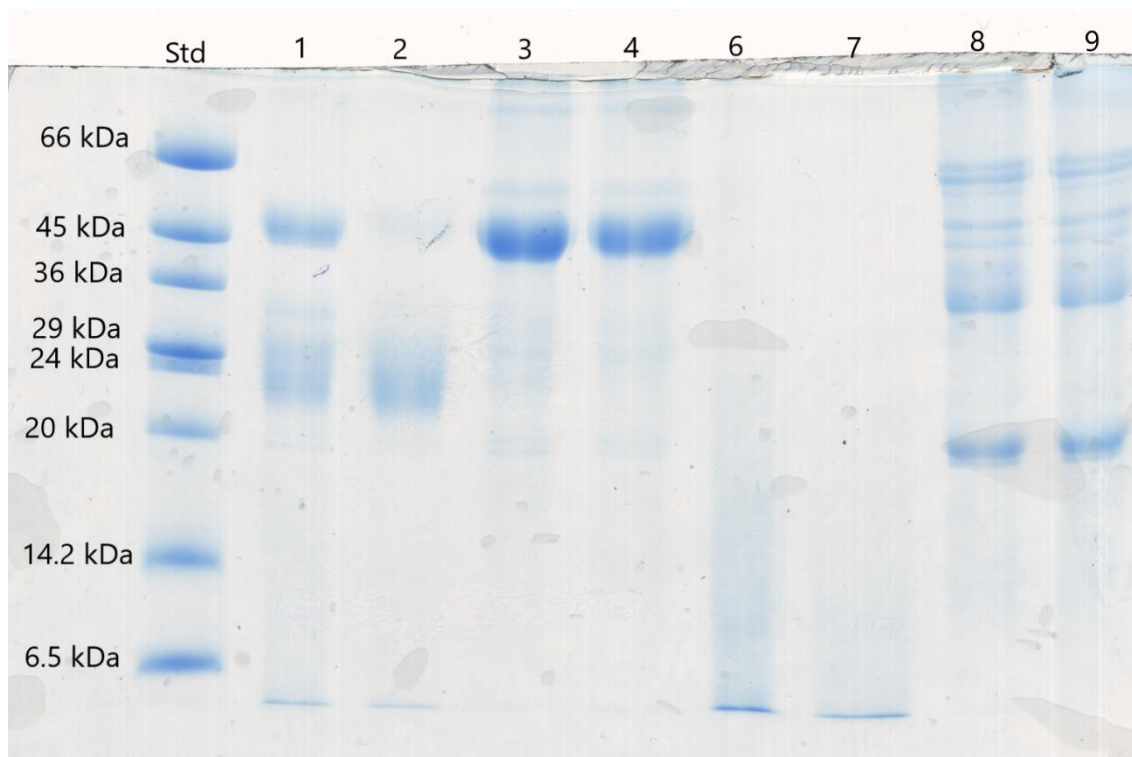
Esses trabalhos demonstraram o grande número de variáveis que podem influenciar a hidrólise enzimática de proteínas: composição de aminoácidos da amostra, temperatura e pH do meio, tipo e concentração de enzima, entre outros, o que torna difícil a reprodução da reação. Neste aspecto, o uso do grau de hidrólise como parâmetro de controle garante a produção de hidrolisados com características mais fiéis e reprodutíveis (ADLER-NISSEN; SEJR OLSEN, 1979).

4.3.2 Eletroforese SDS-PAGE

O perfil eletroforético das proteínas de feijão Carioca e de soja (Figura 4.2), comprovou que a hidrólise em diferentes níveis foi eficaz em produzir frações proteicas de menor massa molar que as respectivas amostras controle. As amostras CBC-6 e CBC-9 (colunas 3 e 4) e CBRP (dado não mostrado) apresentaram o mesmo perfil de proteínas, por não terem sido submetidas à ação enzimática. Nessas amostras fica evidente a presença de globulina 7S, nominada também como vicilina ou phaseolina, de massa molar 49 kDa, que representa a proteína de estocagem do feijão, presente na proporção de 30-50% (MOJICA; DE MEJÍA, 2015; MORALES-DE LEÓN et al., 2007).

Notou-se que a amostra CBH-6 (coluna 1) apresenta phaseolina em menor concentração que a respectiva amostra controle CBC-6 (coluna 3), mas em maior concentração que a amostra CBH-9, cuja hidrólise foi mais intensa. Observou-se em ambas as amostras hidrolisadas, CBH-6 e CBH-9, a presença de frações proteicas entre 36 kDa e 20 kDa, em maior concentração que nas respectivas amostras controle.

Figura 4.2 O perfil eletroforético das proteínas de feijão Carioca e soja hidrolisadas e controle



Nota: STD – Marcador de massa molar entre 66 e 6,5 kDa; 1 – amostra CBH-6 (proteína de feijão Carioca hidrolisada a 6%); 2 – CBH-9 (proteína de feijão Carioca hidrolisada a 9%); 3 - CBC-6 (proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 6%); 4 - CBC-9 (proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 9%); 6 - SBH-6 (proteína de soja hidrolisada a 6%); 7- SBH-9 (proteína de soja hidrolisada a 9%); 8 - SBC-6 (proteína de soja controle da hidrólise a 6%); 9 - SBC-9 (proteína de soja controle da hidrólise a 9%).

Morales-de León et al. (2007) e Rui et al. (2011) identificaram o grupo das fitohematoglutininas nas bandas de massa molar de 31, 26, 25 e 22 kDa, em feijão. Rui et al. (2011) confirmaram ainda phaseolina nas bandas 47, 25 e 21 kDa (tipo α , tipo β e tipo γ , respectivamente) e inibidor de α -amilase na banda de 27 kDa por espectroscopia de massas. Mojica e De Mejía (2015) identificaram phaseolina (entre 37 e 50 kDa), lectina (33 e 25 kDa), arcelina (29 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa), inibidor de α -amilase (massa molar entre 18 e 14 kDa) e inibidor de Bowman-Birk (abaixo de 10 kDa) em feijão Carioca. Lectinas, inibidores de tripsina, inibidores de α -amilase e arcelina são classificados como fatores anti-nutricionais, mas que podem ser inativados por processos como maceração e cozimento. Nas plantas, essas proteínas atuam no mecanismo de defesa relacionado à estresse biótico e abiótico (MOJICA; DE MEJÍA, 2015).

Quanto à hidrólise da proteína de soja, é possível observar que para ambos os DH aplicados (SBH-6 e SBH-9), houve formação de peptídeos de massa molar inferior às amostras

controle (SBC-6 e SBC-9). Devido aos peptídeos formados serem inferiores ao marcador ($< 6,5$ kDA) não foi possível identificá-los.

4.3.3 Aminoácidos Livres

O total de aminoácidos livres liberados pela hidrólise foi significativamente maior na amostra CBH-9 que na CBH-6, condizente com o grau de hidrólise aplicado. Ambas as amostras de feijão Carioca hidrolisadas apresentaram maior teor de aminoácidos livres do que as amostras controle (CHC-6, CHC-9 e CBRP) (Tabela 4.1). Todas as amostras de feijão Carioca apresentaram teor de aminoácidos livres superior às amostras de soja.

A eletroforese demonstrou não haver diferença no perfil de proteínas das amostras controle (CBC-6 e CBC-9) e da amostra crua (CBRP). Contudo, foi possível observar que a temperatura e o pH à que as amostras controle de proteína de feijão (CBC-6 e CBC-9) foram submetidas, causaram aumento significativo no teor de aminoácidos livres totais dessas amostras em relação à amostra crua (CBRP). Nas amostras de proteína de soja, contudo, o teor de aminoácidos livres totais nas amostras controle (SBC-6 e SBC-9) foram estatisticamente iguais ao valor encontrado para a amostra crua (SBRP), o que demonstra que a temperatura e o pH não tiveram influência nessas amostras, para a análise de aminoácidos livres.

Tabela 4.1 Teor de aminoácidos livres ($\mu\text{mol/g}$) das amostras de proteína de feijão Carioca e proteína de soja submetidas a diferentes graus de hidrólise

Proteína Feijão Carioca					
	CBH-6	CBH-9	CBC-6	CBC-9	CBRP
ALA	$3,796 \pm 0,508^b$	$5,997 \pm 0,732^a$	$2,867 \pm 0,367^c$	$2,928 \pm 0,397^c$	$1,282 \pm 0,122^d$
GLY	$2,088 \pm 0,504^b$	$3,405 \pm 0,761^a$	$0,630 \pm 0,139^c$	$0,686 \pm 0,104^c$	$0,283 \pm 0,056^c$
VAL	$4,172 \pm 0,163^b$	$5,063 \pm 0,328^a$	$3,797 \pm 0,076^b$	$4,019 \pm 0,077^b$	$1,642 \pm 0,337^c$
LEU	$14,172 \pm 0,546^b$	$23,388 \pm 0,738^a$	$9,173 \pm 0,125^c$	$9,684 \pm 0,329^c$	$3,838 \pm 0,606^c$
ILE	$2,476 \pm 0,289^{ab}$	$2,859 \pm 0,430^a$	$2,333 \pm 0,039^b$	$2,531 \pm 0,060^{ab}$	$0,971 \pm 0,206^c$
THR	$0,364 \pm 0,007^c$	$1,497 \pm 0,295^a$	$0,670 \pm 0,131^b$	$0,798 \pm 0,013^b$	$0,275 \pm 0,091^c$
SER	-	$0,488 \pm 0,112^a$	$0,064 \pm 0,006^b$	$0,076 \pm 0,004^b$	-
PRO	$3,759 \pm 0,210^a$	$3,674 \pm 0,303^a$	$3,569 \pm 0,298^a$	$3,569 \pm 0,159^a$	$1,604 \pm 0,312^b$
ASN	$1,766 \pm 0,147^b$	$2,235 \pm 0,383^a$	$1,804 \pm 0,273^{ab}$	$1,777 \pm 0,201^b$	$0,689 \pm 0,153^c$
ASP	$0,938 \pm 0,044^{bc}$	$1,307 \pm 0,130^a$	$0,880 \pm 0,041^c$	$1,034 \pm 0,094^b$	$0,372 \pm 0,062^d$
MET	$2,857 \pm 0,034^b$	$4,967 \pm 0,086^a$	$1,750 \pm 0,076^c$	$1,847 \pm 0,099^c$	$0,724 \pm 0,094^d$
GLU	$4,517 \pm 0,239^a$	$5,351 \pm 1039^a$	$4,525 \pm 0,273^a$	$4,396 \pm 0,857^a$	$1,688 \pm 0,366^b$
PHE	$11,443 \pm 1329^b$	$16,801 \pm 1432^a$	$8,966 \pm 0,575^c$	$9,835 \pm 1057^{bc}$	$3,636 \pm 0,653^d$
GLN	$0,074 \pm 0,020^c$	$0,466 \pm 0,038^a$	$0,147 \pm 0,077^b$	$0,128 \pm 0,014^{bc}$	$0,077 \pm 0,004^{bc}$
LYS	$8,380 \pm 1123^b$	$23,151 \pm 4091^a$	$3,295 \pm 0,530^c$	$3,793 \pm 0,887^c$	$1,034 \pm 0,232^c$
HIS	$0,912 \pm 0,099^b$	$2,025 \pm 0,442^a$	$0,686 \pm 0,168^b$	$0,671 \pm 0,031^b$	$0,196 \pm 0,018^c$
TYR	$7,478 \pm 0,339^b$	$10,316 \pm 1069^a$	$6,074 \pm 0,409^c$	$6,623 \pm 0,155^c$	$2,673 \pm 0,603^d$
TRP	$1,956 \pm 0,283^b$	$3,175 \pm 0,323^a$	$2,022 \pm 0,316^b$	$1,948 \pm 0,332^b$	$0,719 \pm 0,184^c$
TOTAL	$71,148 \pm 2204^b$	$116,165 \pm 7,902^a$	$53,984 \pm 1,129^c$	$56,343 \pm 2,804^c$	$21,703 \pm 3,778^d$
Proteína Soja					
	SBH-6	SBH-9	SBC-6	SBC-9	SBRP
ALA	$0,475 \pm 0,024^b$	$2,254 \pm 0,361^a$	$0,028 \pm 0,002^c$	$0,024 \pm 0,001^c$	$0,027 \pm 0,009^c$
GLY	$0,239 \pm 0,034^b$	$0,712 \pm 0,112^a$	$0,019 \pm 0,004^c$	$0,017 \pm 0,003^c$	$0,007 \pm 0,002^c$
VAL	$0,142 \pm 0,011^b$	$0,521 \pm 0,125^a$	$0,032 \pm 0,006^c$	$0,013 \pm 0,003^c$	$0,009 \pm 0,001^c$
LEU	$2183 \pm 0,128^b$	$7,432 \pm 1,507^a$	$0,071 \pm 0,003^c$	$0,072 \pm 0,004^c$	$0,066 \pm 0,003^c$
ILE	$0,096 \pm 0,059^b$	$0,368 \pm 0,048^a$	$0,012 \pm 0,004^c$	$0,011 \pm 0,004^c$	$0,011 \pm 0,005^c$
THR	-	$0,063 \pm 0,006$	-	-	-
SER	-	$0,182 \pm 0,015$	-	-	-
PRO	$0,151 \pm 0,047^b$	$0,170 \pm 0,022^a$	$0,048 \pm 0,005^c$	$0,044 \pm 0,003^c$	$0,060 \pm 0,024^c$
ASN	$0,104 \pm 0,032^b$	$0,351 \pm 0,037^a$	-	-	-
ASP	$0,071 \pm 0,023^b$	$0,152 \pm 0,007^a$	$0,036 \pm 0,006^c$	$0,022 \pm 0,007^c$	$0,020 \pm 0,001^c$
MET	$0,226 \pm 0,016^b$	$1275 \pm 0,414^a$	-	-	-
GLU	$0,083 \pm 0,019^b$	$0,189 \pm 0,054^a$	$0,017 \pm 0,004^c$	$0,023 \pm 0,009^c$	$0,018 \pm 0,004^c$
PHE	$1,263 \pm 0,060^b$	$5,037 \pm 1469^a$	$0,139 \pm 0,007^b$	$0,150 \pm 0,036^b$	$0,128 \pm 0,017^b$
GLN	$0,024 \pm 0,001^b$	$0,348 \pm 0,100^a$	-	-	-
LYS	$1,465 \pm 0,191^b$	$7,673 \pm 2688^a$	$0,030 \pm 0,004^b$	$0,021 \pm 0,003^b$	$0,011 \pm 0,003^b$
HIS	$0,192 \pm 0,037^b$	$0,742 \pm 0,279^a$	-	-	-
TYR	$0,753 \pm 0,095^b$	$3,005 \pm 0,954^a$	$0,056 \pm 0,010^b$	$0,046 \pm 0,010^b$	$0,033 \pm 0,012^b$
TRP	$0,175 \pm 0,035^b$	$0,746 \pm 0,029^a$	$0,128 \pm 0,018^c$	$0,101 \pm 0,017^{cd}$	$0,077 \pm 0,005^d$
TOTAL	$7,642 \pm 0,312^b$	$31,220 \pm 7,795^a$	$0,616 \pm 0,020^c$	$0,544 \pm 0,075^c$	$0,467 \pm 0,054^c$

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as amostras

CBH-6 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 6%, CBC-6 - proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 6%, CBH-9 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 9%, CBC-9 - proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 9%, CBRP - proteína de feijão Carioca crua, SBH-6 - proteína de soja hidrolisada a 6%, SBC-6 - proteína de soja controle da hidrólise a 6%, SBH-9 - proteína de soja hidrolisada a 9%, SBC-9 - proteína de soja controle da hidrólise a 9%, SBRP - proteína de soja crua.

Leucina (Leu), lisina (Lys), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), alanina (Ala) e valina (Val) foram os aminoácidos livres com maior teor nas amostras hidrolisadas de feijão. Phe, Tyr (aminoácidos aromáticos) e Leu, Ala, Val (aminoácidos alifáticos), por serem hidrofóbicos, podem ter influenciado as características de solubilidade e hidrofobicidade das proteínas hidrolisadas de feijão.

Fenilalanina livre pode ser associada a gosto amargo em hidrólises intensas. Lys, Tyr, Trp (Triptofano), Met (Metionina) e His (Histidina) têm sido destacados por seu poder antioxidantes (DAJANTA et al., 2011).

O teor de tirosina livre nas amostras de feijão hidrolisadas e controle foi superior ao da amostra crua (CBRP), o que explica o escurecimento acentuado (dados não mostrados) das primeiras em relação à última (SONG et al., 2016).

4.3.4 Solubilidade em Água

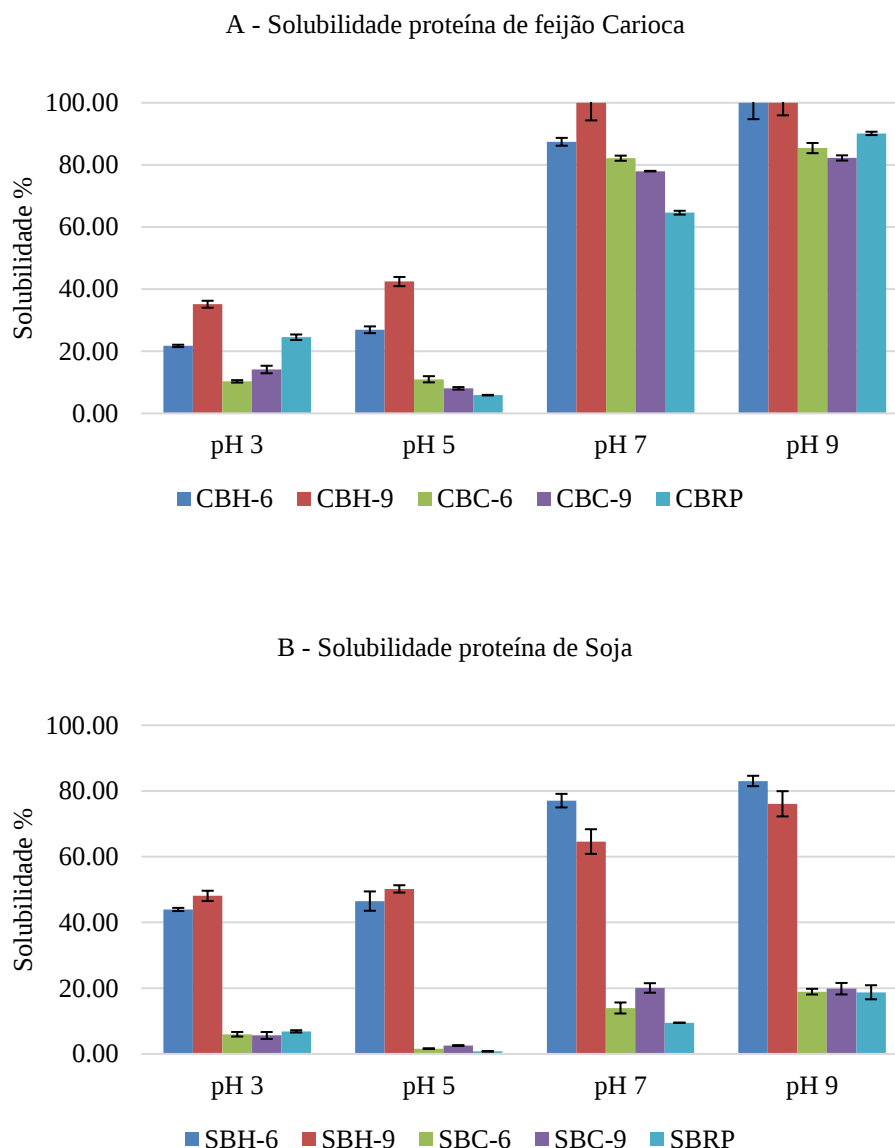
Dentre as diversas propriedades funcionais das proteínas, a solubilidade destaca-se como uma das mais importantes, devido à influência que exerce sobre as demais. Geralmente deseja-se que proteínas utilizadas como ingredientes funcionais tenham alta solubilidade, para que apresentem alta capacidade de formação de espuma, emulsificação, gelatinização entre outros (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010; VOJDANI, 1986).

A Figura 4.3 mostra a solubilidade das amostras em quatro valores de pH. Observou-se menor solubilidade entre pH 3,0 e 5,0, próximo ao ponto isoelétrico, e maior solubilidade em pH 9,0, tanto para as amostras de proteína de feijão Carioca quanto para as amostras de proteína de soja. Esse padrão é encontrado no estudo da solubilidade da maioria das proteínas (ADEBOWALE et al., 2007; RIBEIRO et al., 2009; TAN; YING-YUAN; GAN, 2014; VOJDANI, 1986). O ponto isoelétrico da maioria das leguminosas encontra-se entre pH 4,0 e pH 6,0, de acordo com Boye; Zare e Pletch (2010). A baixa solubilidade no ponto isoelétrico deve-se à ausência de carga elétrica, que diminui a repulsão eletrostática e reduz a interação entre a água e a proteína, levando à agregação das moléculas. Ao contrário, em extremos de pH, as proteínas apresentam carga positiva ou negativa, gerando maior repulsão eletrostática e maior hidratação dos resíduos de proteína, aumentando a solubilidade (TAN; YING-YUAN; GAN, 2014; VOJDANI, 1986).

Ambas as fontes de proteína apresentaram aumento na solubilidade após a hidrólise em todos os pHs estudados ($p < 0,05$). Contudo, observou-se pela Figura 4.3 que o aumento foi mais acentuado na proteína de soja que na proteína de feijão Carioca. Para a proteína de feijão Carioca, foi possível observar que houve influência do grau de hidrólise na solubilidade, em todos os pHs, já que CBH-9 apresentou maior solubilidade que CBH-6.

Os menores valores de solubilidade para proteína de feijão Carioca variaram entre 5,86% em pH 5,0 (CBRP) e 10,30% em pH 3,0 (CBC-6). A amostra CBH-6 apresentou valores entre 21,72% em pH 3,0 e 100% em pH 9,0. Para a amostra CBH-9 a solubilidade variou entre 35,13% em pH 3,0 e 100% em pH 7,0 e 9,0. Carbonaro et al. (1997) observaram valores de solubilidade mínimo de 35% em pH 4,0, e máximo de 80% acima de pH 7,0, para proteína isolada de feijão branco. Betancur-Ancona et al. (2014) relataram valores próximos a 20 e 40% em pH 5,0, para proteína de feijão preto com DH de 5,0% (pancreatina) e DH de 8,9% (Flavourzyme®) respectivamente.

Figura 4.3 Solubilidade das amostras de proteína de feijão Carioca e de proteína de soja



Nota - CBH-6 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 6%, CBC-6 - proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 6%, CBH-9 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 9%, CBC-9 - proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 9%, CBRP - proteína de feijão Carioca crua, SBH-6 - proteína de soja hidrolisada a 6%, SBC-6 - proteína de soja controle da hidrólise a 6%, SBH-9 - proteína de soja hidrolisada a 9%, SBC-9 - proteína de soja controle da hidrólise a 9%, SBRP - proteína de soja crua

O aumento na solubilidade de proteínas hidrolisadas tem sido confirmado por diversos autores, e atribuído à formação de peptídeos de menor massa molar durante a hidrólise (conforme demonstrado pela Figura 4.2); e à exposição de aminoácidos presentes no interior da molécula quando do desenovelamento das proteínas (BETANCUR-ANCONA et al., 2014; LAMSAL et al., 2006; WANI et al., 2015). A distribuição e proporção de aminoácidos

hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície da proteína tem papel essencial na solubilidade, devido à interação desses com a água. O aumento do número de grupos hidrofílicos leva a um acréscimo no índice de solubilidade (BRISHTI et al., 2017; VOJDANI, 1996).

4.3.5 Hidrofobicidade de Superfície

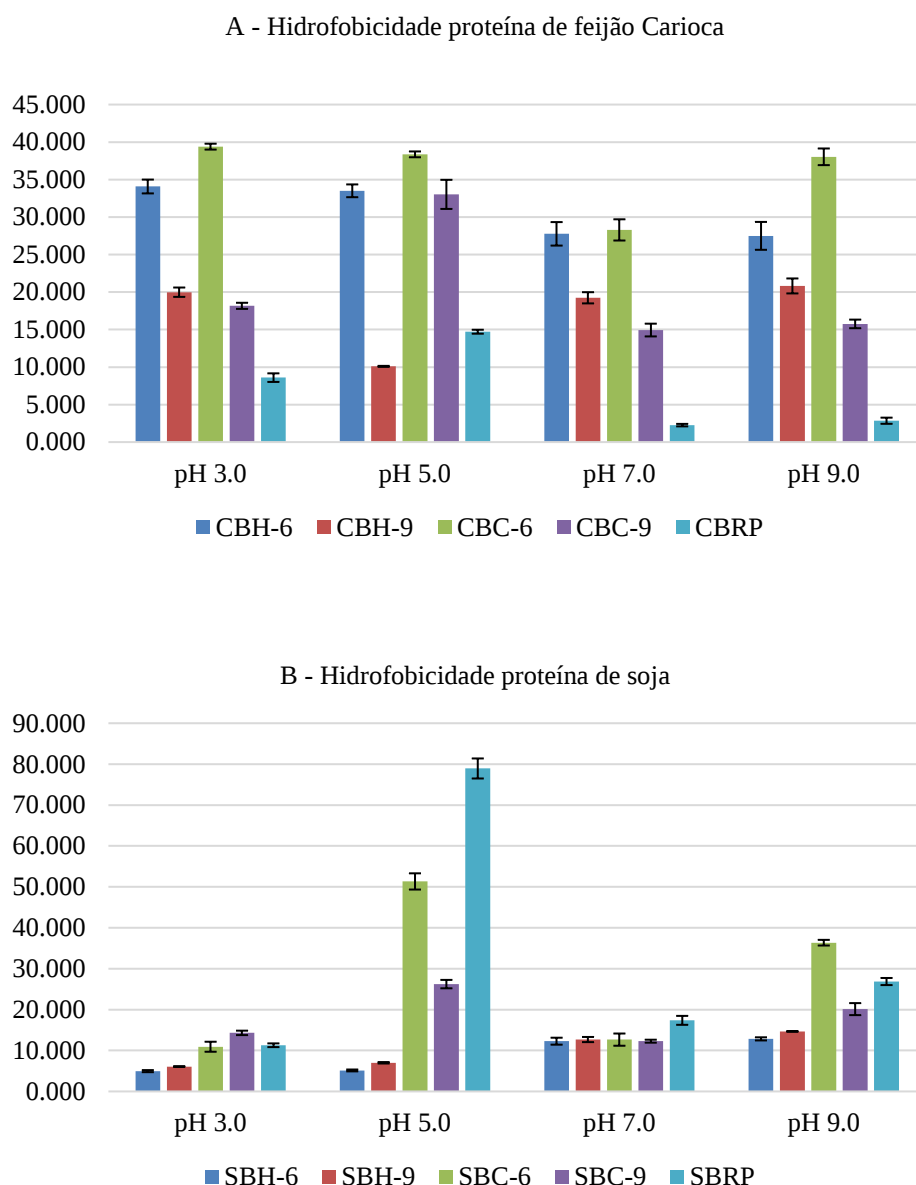
O estudo da hidrofobicidade dá uma indicação da perda da estrutura terciária das proteínas. ANS (ácido naftaleno-2-sufônico) liga-se aos grupos hidrofóbicos da superfície da proteína parcialmente desenovelada, aumentando a emissão de fluorescência quando comparado a emissão de ANS livre. Quanto maior o valor de intensidade de fluorescência relativa, maior a hidrofobicidade superficial das proteínas, um indicativo do grau de exposição dos aminoácidos aromáticos (TYR, TRP e PHE) (EVANGELHO et al., 2017).

De maneira geral as amostras hidrolisadas apresentaram hidrofobicidade menor que suas respectivas amostras controle. Ainda, CBH-9 apresentou menor hidrofobicidade que CBH-6 (Figura 4.4). Evangelho et al. (2017) relataram decréscimo na hidrofobicidade com o aumento do tempo de hidrólise em proteína de feijão preto. Jung; Murphy e Johnson (2005) afirmaram que o decréscimo na hidrofobicidade de superfície ocorre devido à clivagem das ligações hidrofóbicas remanescentes da superfície, que contribuiriam para o aumento da hidrofobicidade; ou devido ao aumento das interações proteína-proteína, levando a um rearranjo e aprisionamento dos grupos hidrofóbicos no interior dos agregados proteicos formados.

Para feijão Carioca verificou-se que a hidrofobicidade foi mais alta em pH 3,0 e 5,0, justamente os valores de pH onde a solubilidade foi mais baixa. Os maiores valores de hidrofobicidade para proteína de soja foram encontrados para as amostras SBC-6 e SBRP em pH 5,0.

Karaca; Low e Nickerson (2011) encontraram correlação negativa entre solubilidade de leguminosas e hidrofobicidade de superfície. Segundo Nakai (1983) quanto maior a solubilidade, menor a hidrofobicidade, visto que quanto maior o número de grupos hidrofílicos na superfície, maior a solubilidade e quanto maior o número de grupos hidrofóbicos na superfície, maior a hidrofobicidade (BRISHTI et al., 2017).

Figura 4.4 Hidrofobicidade de superfície de proteína de feijão Carioca e proteína de soja



Nota - CBH-6 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 6%, CBC-6 - proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 6%, CBH-9 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 9%, CBC-9 - proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 9%, CBRP - proteína de feijão Carioca crua, SBH-6 - proteína de soja hidrolisada a 6%, SBC-6 - proteína de soja controle da hidrólise a 6%, SBH-9 - proteína de soja hidrolisada a 9%, SBC-9 - proteína de soja controle da hidrólise a 9%, SBRP - proteína de soja crua

De maneira geral, as amostras de proteína de feijão Carioca apresentaram maior hidrofobicidade que as amostras de proteína de soja, indicando maior exposição dos aminoácidos hidrofóbicos decorrente de parcial modificação na estrutura terciária. Isso pode ser relacionado ao maior teor de Phe, Tyr e Trp livres nas amostras de feijão Carioca do que nas amostras de soja. Houve correlação significativa ($p < 0,05$) entre hidrofobicidade em pH 7,0 e 3,0 e os aminoácidos hidrofóbicos livres Phe, Tyr, Trp, Ala, Val e Leu.

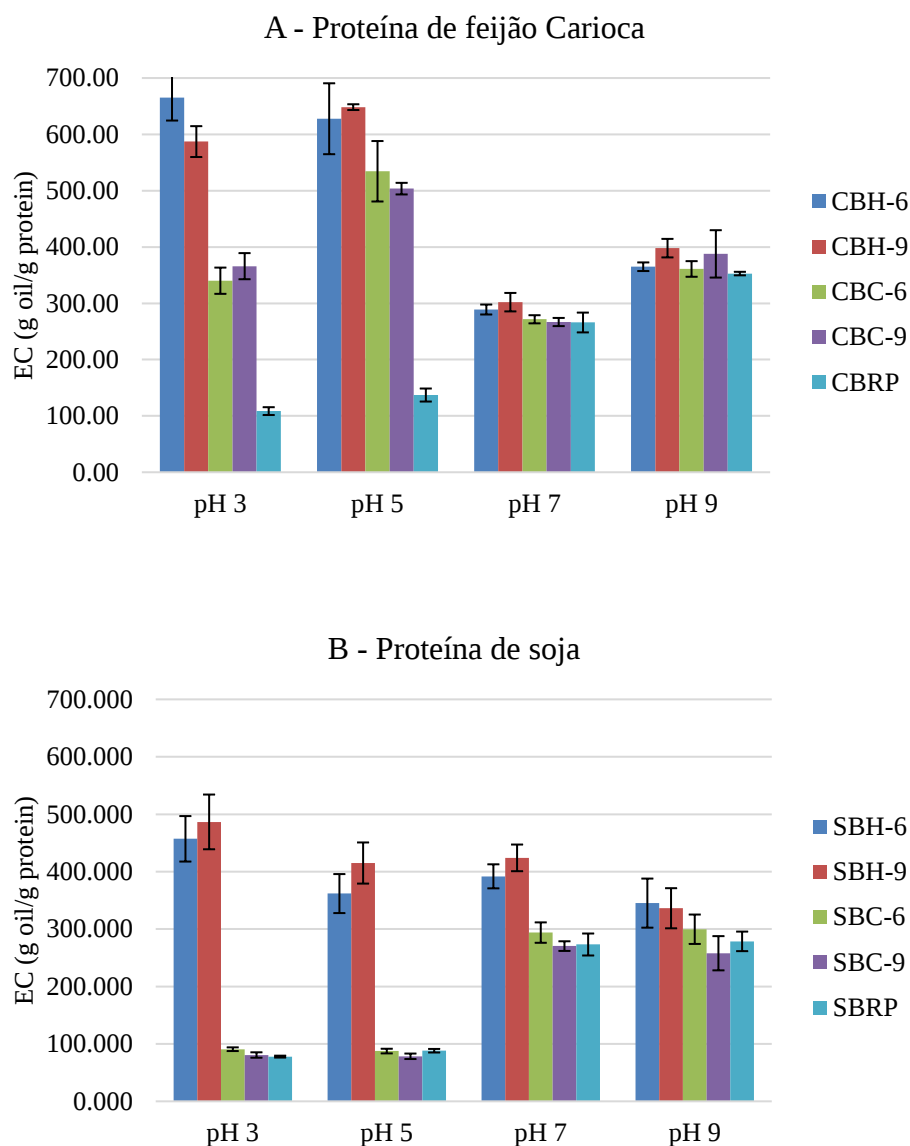
4.3.6 Capacidade de Emulsificação

De acordo com Pearce e Kinsella (1978) a capacidade de emulsificação (EC) representa a quantidade de óleo que pode ser emulsificada por uma quantidade padronizada de proteína, sob condições pré-determinadas. A natureza anfifílica, ou seja, a presença de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, permite que as proteínas sejam adsorvidas na interface entre óleo e água, e formem um filme ou uma camada ao redor das gotículas de óleo dispersos no meio aquoso, prevenindo coalescência ou sedimentação do sistema (MAZUMDAR; DURGALLA; GAUR, 2016; NAKAI, 1983).

A Figura 4.5 mostra os resultados da capacidade de emulsificação (EC) das amostras em função do pH analisado. Observou-se que as amostras de proteína de feijão Carioca hidrolisadas apresentaram maior EC que as amostras controle e crua em pH 3,0 e 5,0; contudo em pH 7,0 e 9,0 os valores de EC foram similares para todas as amostras. Comportamento semelhante foi apresentado pelas amostras de proteína de soja: em pH 3,0; 5,0 e 7,0 as amostras hidrolisadas apresentaram maior EC; em pH 9,0 todas as amostras apresentaram valores similares umas às outras. Vários autores relataram aumento na capacidade de emulsificação de proteínas hidrolisadas de diversas fontes, como soja (JUNG; MURPHY; JOHNSON, 2005), grão de bico (YUST et al., 2010), lentilha (AVRAMENKO; LOW; NICKERSON, 2013), feijão preto (BETANCUR-ANCONA et al., 2014).

Alta capacidade de emulsificação foi relacionada a alta hidrofobicidade de superfície, devido à exposição dos grupamentos hidrofóbicos que favorecem a interação proteína-óleo (JUNG; MURPHY; JOHNSON, 2005; NAKAI, 1983; YUST et al., 2010). As amostras CBH-6 em pH 3,0 e 5,0, apresentaram os maiores valores (iguais estatisticamente) para capacidade de emulsificação, de 665,48 e 627,72 g de óleo/g de proteína, respectivamente. Essas amostras também apresentaram o maior valor de hidrofobicidade de superfície entre as amostras hidrolisadas (Figura 4.4). Houve correlação estatística ($p < 0,05$) entre hidrofobicidade em pH 3,0 e EC em pH 5,0 ($r = 0,60$) e EC em pH 3,0 ($r = 0,37$).

Figura 4.5 Capacidade de emulsificação das amostras de proteína de feijão Carioca e proteína de soja



Nota - CBH-6 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 6%, CBC-6 - proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 6%, CBH-9 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 9%, CBC-9 - proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 9%, CBRP - proteína de feijão Carioca crua, SBH-6 - proteína de soja hidrolisada a 6%, SBC-6 - proteína de soja controle da hidrólise a 6%, SBH-9 - proteína de soja hidrolisada a 9%, SBC-9 - proteína de soja controle da hidrólise a 9%, SBRP - proteína de soja crua

As amostras hidrolisadas de proteína de feijão Carioca demonstraram maior capacidade de emulsificação que as amostras de proteína de soja, em pH 3,0; 5,0 e 9,0. Contudo, em pH 7,0, as amostras de proteína de soja hidrolisadas apresentaram melhor desempenho. Esse resultado demonstra ser possível a aplicação de proteína hidrolisada de feijão Carioca em substituição à proteína de soja, em produtos emulsionados como maioneses, molhos e sobremesas cremosas.

4.3.7 Atividade de Emulsificação e Estabilidade da Emulsão

A Tabela 4.2 mostra os resultados da atividade de emulsificação (EA), e da estabilidade da emulsão, determinados pela velocidade de queda da estabilidade (Δ_{0-15}) e pela estabilidade final (ES-60). A atividade de emulsificação indica a habilidade da proteína em formar e estabilizar uma emulsão devido à repulsão eletrostática criada na superfície das gotículas de óleo. Já a estabilidade da emulsão reflete a habilidade da proteína em formar e manter uma emulsão estável, por um determinado tempo, sem que ocorra a floculação ou coalescência dos glóbulos (SORIA-HERNÁNDEZ; SERNA-SALDÍVAR; CHUCK-HERNÁNDEZ, 2015).

Em todos os pH avaliados, verificou-se que as amostras hidrolisadas de ambas as fontes apresentaram maior EA que as respectivas amostras controle. Tanto para as amostras de proteína de feijão Carioca quanto para as de proteína de soja, o maior valor para EA foi evidenciado em pH 3,0 e 9,0.

Segundo Karaca; Low e Nickerson (2011) a estabilidade de uma emulsão depende de fatores intrínsecos à proteína: fonte, concentração, massa molar, solubilidade e propriedades hidrofílicas-hidrofóbicas da superfície; intrínsecos à gotícula de óleo em suspensão, como tamanho, distribuição e arranjo espacial; e fatores extrínsecos, como processamento (velocidade de mistura, tempo de cisalhamento) e condições ambientais (pH, temperatura, força iônica).

As amostras de proteína de soja hidrolisadas apresentaram menor velocidade de queda da estabilidade que as amostras controle correspondentes, em todos os pH analisados. Esse resultado, porém, não foi observado para todas as amostras hidrolisadas de proteína de feijão Carioca. Em pH 3,0 e 7,0, não houve diferença significativa entre as amostras de feijão; em pH 5,0, a amostra CBH-9 demonstrou menor Δ_{0-15} ; e em pH 9,0 ambas as amostras hidrolisadas, CBH-6 e CBH-9, apresentaram melhor comportamento quanto à queda na estabilidade.

Os resultados de ES-60 mostraram que a hidrólise foi eficaz em aumentar a estabilidade final. Observou-se que todas as amostras hidrolisadas de ambas as fontes apresentaram maior ES-60 que as respectivas amostras controle, e em pH 3,0 a estabilidade final foi maior que nos demais valores de pH.

Pode-se observar que as amostras de proteína de feijão Carioca apresentaram menor estabilidade de emulsão que as amostras de proteína de soja. Isso pode estar relacionado à baixa concentração de aminoácidos sulfurados no feijão. A hidrólise de proteína, ao expor os

grupamentos sulfidrilas na superfície da molécula, favorece a formação de ligações dissulfeto na interface óleo-água, aumentando a estabilidade da emulsão (LAM; NICKERSON, 2013).

Tabela 4.2 Atividade de Emulsificação (EA) e Estabilidade da Emulsão (Δ_{0-15} e ES-60) – valores relativos

Proteína de feijão Carioca												
Amostras	EA				Δ_{0-15}				ES-60			
	pH 3,0	pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0	pH 3,0	pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0	pH 3,0	pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0
CBH-6	0,827 ^{Ab}	0,611 ^{Ba}	0,609 ^{Ba}	0,634 ^{Bab}	-0,020	-0,021 ^c	-0,024	-0,025 ^b	0,514 ^{Ab}	0,285 ^{Ba}	0,196 ^{Cb}	0,225 ^{BCa}
CBH-9	0,925 ^{Aa}	0,488 ^{Cb}	0,630 ^{Ba}	0,597 ^{Bb}	-0,019 ^A	-0,009 ^{Ba}	-0,022 ^A	-0,022 ^{Aa}	0,632 ^{Aa}	0,337 ^{Ba}	0,254 ^{Ca}	0,227 ^{Ca}
CBC-6	0,717 ^{Ad}	0,458 ^{Bb}	0,494 ^{Bb}	0,669 ^{Aa}	-0,021 ^B	-0,015 ^{Cb}	-0,022 ^B	-0,029 ^{Ac}	0,361 ^{Ad}	0,202 ^{Bb}	0,127 ^{Cc}	0,183 ^{Bc}
CBC-9	0,783 ^{Ac}	0,318 ^{Dc}	0,525 ^{Cb}	0,634 ^{Bab}	-0,022 ^B	-0,011 ^{Ca}	-0,025 ^{AB}	-0,026 ^{Ab}	0,423 ^{Ac}	0,137 ^{Cc}	0,125 ^{Cc}	0,187 ^{Bbc}
CBRP	0,489 ^{Be}	0,177 ^{Cd}	0,483 ^{Bb}	0,662 ^{Aa}	-0,019 ^B	-0,009 ^{Ca}	-0,023 ^A	-0,026 ^{Ab}	0,168 ^{Be}	0,026 ^{Dd}	0,097 ^{Cc}	0,208 ^{Aab}

Proteína de Soja												
Amostras	EA				Δ_{0-15}				ES-60			
	pH 3,0	pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0	pH 3,0	pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0	pH 3,0	pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0
SBH-6	0,923 ^{Aa}	0,574 ^{Ca}	0,616 ^{Ca}	0,772 ^{Bb}	-0,009 ^{Ca}	-0,021 ^{Ba}	-0,024 ^{AB}	-0,027 ^{Aa}	0,723 ^{Aa}	0,227 ^{Ca}	0,207 ^{Da}	0,312 ^{Ba}
SBH-9	0,904 ^{Aa}	0,581 ^{Ca}	0,624 ^{Ca}	0,838 ^{Aa}	-0,018 ^{Cb}	-0,021 ^{BCa}	-0,025 ^{AB}	-0,027 ^{Aa}	0,579 ^{Ab}	0,218 ^{Ca}	0,205 ^{Ca}	0,322 ^{Ba}
SBC-6	0,576 ^{Bd}	0,482 ^{Cb}	0,441 ^{Cc}	0,718 ^{Ac}	-0,019 ^{Cbc}	-0,023 ^{Bab}	-0,024 ^B	-0,032 ^{Ab}	0,249 ^{Ad}	0,117 ^{Cb}	0,055 ^{Dc}	0,193 ^{Bc}
SBC-9	0,718 ^{Bb}	0,563 ^{Ca}	0,573 ^{Cab}	0,772 ^{Ab}	-0,022 ^{Cc}	-0,027 ^{ABc}	-0,026 ^{BC}	-0,031 ^{Ab}	0,320 ^{Ac}	0,123 ^{Bb}	0,115 ^{Bb}	0,264 ^{Ab}
SBRP	0,680 ^{Ac}	0,559 ^{Ba}	0,525 ^{Bbc}	0,669 ^{Ad}	-0,021 ^{Bbc}	-0,026 ^{ABbc}	-0,022 ^B	-0,028 ^{Aa}	0,300 ^{Ac}	0,139 ^{Cb}	0,138 ^{Cb}	0,207 ^{Bc}

Δ_{0-15} – Velocidade de queda da estabilidade; ES-60 – estabilidade da emulsão em 60 minutos.

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as amostras; letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os pH ($p < 0,05$).

CBH-6 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 6%, CBC-6 - proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 6%, CBH-9 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 9%, CBC-9 - proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 9%, CBRP - proteína de feijão Carioca crua, SBH-6 - proteína de soja hidrolisada a 6%, SBC-6 - proteína de soja controle da hidrólise a 6%, SBH-9 - proteína de soja hidrolisada a 9%, SBC-9 - proteína de soja controle da hidrólise a 9%, SBRP - proteína de soja crua

4.3.8 Formação de Espuma

Espumas são formadas quando as proteínas se desenovelam para formar uma camada interfacial que mantém bolhas de ar em suspensão e prevenir o colapso da estrutura. A formação de espuma tem grande importância na aplicação de proteínas em alimentos (mousses, merengues e coberturas tipo chantilly) e bebidas (cerveja) (MAZUMDAR; DURGALLA; GAUR, 2016).

A Tabela 4.3 traz os dados das propriedades de formação de espuma das amostras de proteínas de feijão Carioca e de proteína de soja, respectivamente. A capacidade de formação de espuma (FC) para feijão Carioca não apresentou diferença significativa entre as amostras hidrolisadas, controles e crua. Entre os pHs estudados, observou que FC foi maior em pH 9,0 para as amostras controle CBC-6 e CBC-9. As amostras hidrolisadas apresentaram valores similares de FC independente do pH. Já as amostras de proteína de soja não apresentaram diferença significativa em diferentes valores de pH. Entre as amostras de proteína de soja, as amostras hidrolisadas e controle a 6 e 9% de DH apresentaram valores significativamente superior à amostra de proteína de soja crua, em pH 5. Para os demais pH as amostras não apresentaram diferença significativa entre si. A capacidade de formação de espuma entre as amostras de feijão e soja foram similares, com exceção do pH 3,0, no qual as amostras de feijão Carioca apresentaram resultados menores que para soja.

Os valores obtidos para a taxa específica de drenagem de líquido (k) indicaram que as amostras de proteína de feijão Carioca e proteína de soja hidrolisadas são mais estáveis que as respectivas amostras não hidrolisadas, independente do pH do meio. Entre os pH avaliados, ficou demonstrado que, tanto as amostras de feijão quanto as de soja hidrolisadas, apresentaram maior estabilidade em pH 3,0 e 5,0. Esse resultado mostra-se interessante, visto que a maioria dos alimentos em que a formação de espuma faz-se necessária, situa-se nessa faixa de pH. Demonstrou-se, então, que a proteína de feijão hidrolisada, tanto a 6% quanto a 9% de DH, podem ser aplicadas para esse fim, inclusive em substituição à proteína de soja.

Tabela 4.3 Propriedades de formação de espuma das amostras de proteína de feijão Carioca e proteína de soja

Feijão Carioca												
Samples	FC (mL/mL)				Vi - 1/(mL x min)				k (mL/min)			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
CBH-6	1,141	1,272	1,368	1,269	30,426 ^a	32,302 ^a	32,774 ^a	26,453 ^a	0,002 ^{Bb}	0,003 ^{Bc}	0,006 ^{Ab}	0,007 ^{Accd}
CBH-9	1,134	1,331	1,469	1,346	30,253 ^a	35,481 ^a	29,027 ^a	29,651 ^a	0,002 ^{Cb}	0,004 ^{Cc}	0,011 ^{Ab}	0,005 ^{Bd}
CBC-6	1,111 ^B	1,077 ^B	1,214 ^A	1,273 ^A	7,898 ^{Bb}	6,242 ^{Bb}	8,489 ^{Bb}	13,101 ^{Ab}	0,022 ^{Ba}	0,038 ^{Aab}	0,043 ^{Aa}	0,013 ^{Bb}
CBC-9	1,099 ^C	1,195 ^B	1,226 ^B	1,343 ^A	8,135 ^{Bb}	13,338 ^{Ab}	9,878 ^{Bb}	14,138 ^{Ab}	0,021 ^{ABa}	0,015 ^{BCbc}	0,023 ^{Ab}	0,009 ^{Cc}
CBRP	1,090	1,131	1,206	1,250	8,457 ^b	8,267 ^b	5,664 ^b	9,814 ^b	0,028 ^a	0,048 ^a	0,056 ^a	0,017 ^a
Soja												
Samples	FC (mL/mL)				Vi - 1/(mL x min)				k (mL/min)			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
SBH-6	1,239	1,243 ^a	1,300	1,205	33,031 ^a	33,157 ^a	34,675 ^a	32,132 ^a	0,001 ^{Cb}	0,001 ^{Cc}	0,005 ^{Ab}	0,003 ^{Bbc}
SBH-9	1,228	1,222 ^a	1,213	1,215	32,744 ^a	32,597 ^a	32,347 ^a	32,388 ^a	0,001 ^{Cb}	0,001 ^{Cc}	0,004 ^{Ab}	0,003 ^{Bc}
SBC-6	1,208	1,193 ^a	1,274	1,311	12,077 ^b	8,354 ^c	10,602 ^b	18,141 ^b	0,011 ^{Bb}	0,032 ^{Ab}	0,015 ^{Ba}	0,007 ^{Ba}
SBC-9	1,208	1,185 ^a	1,162	1,257	13,597 ^b	16,885 ^b	13,862 ^b	20,614 ^b	0,007 ^{Ab}	0,008 ^{Abc}	0,006 ^{ABb}	0,004 ^{Bb}
SBRP	1,196	1,016 ^b	1,199	1,224	9,798 ^{BCb}	5,267 ^{Cc}	14,401 ^{ABb}	20,293 ^{Ab}	0,029 ^{Ba}	0,089 ^{Aa}	0,005 ^{Bb}	0,003 ^{Bbc}

FC – Capacidade de formação de espuma, Vi - taxa de líquido incorporado à espuma, k - taxa específica de drenagem de líquido.

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as amostras; letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os pH ($p < 0,05$).

CBH-6 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 6%, CBC-6 - proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 6%, CBH-9 - proteína de feijão Carioca hidrolisada a 9%, CBC-9 - proteína de feijão Carioca controle da hidrólise a 9%, CBRP - proteína de feijão Carioca crua, SBH-6 - proteína de soja hidrolisada a 6%, SBC-6 - proteína de soja controle da hidrólise a 6%, SBH-9 - proteína de soja hidrolisada a 9%, SBC-9 - proteína de soja controle da hidrólise a 9%, SBRP - proteína de soja crua

Outro parâmetro avaliado foi a taxa de líquido incorporado à espuma (V_i). Observou-se que, em todos os pH, a hidrólise das amostras de feijão e soja resultou na maior incorporação de líquido. Analisando-se essa característica em conjunto com FC e k pode-se afirmar que as amostras hidrolisadas de proteína de feijão Carioca podem ser utilizadas quando se deseja obter espumas mais expandidas, mas com alta estabilidade, como em mousses e sobremesas aeradas, e bebidas como cerveja.

De acordo com Boye, Zare e Pletch (2010) alta solubilidade está geralmente associada à boa capacidade de formação de espuma e propriedades de emulsificação. Em nosso estudo, foi observado correlação significativa ($p < 0,05$) positiva entre volume de líquido incorporado à espuma (V_i) em todos os valores de pH, e solubilidade em pH 3,0 ($r > 0,69$) e 5,0 ($r > 0,81$). Mesmo com capacidade de formação de espuma significativamente iguais, isso demonstra que, em pH 3,0 e 5,0, quanto maior a solubilidade das amostras, maior o volume de líquido incorporado.

Lamsal et al. (2006) observaram melhoria nas propriedades de espuma em amostras de proteína de soja hidrolisadas com bromelina. Segundo esses autores, as características de espuma estão relacionadas às cargas ativas da superfície das proteínas, que também influenciam na solubilidade, e aos peptídeos de menor massa molar formados após a hidrólise. Para que as bolhas de ar sejam aprisionadas no processo de formação da espuma, idealmente, as proteínas devem ter habilidade de migrar rapidamente para a interface ar/líquido, adsorvendo na superfície, e formando um filme. Entre os fatores que influenciam a habilidade da proteína em interagir com as bolhas de ar formadas estão tamanho, forma, conformação da superfície (TOEWS; WANG, 2013).

4.4 CONCLUSÃO

A hidrólise enzimática de proteína de feijão Carioca HTC mostrou-se viável do ponto de vista técnico, para melhorar as características funcionais dessa matéria-prima. A eletroforese mostrou que a hidrólise de proteína de feijão Carioca a 9% foi mais eficaz que a hidrólise a 6% na clivagem da phaseolina. A formação de peptídeos de menor massa molar foi responsável pela maior solubilidade e menor hidrofobicidade da amostra CBH-9 em relação a CBH-6. A temperatura e pH à que as amostras controle de feijão Carioca foram submetidas não causaram alteração do perfil eletroforético dessas proteínas, mas causaram incremento no teor de aminoácidos livres. As amostras hidrolisadas de proteína de feijão Carioca demonstraram igual ou melhor desempenho que as amostras de proteína de soja em relação à capacidade de

emulsificação e capacidade de formação de espuma. Houve diferença nas características funcionais das amostras em relação aos valores de pH estudados, contudo, de maneira geral, observou-se melhores resultados em pH 3,0 e 5,0. Esses resultados indicam que a aplicação de hidrólise enzimática de proteína de feijão Carioca pode ser uma alternativa para o melhor aproveitamento de feijão HTC, e que a proteína hidrolisada de feijão Carioca pode ser utilizada como emulsificante ou agente de formação de espuma em substituição à proteína de soja.

REFERÊNCIAS

- ADEBOWALE, Y. A.; ADEYEMI, I. A.; OSHODI, A. A.; NIRANJAN, K. Isolation, fractionation and characterisation of proteins from *Mucuna bean*. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 287–299, 2007.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. Londres: Elsevier, 1986, 427 p.
- ADLER-NISSEN, J.; ERIKSEN, S.; OLSEN, H. S. Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. **Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition**, p.411-423, 1983.
- ADLER-NISSEN, J.; SEJR OLSEN, H. The Influence of Peptide Chain Length on Taste and Functional Properties of Enzymatically Modified Soy Protein. **Funcionalidade and Protein Structure** p. 125-146, 1979.
- AI, Y.; JIN, Y.; KELLY, J. D.; NG, P. K. W. Composition, functional properties, starch digestibility, and cookie-baking performance of dry bean powders from 25 Michigan-grown varieties. **Cereal Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 400–408, 2017.
- ALMEIDA, A. J. B.; COELHO, S. R. M.; SCHOENINGER, V.; CHRIST, D. Chemical changes in bean grains during storage in controlled conditions. **Journal of Brazilian Association of Agricultural Engineering**, v. 37, n. 3, p. 529-540, 2017.
- AVRAMENKO, N. A.; LOW, N. H.; NICKERSON, M. T. The effects of limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and emulsifying properties of a lentil protein isolate. **Food Research International**, v. 51, p. 162-169, 2013.
- BADAWY, A. A. B.; MORGAN, C. J.; TURNER, J. A. Application of the Phenomenex EZ:faast™ amino acid analysis kit for rapid gas-chromatographic determination of concentrations of plasma tryptophan and its brain uptake competitors. **Amino Acids**, v. 34, p. 587-596, 2008.
- BARAC, M.; ČABRILO, S.; PEŠIĆ, M.; STANOJEVIĆ, S.; PAVLIĆEVIĆ, M.; MAĆEJ, O.; RISTIĆ, N. Functional Properties of Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolates Modified with Chymosin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 8372-8387, 2011.
- BETANCUR-ANCONA, D.; SOSA-ESPINOZA, T.; RUIZ-RUIZ, J.; SEGURA-CAMPOS, M.; CHEL-GUERRERO, L. Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 2–8, 2014.
- BOYE, J.; ZARE, F.; PLETCH, A. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 414–431, 2010.
- BOYLE, C.; HANSEN, L.; HINNENKAMP, C.; ISMAIL, B. P. Emerging Camelina Protein: Extraction, Modification, and Structural/Functional Characterization. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, n. 8, p. 1049–1062, 2018.

BRISHTI, F. H.; ZAREI, M.; MUHAMMAD, S. K. S.; ISMAIL-FITRY, M. R.; SHUKRI, R.; SAARI, N. Evaluation of the functional properties of mung bean protein isolate for development of textured vegetable protein. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 4, p. 1595–1605, 2017.

CARBONARO, M.; CAPPELLONI, M.; NICOLI, S.; LUCARINI, M.; CARNOVALE, E. Solubility-Digestibility Relationship of Legume Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3387–3394, 1997.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira - Grãos**, v. 6, n. 7, 2019

DAJANTA, K.; APICHARTSRANGKON, A.; CHUKEATIROTE, E.; FRAZIER, R. A. Free-amino acid profiles of thua nao, a Thai fermented soybean. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 342–347, 2011.

EVANGELHO, J. A. DO; VANIER, N. L.; PINTO, V. Z.; BERRIOS, J. J. DE; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. DA R. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food Chemistry**, v.214, p. 460-467, 2017.

HALL, C.; HILLEN, C.; ROBINSON, J. G. Composition, nutritional value, and health benefits of pulses. **Cereal Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 11–31, 2017.

HAYAT, I.; AHMAD, A.; MASUD, T.; AHMED, A.; BASHIR, S. Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An Overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 580–592, 2014.

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, 2005.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAM, R. S. H.; NICKERSON, M. T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure and function approach. **Food Chemistry**, v. 141, p. 975-984, 2013.

LAMSAL, B. .; REITMEIER, P. A.; MURPHY, P. A.; JOHNSON, L. A. Enzymatic Hydrolysis of Extruded-Expelled Soy Flour and Resulting Functional Properties. **JAOCs**, v. 83, n. 8, p. 731–737, 2006.

MAZUMDAR, S. D.; DURGALLA, P.; GAUR, P. M. Utilization of Pulses – Value Addition and Product Development. In: GURUNG, T. R.; BOKTHIAR, S. M. **Pulses for Sustainable Food and Nutrition Security in SAARC region**. Bangladesh: SAARC Agriculture Centre, 2016.

MOJICA, L.; DE MEJÍA, E. G. Characterization and Comparison of Protein and Peptide Profiles and their Biological Activities of Improved Common Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 2, p. 105–112, 2015.

MORALES-DE LEÓN, J. C.; VÁZQUEZ-MATA, N.; TORRES, N.; GIL-ZENTENO, L.; BRESSANI, R. Preparation and characterization of protein isolate from fresh and hardened beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, 2007.

NAKAI, S. Structure-Function Relationships of Food Proteins with an Emphasis on the Importance of Protein Hydrophobicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 676–683, 1983.

OSEGUERA-TOLEDO, M. E.; GONZALEZ DE MEJIA, E.; AMAYA-LLANO, S. L. Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. **Food Research International**, v. 76, p. 839–851, 2015.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 716–723, 1978.

RIBEIRO, H. J. S. DE S.; PRUDENCIO, S. H.; MIYAGUI, D. T.; RIBEIRO, E. L. DE A. Caracterização de concentrado proteico de feijão comum preto, cultivar Iapar 44, novo e envelhecido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 571–580, 2009.

RIBEIRO, N. D.; LONDERO, P. M. G.; CARGNELUTTI FILHO, A.; JOST, E.; POERSCH, N. L.; MALLMANN, C. A. Composição de aminoácidos de cultivares de feijão e aplicações para o melhoramento genético. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n. 10, p.1393-1399, 2007.

RICKERT, D. A.; JOHNSON, L. A.; MURPHY, P. A. Improved Fractionation of Glycinin and β -Conglycinin and Partitioning of Phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1726–1734, 2004.

RUI, X.; BOYE, J. I.; 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.

SINGH, B.; SINGH, J. P.; SHEVKANI, K.; SINGH, N.; KAUR, A. Bioactive constituents in pulses and their health benefits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 858–870, 2017.

SIQUEIRA, B. S.; BASSINELLO, P. Z.; MALGARESI, G.; PEREIRA, W. J.; FERNANDES, K. F. Analyses of technological and biochemical parameters related to the HTC phenomenon in carioca bean genotypes by the use of PCA. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 939–945, 2016.

SONG, J.; LIU, C.; LI, D.; GU, Z. Postharvest changes in physicochemical characteristics and free amino acids content of immature vegetable soya bean (*Glycine max* L.) grains. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 461–469, 2016.

SORIA-HERNÁNDEZ, C.; SERNA-SALDÍVAR, S.; CHUCK-HERNÁNDEZ, C. Physicochemical and functional properties of vegetable and cereal proteins as potential sources of novel food ingredients. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 269–277, 2015.

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

TOEWS, R.; WANG, N. Physicochemical and functional properties of protein concentrates from pulses. **Food Research International**, v. 52, n. 2, p. 445–451, 2013.

VOJDANI, F. Solubility. In: HALL, G. M. **Methods of testing protein functionality**. 1st edition. London; New York: Blackie Academy and Professional, 1996.

WANI, I. A.; SOGI, D. S.; SHIVHARE, U. S.; GILL, B. S. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. **Food Research International**, v. 76, p.11-18, 2015.

WU, S.; MURPHY, P. A.; JOHNSON, L. A.; FRATZKE, A. R.; REUBER, M. A. Pilot-plant fractionation of soybean glycinin and β -conglycinin. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 3, p. 285–293, 1999.

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. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1212–1217, 2010.

ZANELLA PINTO, V.; DEON, V. G.; MOOMAND, K.; VANIER, N. L.; PILATTI-RICCIO, D.; ZAVAREZE, E. R.; LIM, L. T.; DIAS, A. R. G. Characteristics of Modified Carioca Bean Starch upon Single and Dual Annealing , Heat-Moisture-Treatment , and Sonication. **Starch**, v. 1800173, p. 1–7, 2019.

CAPÍTULO 5 – EXTRACTION OPTIMIZATION OF PHENOLIC EXTRACTS FROM CARIOCA BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

ABSTRACT

There is a large consumption of beans in developing countries for their nutritional quality: high contents of complex carbohydrates, such as starch and fiber together with considerable amounts of protein. Recently, beans have also been reported as good sources of phenolic compounds. Studies upon phenolic compounds in Carioca beans are relevant because these pulses are consumed every day by millions of people, and can be associated with health-promoting activities. In this study, phenolic compounds of beans have been extracted using different extraction methods. As the results can be affected by several factors and there is no standardized methodology to extract phenolic from Carioca beans, this paper proposes the use of response surface methodology to optimize a phenolic compound extraction method. Three experiments were performed using acetone, methanol, or methanol–HCl (99:1) as solvents. For each solvent, a three-level Box–Behnken design was employed, using the sample-to-solvent ratio, temperature, and solvent concentration as factors. The response variables were total phenolic compounds (TPC); flavonoid contents (FC); and antioxidant capacity, determined by ABTS, DPPH, and FRAP assays. The optimized conditions for each solvent were compared to seven other extraction methods proposed in the literature. RP-HPLC-DAD was used to quantify the phenolics of each extract. The results were submitted to principal component analysis (PCA), which showed that the best extraction conditions for Carioca beans, among the ten methods compared, was 70% acetone at 25 °C and a 1:15 sample-to-solvent ratio. Kaempferol and chlorogenic acid were the main flavonoids and phenolic acids, respectively, found in Carioca beans.

Keywords: *Carioca* bean, Phenolic compounds, Solid-liquid extraction, Box-Behnken design, Principal component analysis

5.1 INTRODUCTION

Dry edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are pulses with high economic value in many countries around the world. Brazil is the third largest producer of beans worldwide, with an annual production in 2014 of 3.29 million tons (FAOSTAT, 2017) and annual consumption of approximately 16.0 kg *per capita*. Of that total consumption, 63% are *Carioca* beans (CONAB, 2017).

Beans are mainly consumed as a staple food in South America and Eastern and Southern Africa because they are cheap sources of protein for low-income populations (DÍAZ; CALDAS; BLAIR, 2010). As well as containing a high level of protein (up to 17%) beans have a high carbohydrate content (40 to 60%), which includes mainly starch and fiber, low fat levels (around 1.5%) and minerals such as potassium, magnesium, iron, and zinc (FAN et al., 2016; KAN et al., 2017; MARQUEZI et al., 2016). In recent years, beans have also been studied regarding the presence of bioactive compounds such as peptides, dietary fiber, resistant starch and phenolic compounds, among others (LOS et al., 2018). Phenolic compounds have been studied due to their relevant health-promoting activities such as antioxidant, anti-microbial, anti-diabetic, anti-inflammatory and anti-carcinogenic effects (DORIA et al., 2012; LUNA-VITAL et al., 2015; MOJICA et al., 2015).

Phenolic compounds are produced by the secondary metabolism of plants. The chemical structures of such compounds have at least one aromatic ring with one or more hydroxyl groups (ROCHA-GUZMÁN et al., 2007). The main phenolic compounds found in beans include flavonoids, anthocyanins, flavonols, flavanols, isoflavones, proanthocyanidins, and tannins, as well as a wide range of phenolic acids (GAN et al., 2016; LIN et al., 2008; RANILLA; GENOVESE; LAJOLO, 2009).

Studies designed to extract antioxidant compounds from different vegetable sources, such as cereals, legumes, fruits, pulses, oilseeds and nuts, using solid-liquid extractions with organic solvents, especially ethanol, methanol, and acetone have been reported (ARRUDA; PEREIRA; PASTORE, 2017; GAN et al., 2016; KHAZAEI et al., 2016; LIN et al., 2008). The extraction conditions for phenolic compounds in a food matrix vary according to the solvent system, temperature, time, pH, solvent-to-solid ratio, particle size and moisture content of the samples (BELWAL et al., 2016; CHANDRASEKARA et al., 2016; RAHMANIAN; JAFARI; GALANAKIS, 2014).

Because extraction can be affected by many variables, response surface methodology (RSM) can be a useful tool to optimize the process (ZIELINSKI; HAMINIUK; BETA, 2016).

Optimized is the term applied to describe an efficient process, in which the highest result is obtained with the best conditions of resources (SARFARAZI; JAFARI; RAJABZADEH, 2015). Besides optimization, RSM can be also used to develop and improve processes (YOLMEH; JAFARI, 2017). By applying RSM, multiple parameters and their interactions can be evaluated with a reduced number of assays, resulting in a less laborious task (SHARMA; SAXENA; RIAR, 2016).

The Box-Behnken design (BBD) is a spherical and rotating model of RSM that use a central and middle points on the edges of a cube overlapped on the sphere (ESPADA-BELLIDO et al., 2017). Ferreira et al. (2007) compared Box-Behnken design and others response surface designs and have demonstrated that BBD was more efficient than central composite design (CCD) for quadratic models. BBD has been used to optimize the extraction of bioactive and antioxidant compounds from different food matrices (ALBERTI et al., 2014; ESPADA-BELLIDO et al., 2017; GOMES et al., 2017; HAYTA; İŞÇİMEN, 2017; ZHANG; WANG, 2016).

The literature contains information about the extraction of phenolic compounds from beans, but there is no consensus about which is the most efficient solvent system. Furthermore, different species of dry beans have been studied concerning the profile of phenolic compounds; however, there are few published papers about *Carioca* beans. Thus, the aims of the present study were (i) to optimize a method to extract phenolic compounds from *Carioca* beans by RSM, and (ii) to determine the phenolic compounds present in *Carioca* beans using RP-HPLC-DAD.

5.2 MATERIALS AND METHODS

5.2.1 Materials

Carioca beans (*Phaseolus vulgaris*) of the 'IPR Campos Gerais' cultivar, which were harvested in 2016 in the city of Ponta Grossa, Paraná State, Brazil (24°52'03" S, 50°16'12" O; 1000 m altitude), were used as sample to all extractions methods. Ponta Grossa is a representative production area in Paraná State, South Brazil, which is the main producer of dry beans in the country. Additionally, *Carioca* is the most popular type of beans produced and consumed in Brazil (DEMIATE et al., 2016). The material was collected directly from one farm, inside a 50 ha production field. Sampling followed all the procedures defined internationally to assure representativeness. The adopted experimental design establishes the

repetition (replicates) in the central point. Folin–Ciocalteu reagent, trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetremethychroman-2-carboxylic acid), TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-s-triazine), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), and HPLC-grade standards of kaempferol, rutin, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, syringic acid, catechin, epicatechin, quercetin, and mircetin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetone, methanol, hydrochloric acid, formic acid, and acetonitrile were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). All the other reagents were of analytical grade. The aqueous solutions were prepared using ultra-pure water (Milli-Q, Millipore, São Paulo, SP, Brazil).

5.2.2 Methods

5.2.2.1 Extraction of phenolic compounds

The Carioca bean sample was collected just after harvest, selected, cleaned, and dried in a conventional oven (Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil) at 40 °C until 14% moisture. The sample was stored at room temperature (~ 20 °C) and protected from light inside sealed polyethylene bags. After the sample was quartered, it was ground in a mill (Fortinox, Piracicaba, SP, Brazil) to obtain a homogenous powder that passed through a 425- μ m screen. The extraction of phenolic compounds was performed with 1.0 g of powdered sample suspended in the solvent solution for 2 h. The samples were subsequently centrifuged at 2000 $\times$ g (CELM Combate, São Caetano do Sul, SP, Brazil) for 8 min at 20 °C; the supernatant was collected and immediately frozen at -18 °C until further analysis. Three sets of experiments were conducted using acetone, methanol, or methanol–HCl (99:1) as solvents. For each solvent, the optimization was performed following a Box–Behnken design (BOX; BEHNKEN, 1960), with 15 random experiments. The factors were sample-to-solvent ratio (X_1), temperature (X_2), and solvent concentration (X_3) at three levels, as shown in Table 5.1. The evaluated response variables were as follows: total phenolic contents (TPC), flavonoid contents (FC), and antioxidant activity measured by ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), and FRAP (ferric-reducing antioxidant power) assays.

5.2.2.2 Comparison of extraction methods

In order to establish an efficient method to extract the phenolic antioxidants from the Carioca beans, the optimized extraction conditions for each solvent (described in “Extraction of Phenolic Compounds”) were compared with those of other extraction methods proposed in the literature for other bean varieties. The extractions (shown in Table 5.3) were performed in triplicate for each method. The phenolics and flavonoids were analyzed by spectrometry and by RP-HPLC-DAD. The antioxidant activity was determined by ABTS, DPPH, and FRAP assays.

5.2.2.3 Determination of TPC and FC

The phenolic compound content was measured by a colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent (SINGLETON; ROSSI, 1965) in quadruplicate. The absorbance was measured using a microplate reader (Epoch microplate spectrophotometer, Synergy, BioTek, Winooski, VT, USA) at 725 nm. The results were compared to a calibration curve ($TPC = 0.0028 \times \text{absorbance}$; $R^2 = 0.9961$) and expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of beans.

The total flavonoid content was determined by an aluminum chloride assay, in accordance with Zhishen; Mengcheng and Wu (1999), in quadruplicate. The absorbance was measured at 510 nm and the results were expressed as milligrams of catechin equivalents per gram, compared to a calibration curve ($FC = 0.0013 \times \text{absorbance}$; $R^2 = 0.994$).

5.2.2.4 Antioxidant capacity

The total antioxidant capacity was determined *in vitro*, in quadruplicate, by DPPH, FRAP and ABTS assays. The DPPH assay was performed in accordance with Brand-Williams; Cuvelier and Bersset (1995), with minor modifications. The absorbance was determined at 517 nm. The results were compared to a trolox standard calibration curve, in the range of 30 to 300 $\mu\text{mol/L}$ ($y = 0.2876x - 6.5091$; $R^2 = 0.995$).

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) was determined as described by Benzie and Strain (1996), with minor changes. A calibration curve ($y = 0.0009x - 0.0468$; $R^2 = 0.9963$) was performed using different concentrations of Trolox (100-1000 $\mu\text{mol/L}$), and this was compared with the absorbance of the samples at 595 nm.

The ABTS assay was performed using the method described by Re et al. (1999), with slight modifications. The absorbance was measured at 734 nm and the results were compared to a calibration curve ($y = 0.2122x + 2.0256$; $R^2 = 0.9988$), using trolox as standard (50-500 $\mu\text{mol/L}$).

All the assays were performed using a microplate reader (Epoch microplate spectrophotometer, Synergy, BIOTEK, Winooski, VT, USA), and results were expressed as trolox equivalents (TE) per gram of beans ($\mu\text{mol TE/g}$).

5.2.2.5 RP-HPLC-DAD analysis

For the HPLC analysis, samples from each of the extraction methods described in Table 5.3 were filtered through a 0.45 μm nylon membrane (Waters, Milford, MA, USA). The analysis of individual phenolic compounds was performed using a 2695 Alliance chromatographic unit, which was linked to a PDA 2998 photodiode array detector, both from Waters (Milford, MA, USA). Separation was carried out using a Symmetry C_{18} (4.6 x 150 mm, 3.5 μm) column (Waters, Milford, MA, USA) at 20 °C. The mobile phase was composed of 0.1% formic acid w/v (solvent A), and 100% acetonitrile (solvent B). The following gradient was adopted: 3-15% B (0-30 min), 15-40% B (30-40 min), 40-75% B (40-45 min), followed by washing and re-conditioning the column at a flow rate of 1.0 mL/min. The total analysis time was 45 min and the analyses were performed in duplicate.

The detection of phenolic compounds was performed by comparing their spectra and retention times with those of the standards. Quantification was performed using a calibration curve of standards: kaempferol ($y = 46.559x - 3.870$), rutin ($y = 24.661x - 1.843$), *p*-coumaric acid ($y = 102.099x - 2.728$), chlorogenic acid ($y = 45.777x - 7.223$), caffeic acid ($y = 60.268x + 7.121$), and ferulic acid ($y = 87.072x - 5.570$). All the curves presented regression coefficients higher than 0.99, a limit of detection lower than 0.03 $\mu\text{g/mL}$ and a limit of quantification lower than 0.19 $\mu\text{g/mL}$.

5.2.2.6 Data analysis

All the results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The statistical analysis was performed using Statistica v. 13.3 software (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). Response surface methodology (RSM) was performed to model the extraction of phenolic

compounds. Principal component analysis (PCA) was performed to associate the responses with the extraction methods in a graphical representation (ZIELINSKI et al., 2014).

5.2.2.6.1- Data analysis of extraction of phenolic compounds using RSM

The modeling of the extraction of antioxidants from *Carioca* beans was performed using response surface methodology (RSM) together with multiple linear regression. For this purpose, the data obtained by Box-Behnken design (“Extraction of Phenolic Compounds”) was submitted a second-order polynomial model to fit the experimental data. The generalized model used in the RSM is expressed in Equation (1):

$$Y_n(x) = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

where Y_n is the predicted response (TPC, FRAP, DPPH, and ABTS); b_0 , b_i , b_{ii} , and b_{ij} are the regression coefficients for the linear, quadratic and interaction terms, respectively; and X_i , X_{ii} , and X_j are the independent variables (sample-to-solvent ratio, temperature and solvent concentration). The proposed models had their statistical significance examined by ANOVA. The terms that did not show significant difference were removed and were re-fitted to the significant parameters ($p < 0.05$) that were determined, and then the 3D-response surfaces were built. The goodness-of-fit of the models were evaluated by p (lack-of-fit), determination coefficient (R^2) and their adjusted R^2 . After the mathematical models were obtained, the multi-response optimization was performed, applying the desirability function in accordance with Derringer and Suich (1980). The desirability function is a multi-criteria methodology, that combine the desirable value of each response to give overall desirability (d), by using geometric mean (YOLMEH; JAFARI, 2017). The optimized point from each RSM was submitted to an external validation following the same experimental procedure (“Extraction of Phenolic Compounds”), and the results were verified by prediction power at a level of 95% significance and by their absolute relative errors (%).

5.2.2.6.2 – Data analysis of comparison between methodologies

Aiming to evaluate the extraction methods optimized with methodologies proposed in the literature (“Comparison of Extraction Methods”), all extractions methods were compared by one-way ANOVA followed by Tukey HDS test. Furthermore, Pearson’s correlation was applied to check the linear correlations between the TPC, FC, antioxidant assays and RP-HPLC-DAD results.

PCA was applied to associate the results obtained for TPC, FC, ABTS, DPPH, FRAP, as well as the compounds determined by RP-HPLC-DAD, with the performed extraction methods. For such propose, each response was defined as columns ($n = 11$) and the extraction methods were adopted as rows ($n = 10$), making a total 110 data points. The data were projected by two principal components (PC1 and PC2), whose explained variance was determined by the eigenvalues >1 . Factor loadings applied to project the variables were those that presented values higher than 0.60. Before analysis the data were autoscaled as a pre-treatment.

5.3 RESULTS AND DISCUSSION

5.3.1 Extraction of Phenolic Compounds

Table 5.1 shows the modeling using response surface methodology (RSM), coupled with multiple linear regression, that was performed on the experimental data. RSM was used to determine the best conditions to perform an adequate extraction. Understanding the data obtained in terms of the mathematical model made it possible to describe the process (ZIELINSKI; HAMINIUK; BETA, 2016). In our study, three experiments were performed with different solvents (acetone, methanol, and methanol:HCl) for each proposed Box-Behnken design. The RSM models built for the dependent variables (TPC, ABTS, FRAP, and DPPH) had their significance and suitability evaluated by ANOVA. All the mathematical models were significant ($p < 0.01$), did not have lack-of-fit ($p > 0.05$), and could explain up to more than 85% of all variance in the data with adjusted $R^2 > 0.80$ (Table 5.2).

Table 5.1 RSM design experiments and the evaluated response variable: total phenolics compounds, flavonoids content and *in vitro* antioxidant assays from Carioca beans

Assay				RSM 1 - Acetone					RSM 2 - Methanol					RSM 3 – Methanol: HCl (99:1)				
	X ₁	X ₂	X ₃	TPC	FC	ABTS	DPPH	FRAP	TPC	FC	ABTS	DPPH	FRAP	TPC	FC	ABTS	DPPH	FRAP
1	-1	-1	0	3.00 ± 0.18	1.73 ± 0.15	20.49 ± 0.84	20.58 ± 0.77	16.78 ± 0.53	0.66 ± 0.05	0.48 ± 0.03	8.25 ± 0.36	3.81 ± 0.40	8.16 ± 0.53	1.05 ± 0.06	0.55 ± 0.03	5.29 ± 0.25	5.03 ± 0.50	10.34 ± 0.79
2	1	-1	0	2.75 ± 0.29	1.92 ± 0.17	20.07 ± 0.79	12.85 ± 0.65	20.99 ± 2.16	0.67 ± 0.04	0.53 ± 0.05	6.20 ± 0.58	4.73 ± 0.14	8.98 ± 0.76	1.57 ± 0.09	1.04 ± 0.09	6.53 ± 0.21	8.41 ± 0.33	13.81 ± 1.00
3	-1	1	0	2.33 ± 0.25	1.30 ± 0.08	17.41 ± 0.63	13.28 ± 0.93	18.53 ± 1.43	0.75 ± 0.05	0.44 ± 0.03	9.48 ± 0.54	4.34 ± 0.31	9.49 ± 0.61	1.32 ± 0.14	1.13 ± 0.10	7.28 ± 0.12	5.81 ± 0.30	14.76 ± 0.48
4	1	1	0	2.02 ± 0.20	2.41 ± 0.20	16.26 ± 0.53	11.03 ± 0.18	18.20 ± 1.70	0.95 ± 0.08	0.66 ± 0.05	10.59 ± 0.36	5.51 ± 0.46	11.38 ± 0.41	2.74 ± 0.14	1.48 ± 0.08	9.50 ± 0.39	11.71 ± 0.32	19.49 ± 1.22
5	-1	0	-1	2.84 ± 0.16	1.76 ± 0.02	20.54 ± 1.12	11.29 ± 0.65	12.37 ± 0.15	0.93 ± 0.05	0.53 ± 0.02	10.53 ± 0.22	4.42 ± 0.28	10.78 ± 0.78	1.26 ± 0.08	0.69 ± 0.06	6.61 ± 0.16	9.20 ± 0.66	14.49 ± 0.92
6	1	0	-1	2.92 ± 0.16	2.29 ± 0.13	21.89 ± 1.04	12.27 ± 0.44	19.60 ± 1.43	1.20 ± 0.11	0.79 ± 0.06	13.04 ± 0.39	6.16 ± 0.05	10.87 ± 0.58	1.60 ± 0.13	0.83 ± 0.03	7.17 ± 0.21	10.65 ± 0.25	17.28 ± 1.04
7	-1	0	1	1.99 ± 0.08	2.70 ± 0.25	10.03 ± 0.41	11.12 ± 0.76	11.50 ± 1.01	0.56 ± 0.03	0.82 ± 0.08	5.47 ± 0.43	4.05 ± 0.16	5.78 ± 0.44	1.21 ± 0.05	1.37 ± 0.10	3.33 ± 0.16	5.67 ± 0.08	8.40 ± 0.32
8	1	0	1	2.06 ± 0.22	1.51 ± 0.08	15.08 ± 0.81	10.83 ± 0.25	15.15 ± 1.54	0.78 ± 0.06	0.98 ± 0.02	7.15 ± 0.11	8.60 ± 0.80	7.28 ± 0.35	1.59 ± 0.03	1.61 ± 0.18	4.77 ± 0.29	10.03 ± 0.30	12.50 ± 1.06
9	0	-1	-1	2.17 ± 0.07	1.64 ± 0.11	17.93 ± 0.38	9.88 ± 0.33	10.60 ± 1.00	0.86 ± 0.04	0.66 ± 0.03	9.35 ± 0.38	4.37 ± 0.29	8.55 ± 0.25	1.21 ± 0.05	0.55 ± 0.05	5.73 ± 0.11	7.59 ± 0.22	13.21 ± 0.83
10	0	1	-1	2.63 ± 0.15	1.41 ± 0.14	24.86 ± 1.92	11.87 ± 0.30	10.37 ± 0.64	1.17 ± 0.04	0.70 ± 0.07	13.21 ± 0.46	8.76 ± 0.79	12.90 ± 0.68	1.73 ± 0.15	0.70 ± 0.05	9.04 ± 0.24	13.35 ± 0.72	16.86 ± 0.86
11	0	-1	1	1.98 ± 0.19	1.83 ± 0.15	12.74 ± 0.30	9.23 ± 0.17	10.60 ± 0.62	0.59 ± 0.04	0.73 ± 0.03	5.20 ± 0.46	7.51 ± 0.51	6.22 ± 0.25	1.34 ± 0.08	1.09 ± 0.07	3.55 ± 0.34	7.49 ± 0.27	10.30 ± 0.80
12	0	1	1	1.86 ± 0.05	2.55 ± 0.22	12.30 ± 0.20	8.77 ± 0.14	11.41 ± 0.87	0.73 ± 0.08	0.88 ± 0.07	8.02 ± 0.50	7.13 ± 0.43	8.34 ± 0.71	1.78 ± 0.11	1.52 ± 0.15	5.38 ± 0.36	8.80 ± 0.25	12.98 ± 0.78
13	0	0	0	5.46 ± 0.41	2.57 ± 0.24	35.88 ± 0.87	32.84 ± 0.77	36.78 ± 2.13	0.85 ± 0.08	0.64 ± 0.02	10.98 ± 0.32	5.60 ± 0.55	10.90 ± 0.27	1.52 ± 0.08	0.60 ± 0.02	7.24 ± 0.21	8.24 ± 0.27	15.78 ± 0.92
14	0	0	0	5.42 ± 0.28	2.73 ± 0.18	34.65 ± 1.12	32.62 ± 0.56	33.74 ± 2.96	0.84 ± 0.08	0.59 ± 0.05	9.02 ± 0.24	5.50 ± 0.08	10.69 ± 0.44	1.43 ± 0.03	0.67 ± 0.03	6.73 ± 0.32	7.77 ± 0.27	15.41 ± 0.71
15	0	0	0	5.30 ± 0.40	2.96 ± 0.24	36.04 ± 1.38	34.40 ± 0.60	34.50 ± 1.70	0.89 ± 0.03	0.66 ± 0.05	9.39 ± 0.15	5.55 ± 0.12	10.09 ± 0.47	1.46 ± 0.15	0.66 ± 0.03	6.56 ± 0.18	7.96 ± 0.45	15.13 ± 0.61

X₁: Sample:Solvent ratio (g/mL): -1 , 0 , 1: 1:10 , 1:15 , 1:20 - X₂ : Temperature (°C): -1, 0 , 1: 10 , 25 , 40 - X₃ : Solvent concentration (%): -1, 0 , 1: 50 , 70 , 90

Note: Results expressed as mean ± standard deviation. TPC (mg GAE/g): total phenolic compounds, FC (mg CE/g): flavonoids content, *in vitro* antioxidant activity by ABTS (μmol TE/g): 2,20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), DPPH (μmol TE/g): 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl, FRAP (μmol TE/g): ferric reducing antioxidant power.

Table 5.2 Effects of independent variables (sample:solvent ratio, temperature and solvent concentration) for dependent variables evaluated by RSM using acetone, methanol and methanol:HCl as solvent.

Factors \ Response variable	RSM 1 – Acetone				RSM 2 - Methanol				RSM 3 - Methanol:HCl			
	TPC	ABTS	DPPH	FRAP	TPC	ABTS	DPPH	FRAP	TPC	ABTS	DPPH	FRAP
Constant	2.380051	17.46726	11.91625	14.67559	0.829283	9.058891	5.76829	9.21251	1.541091	6.13863	8.68146	13.82185
X ₁	-	-	-	1.846473	0.086996	-	0.872188	-	0.382578	0.68126	1.88731	1.88656
X ₁ ²	0.642999	4.259179	4.35312	3.118346	-	-	0.525024	-	-	-	-	-
X ₂	-	-	-	-	0.104505	1.536087	0.551641	1.273893	0.299337	1.26284	1.39446	2.053242
X ₂ ²	0.788949	4.22304	5.074793	5.072271	-	-	-	-	-0.07672	-	-	-
X ₃	-0.3357	-4.38328	-	-	-0.18663	-2.53679	0.447862	-1.93565	-	-1.44013	-1.10083	-2.20792
X ₃ ²	0.826823	5.057902	6.602181	7.057935	-	-	-0.64809	-1.1137	-	0.6601	-0.6248	0.853198
X ₁ X ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	0.225374	-	-	-
X ₁ X ₂ ²	-	-	-	-	-	-	0.524731	-	-0.15273	-	-	-
X ₁ ² X ₂	-	-	-	-	-	-	0.336394	-	-	-	-	-
X ₁ X ₃	-	-	-	-	-	-	0.701248	-	-	-	-	-
X ₂ X ₃	-	-	-	-	-	-	-1.19156	-	-	-	-1.11261	-
R ²	0.9675	0.9481	0.9485	0.9766	0.8827	0.8476	0.9975	0.8522	0.9572	0.9503	0.9028	0.9442
adjusted R ²	0.9545	0.9273	0.9345	0.9672	0.8507	0.8222	0.9931	0.8119	0.9335	0.9304	0.8488	0.9219
P-value (model)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
P-value (lack of fit)	0.066	0.086	0.130	0.552	0.098	0.612	0.081	0.181	0.150	0.409	0.056	0.122

X₁: Sample:Solvent ratio; X₂: Temperature ; X₃: Solvent concentration

Note: TPC: total phenolic compounds; ABTS: 2,20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); DPPH: 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl; FRAP: ferric reducing antioxidant power

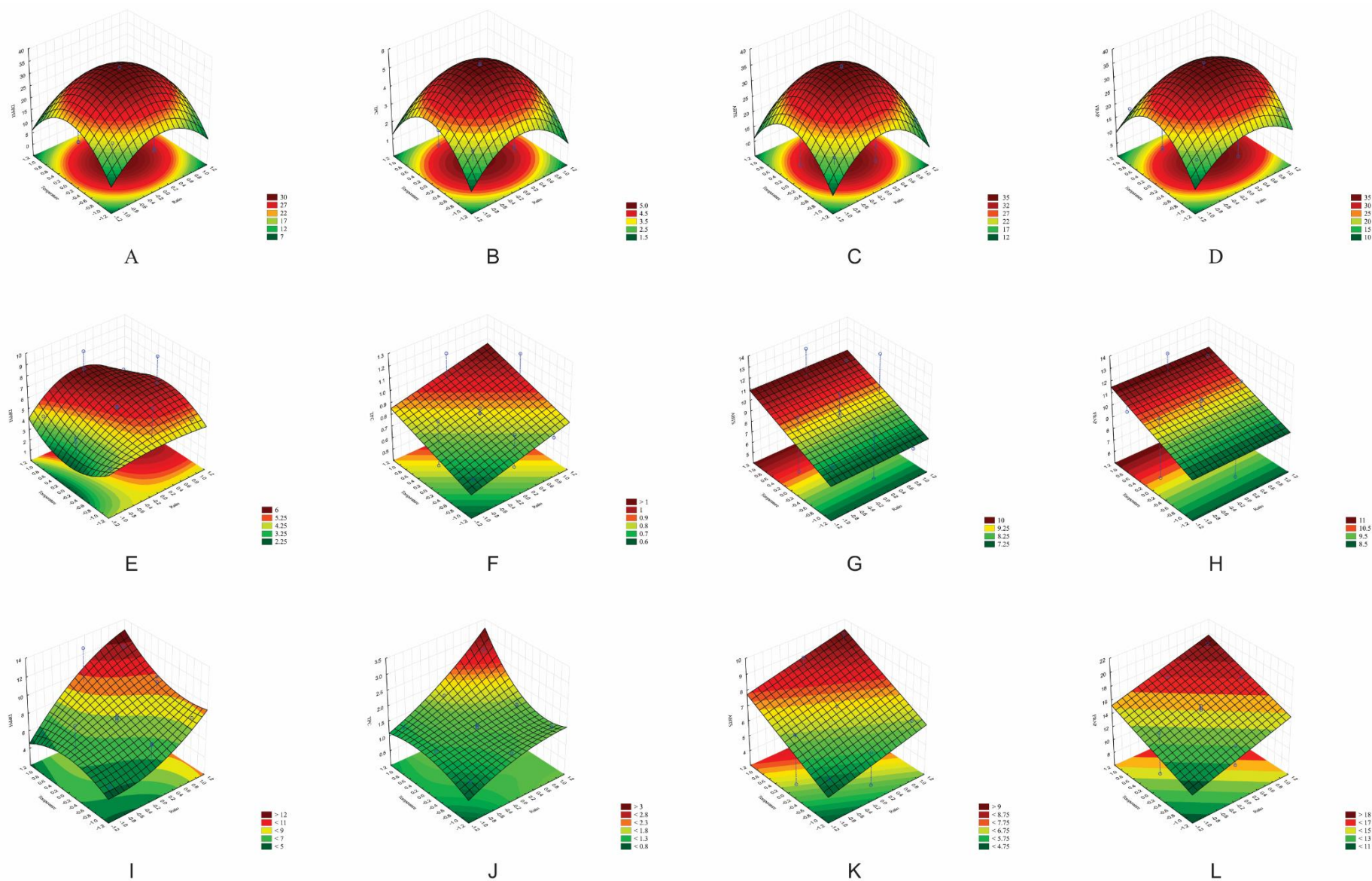
Linear and quadratic coefficients, as well as their interactions, were calculated for each experiment to describe the studied variables (Table 5.2). In the case of a positive coefficient characteristic, the response increases as the variable increases; in contrast, if a coefficient has a negative effect, the response decreases as the variable increases. The most important variable in the mathematical model is the one that presents the highest absolute coefficient value (RORIZ et al., 2016).

Thus, for RSM 1 (acetone), the sample-to-solvent ratio (X_1) significantly increased the FRAP levels, while the solvent concentration (X_3) significantly decreased the TPC and ABTS values. All the quadratic effects contributed positively and significantly for the antioxidant extraction. For RSM 2 (methanol), the temperature (X_2) significantly increased all the dependent variables (TPC, ABTS, DPPH, FRAP), while the solvent concentration (X_3) significantly decreased the dependent variables, except for DPPH. DPPH was the most complex model able to describe correctly the process, as presented significant linear and quadratic coefficients, as well as the interaction of linear vs. linear or quadratic vs. linear coefficients, which were considered to optimization. Lastly, in the case of RSM 3 (methanol-HCl), it was observed that the quadratic regression coefficient of temperature (X_2) and the interaction of sample-to-solvent ratio (X_1) vs. quadratic coefficient temperature (X_2) had a negative effect in relation to TPC, while the interaction of sample-to-solvent ratio (X_1) vs. temperature (X_2) showed a significantly positive effect. In the antioxidant assays, the solvent concentration (X_3) significantly decreased the results.

Based on the multiple linear regression equations developed for each design (Table 5.2), 3D-response surface plots were also constructed to elucidate the interaction effects of the independent variables (Figure 5.1). In all the plots, it was possible to verify that the amount of antioxidant extracted increased to an optimum point of extraction (maximum extraction). However, to obtain an optimization in relation to all the modeled variables, a multi-response optimization procedure using the desirability function (d) was performed for each experiment in order to maximize the antioxidant extraction from *Carioca* beans. The optimization desirability values obtained were $d = 0.97$ for RSM 1, $d = 0.89$ for RSM 2 and $d = 0.89$ for RSM 3. These values were considered satisfactory, whereas desirability value (d) ranged from 0, considered completely undesirable to 1, considered completely desirable (YOLMEH; JAFARI, 2017). In the case of RSM 1, the optimum conditions were a sample-to-solvent ratio of 1:15, temperature of 25 °C, and 70% (v/v) acetone concentration. For RSM 2, the optimal conditions were a sample-to-solvent ratio of 1:18, temperature of 40 °C, and 50% methanol concentration. Lastly, the optimal conditions for RSM 3 were a sample-to-solvent ratio of 1:20,

temperature of 40 °C, and 50% methanol-HCl (99:1) concentration. All the optimization points were externally validated and showed observed values within predicted intervals to a 95% confidence level. Furthermore, the low absolute relative errors (AE) values were obtained for the variables. Therefore, the models could be used to predict the response values.

Figure 5.1 3-D response surfaces plots to evaluate interaction effects of: acetone, methanol and methanol:HCl as solvent



Note: acetone as solvent on DPPH (A), TPC (B), ABTS (C), FRAP (D); methanol as solvent on DPPH (E), TPC (F), ABTS (G), FRAP (H); of methanol-HCl as solvent on DPPH (I), TPC (J), ABTS (K), FRAP (L).

Table 5.3 Comparison between in vitro antioxidant assays, and phenolic profile from Carioca beans obtained by RSM1, RSM2 and RSM3 and others extractions methods.

Assay	S:S Ratio *	Temper ature	Solvent concentration **	Reference***	TPC	FC	ABTS	DPPH	FRAP	Kaempferol	Rutin	Ferulic acid	Chlorogenic acid	Caffeic acid	<i>p</i> -Coumaric acid
1	1:15	25 °C	70% Ac	RSM 1 Rocha-	2.82 ^a ± 0.19	2.64 ^a ± 0.25	48.93 ^a ± 1.25	31.94 ^a ± 2.54	31.89 ^a ± 1.72	1.175 ^a ± 0.025	0.356 ^{de} ± 0.027	1.148 ^b ± 0.009	6.220 ^b ± 0.623	<LOD	<LOD
2	1:10	25 °C	70% Ac	Guzman 2007	1.75 ^c ± 0.13	1.56 ^b ± 0.11	22.14 ^b ± 1.38	23.26 ^b ± 1.02	19.87 ^c ± 1.01	1.088 ^b ± 0.047	0.867 ^b ± 0.017	1.267 ^b ± 0.020	6.334 ^b ± 0.379	<LOD	<LOD
3	1:18	40 °C	50% MeOH	RSM 2 Akilioglu	1.15 ^{de} ± 0.11	0.45 ^{de} ± 0.04	12.41 ^{ef} ± 1.16	13.26 ^d ± 0.40	8.70 ^{de} ± 0.37	0.382 ^c ± 0.033	0.337 ^e ± 0.019	0.537 ^{ef} ± 0.023	2.367 ^d ± 0.105	0.027 ^c ± 0.017	<LOD
4	1:10	25 °C	50% MeOH	2010	0.98 ^{ef} ± 0.03	0.43 ^{de} ± 0.01	15.19 ^{de} ± 1.48	5.56 ^e ± 0.33	10.82 ^d ± 0.67	0.157 ^f ± 0.007	0.357 ^{de} ± 0.000	1.870 ^a ± 0.129	8.629 ^a ± 0.052	0.130 ^b ± 0.033	0.391 ^a ± 0.087
5	1:10	25 °C	50% MeOH	Guzman 2007	0.72 ^f ± 0.04	0.25 ^e ± 0.01	10.98 ^{ef} ± 0.74	5.09 ^e ± 0.23	6.35 ^e ± 0.38	0.202 ^f ± 0.113	0.272 ^f ± 0.000	0.915 ^{be} ± 0.617	8.625 ^a ± 0.037	<LOD	0.271 ^b ± 0.003
6	1:20	4 °C	70% MeOH	Ranilla, 2009	1.09 ^{de} ± 0.08	0.44 ^{de} ± 0.01	13.83 ^{def} ± 0.50	7.46 ^e ± 0.40	9.27 ^d ± 0.42	0.204 ^{ef} ± 0.003	0.383 ^{cd} ± 0.006	0.647 ^{ef} ± 0.017	3.687 ^c ± 0.018	0.016 ^c ± 0.021	<LOD
7	1:25	21 °C	80% MeOH	Gan 2016	1.35 ^{de} ± 0.07	0.62 ^d ± 0.04	17.06 ^{cd} ± 1.08	12.30 ^d ± 0.58	9.76 ^d ± 0.37	0.284 ^{de} ± 0.001	0.422 ^c ± 0.010	0.494 ^{ef} ± 0.027	2.224 ^d ± 0.154	<LOD	0.109 ^c ± 0.002
8	1:50	20 °C	100% MeOH	Mojica 2015	1.56 ^{cd} ± 0.10	1.12 ^c ± 0.04	17.05 ^{cd} ± 1.15	17.00 ^c ± 0.63	9.21 ^d ± 0.39	0.344 ^{cd} ± 0.004	0.188 ^g ± 0.04	0.250 ^f ± 0.004	1.187 ^e ± 0.013	<LOD	<LOD
9	1:10	25 °C	MeOH:HCl	Fan 2016	2.38 ^b ± 0.26	0.89 ^c ± 0.03	13.49 ^{ef} ± 0.37	14.39 ^{cd} ± 0.37	19.27 ^c ± 0.29	1.255 ^a ± 0.017	<LOD	1.099 ^b ± 0.030	3.899 ^c ± 0.264	<LOD-	<LOD
1			50%												
0	1:20	40 °C	MeOH:HCl	RSM 3	2.72 ^{ab} ± 0.07	0.94 ^c ± 0.05	19.76 ^{bc} ± 1.97	7.65 ^e ± 0.47	28.91 ^b ± 2.10	0.359 ^{cd} ± 0.004	0.990 ^a ± 0.042	0.560 ^{ef} ± 0.074	2.112 ^d ± 0.047	1.882 ^a ± 0.139	<LOD

* Sample:Solvent Ratio (g/mL); ** Ac: acetone , W – water; *** RSM 1, RSM2 and RSM3 are the optimum points obtained from each extraction design. Note: Results expressed as mean ± standard deviation. Different letters in the same line represent statistical difference (p < 0.05) performed by one-way ANOVA and Tukey's test. TPC (mg GAE/g): total phenolic compounds, FC (mg CE/g): flavonoids content, *in vitro* antioxidant activity by ABTS (μmol TE/g): 2,20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), DPPH (μmol TE/g): 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl, FRAP (μmol TE/g): ferric reducing antioxidant power. Kaempferol, rutin, ferulic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and *p*-coumaric acid expressed as μg/mL.

5.3.2 Comparison Between Methodologies

Different solvents to extract free phenolic compounds from beans have been studied, but there is lack of information about the most efficient solvent system to perform the best extraction of flavonoids and phenolic acids. To investigate this, the optimum points, obtained and validated for each optimization (“Extraction of Phenolic Compounds”), were compared with other extraction methods reported in the literature for different varieties of beans, using one sample of *Carioca* beans (Table 5.3).

The TPC values ranged from 0.72 to 2.82 mg GAE/g and FC from 0.25 to 2.64 mg CE/g. In line with our study, Akillioglu and Karakaya (2010) reported results of 3.74 mg GAE/g for TPC and 1.27 mg CE/g for FC in raw pinto beans. Mojica et al. (2015) presented results for phenolic compounds between 11.5 and 13.5 mg GAE/g in coats of some varieties of *Carioca* beans. In the present study, the whole bean seeds were evaluated, as this is the usual method of consumption. Unlike cereals, which are generally processed and refined, beans are consumed in an integral form, without the removal of the coat and embryo from the cotyledons.

All extraction methods tested showed statistical significance between them by Anova ($p < 0.05$). The Tukey HSD test demonstrated that extraction method 1 presented the best result for TPC, FC, ABTS, DPPH, FRAP and kaempferol. Among others compounds, the best extraction methods were method 10 for rutin; method 4 for *p*-coumaric acid, methods 4 and 5 for chlorogenic acid, method 10 for caffeic acid, and method 4 for ferulic acid.

As to many response and factors were studied, it is difficult to determine by Anova which extraction methods is the best one. To better understand which extraction procedure was associated with the evaluated responses, principal component analysis was applied (Figure 5.2). The first two principal components explained 70.46% of the total variance (PC1 = 46.88%; PC2 = 23.58%), with eigenvalue 5.16 and 2.59 respectively. The factors loadings used on PC1 were: TPC (0.90), FC (0.94), ABTS (0.86), DPPH (0.86), FRAP (0.91), kaempferol (0.81), and *p*-coumaric acid (-0.61). PC2 was plotted using *p*-coumaric acid (-0.60), chlorogenic acid (-0.89), caffeic acid (0.58) and ferulic acid (-0.85).

Comparing the projections of the extraction methods (Figure 5.2-a) and the projection of the variables (Figure 5.2-b) in PCA, it was possible to observe that the higher values regarding TPC, FC, ABTS, DPPH and FRAP were associated with assay 1. Also, the better extraction of kaempferol from the *Carioca* beans was associated with assay 1, defined by RSM 1: 70% acetone, 25 °C extraction temperature and 1:15 sample-to-solvent ratio (g/mL).

Figure 5.2 Principal component analysis of extraction methods and total phenolic compounds, flavonols contents, antioxidant capacity and phenolic compounds

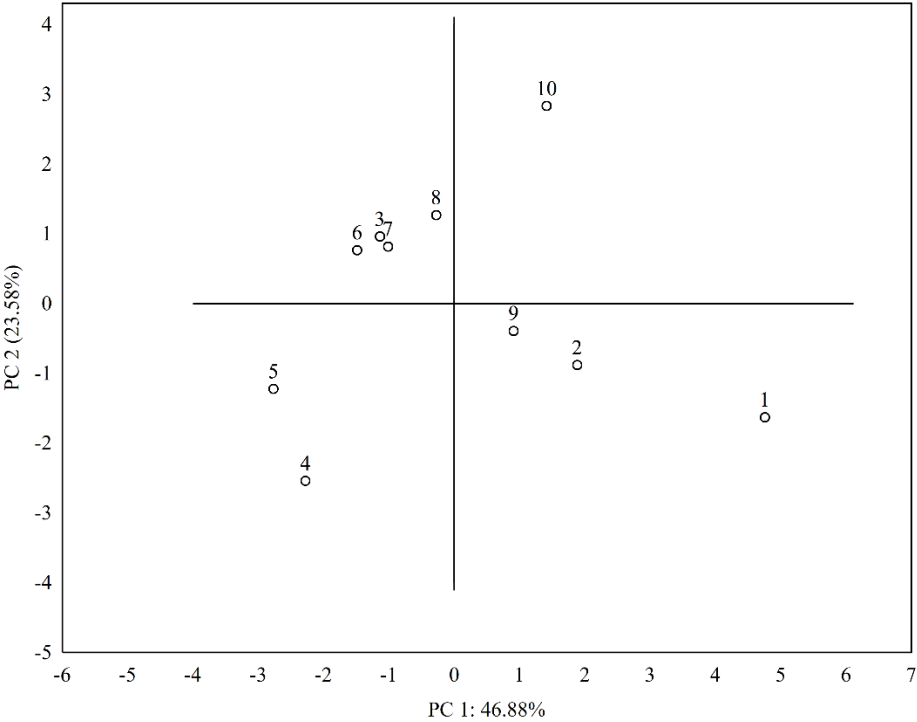


Figure 5.2-A

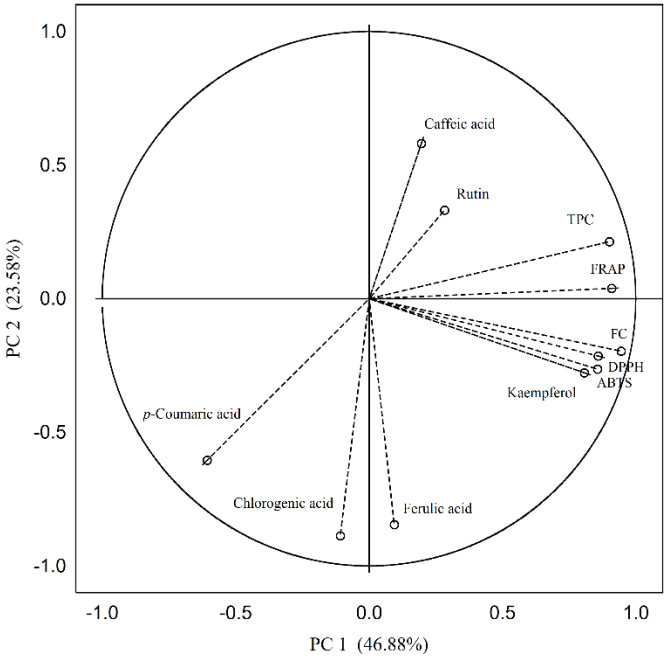
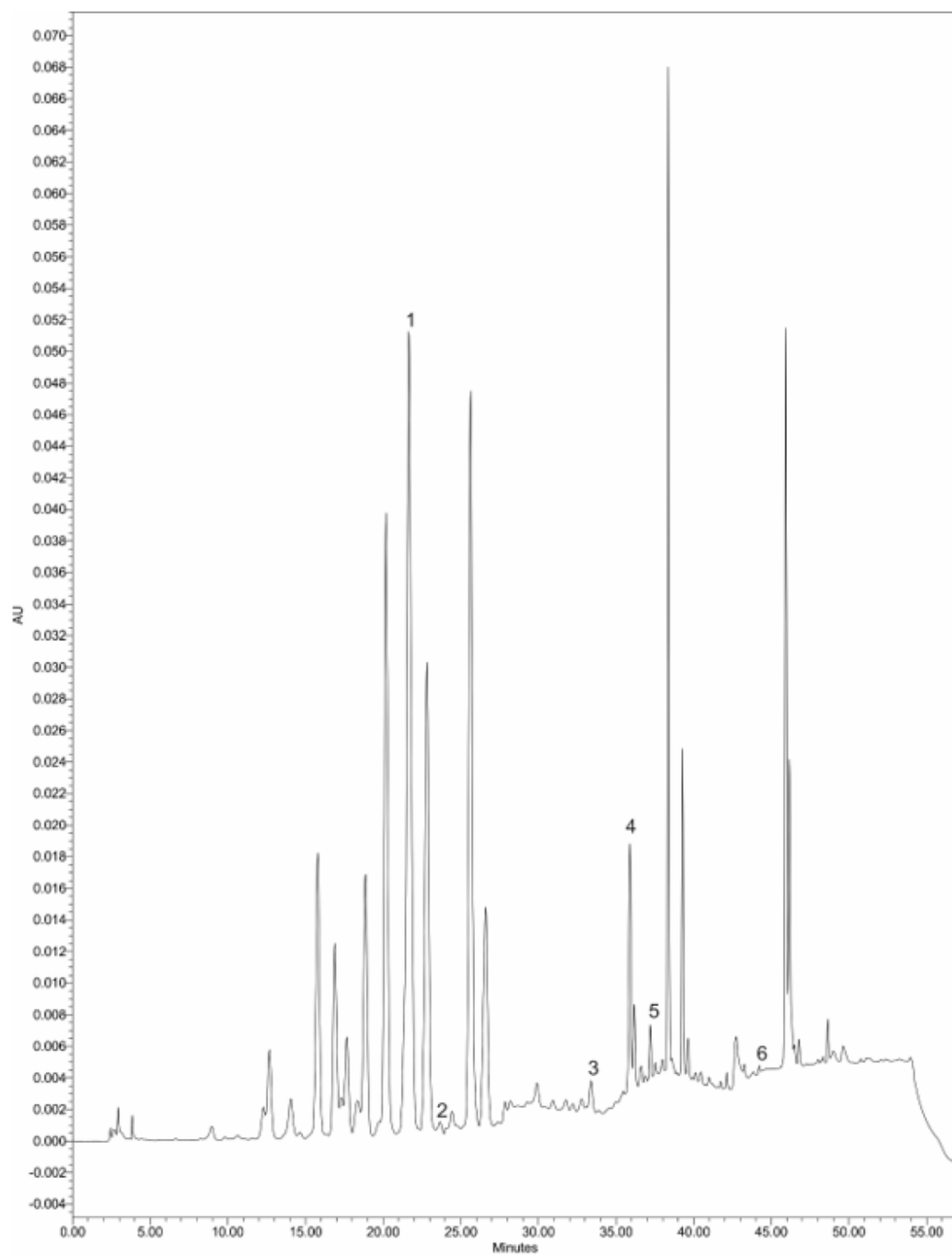


Figure 5.2-B

Note. 2a – Projection of the extraction methods (described on Table 5.3). 2b – Projection of the response variables

Figure 5.3 Chromatogram obtained by HPLC-DAD analysis of an extract from beans (assay-4) at 320 nm.



Note: Peak identification: 1. Chlorogenic acid; 2. Caffeic acid; 3. *p*-Coumaric acid; 4. Ferulic acid; 5. Rutin; 6. Kaempferol

Chandrasekara et al. (2016) suggested that 70% acetone was better than aqueous methanol and ethanol in the extraction of phenolics from cereal, oilseeds and legumes. Rocha-Guzmán et al. (2007) also found better results for TPC using acetone instead of methanol. The aforementioned authors found a strong correlation between antioxidant activity by DPPH and total phenolic content in acetone extracts, but did not observe such correlation in relation to methanol extracts. They explained that methanol extracts could present carbohydrates and proteins derived from the cotyledons of the beans, due to the inability of methanol to inhibit interactions between those polymers and phenolic compounds. The presence of carbohydrates decreases the ability of extracts to de-localize electrons to form stable free radicals. Instead, polyphenol-protein complexes can be broken by an acetone-water mixture, which explains its higher efficiency compared to other organic solvents (MOKRANI; MADANI, 2016). In accordance with this, in the present study the acetone extraction showed a higher correlation than the methanol and methanol-HCl extractions, with antioxidant activity as follows: ATBS ($r_{\text{acetone}} = 0.96$, $r_{\text{methanol}} = 0.94$, $r_{\text{methanol:HCl}} = 0.62$), DPPH ($r_{\text{acetone}} = 0.97$, $r_{\text{methanol}} = 0.40$, $r_{\text{methanol:HCl}} = 0.70$) and FRAP ($r_{\text{acetone}} = 0.93$, $r_{\text{methanol}} = 0.73$, $r_{\text{methanol:HCl}} = 0.69$).

The HPLC analysis revealed the presence of the flavonols kaempferol and rutin in almost all the samples (Table 5.3). Only the extracts obtained with methanol-water-HCl (80:20:1) – assay 9 – did not present rutin. Hydroxycinnamic acid, chlorogenic acid and ferulic acid were found by all the extraction methods, but *p*-coumaric acid and caffeic acid were extracted only by some methods using methanol. Chlorogenic acid was the most abundant of the phenolic acids, and it was best extracted by 50% methanol and 25 °C (assays 4 and 5), as shown in Figure 5.2. A chromatogram of extraction method 4 (Figure 5.3) allows identifying the peaks for chlorogenic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, rutin and kaempferol.

Kaempferol derivatives were reported as the main flavonols in *Jalo* beans and pinto beans by Ranilla, Genovese and Lajolo (2009) and Lin et al. (2008). These authors also detected *p*-coumaric acid and ferulic acid. Gan et al. (2016) found quercetin, kaempferol and rutin as the principal flavonols in pinto beans. On the contrary, Mojica et al. (2015) did not find kaempferol in *Carioca* bean cultivars extracted with 100% methanol, but found catechin, epicatechin, chlorogenic acid, vanillic acid, ferulic acid and *p*-coumaric acid. Catechin and epicatechin were not found in our experiments. Ramírez-Jiménez et al. (2014) showed that chlorogenic acid was present in *Bayo Madero* beans (brown beans), corroborating with our findings.

The results presented in Table 5.3 and in Figure 5.2 demonstrate that 70% acetone was most effective in extracting flavonols, while 50% methanol was most effective in extracting

phenolic acids. According to Stalikas (2007), polar phenolic acids could not be satisfactorily extracted using pure organic solvent; therefore, the inclusion of water increases the polarity of the solvent, improving its ability to extract more compounds. Rafiee et al. (2011) also concluded that addition of water on solvent organic increased the extraction of phenolic on olive leaves.

Fan et al. (2015) reported that some flavonols from several hydroxyl groups have higher solubility in relation to acetone than methanol. They attributed such behavior to the strong hydrogen bond acceptance of acetone, which can easily form hydrogen bonds with the solubilized flavonol. This may also be the case of kaempferol, which contains three hydroxyl groups.

According to Mokrani and Madani (2016), a single solvent is not able to extract all classes of phenolic compounds simultaneously and at a maximum concentration. The present study shows that flavonols and phenolic acids were better extracted by using different solvents.

5.4 CONCLUSION

Carioca beans are the most important pulse consumed in Brazil. Beans are recognized as high-protein foods worldwide and they are largely consumed in underdeveloped countries to replace protein from animal sources. The presence of beans in meals also provides phenolic compounds that present antioxidant activity. The extraction of phenolic compounds can be performed by using organic solvents, in different combinations with other parameters. This study provided information about the most efficient extraction method for extracting flavonoids and phenolic acids from *Carioca* beans. Flavonoids were best extracted by 70% acetone, while phenolic acids were best extracted by 50% methanol. Kaempferol and chlorogenic acid were the most abundant phenolic compounds in *Carioca* beans.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support (Grants N. 445476/2014-1 and N. 303561/2016-5) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES/Brazil) for the financial support and scholarships.

FUNDING

Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) - Grants N. 445476/2014-1 and N. 303561/2016-5.

COMPLIANCE WITH ETHICS REQUIREMENTS

Conflict of Interest

Francine Gomes Basso Los declares that she has no conflict of interest. Acácio Antonio Ferreira Zielinski declares that he has no conflict of interest. José Pedro Wojeicchowski declares that he has no conflict of interest. Alessandro Nogueira declares that he has no conflict of interest. Ivo Mottin Demiate declares that he has no conflict of interest.

Ethical Approval

This article does not contain any studies with human or animal subjects.

Informed Consent

Not applicable.

REFERENCES

- AKILLIOGLU, H. G.; KARAKAYA, S. Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and in vitro digestion process. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 633–639, 2010.
- ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ZARDO, D. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A.; MAFRA, L. I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151–158, 2014.
- ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. Optimization of Extraction Parameters of Total Phenolics from *Annona crassiflora* Mart. (Araticum) Fruits Using Response Surface Methodology. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 1, p. 100–110, 2017.
- BELWAL, T.; DHYANI, P.; BHATT, I. D.; RAWAL, R. S.; PANDE, V. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 207, n. June, p. 115–124, 2016.
- BENZIE, 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.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CHANDRASEKARA, A.; RASEK, O. A.; JOHN, J. A.; CHANDRASEKARA, N.; SHAHIDI, F. Solvent and Extraction Conditions Control the Assayable Phenolic Content and Antioxidant Activities of Seeds of Black Beans, Canola and Millet. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 93, n. 2, p. 275–283, fev. 2016.
- CONAB (2017) Companhia Nacional de Abastecimento. <https://www.conab.gov.br/>. Accessed 20 Feb 2018
- DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, out. 1980.
- DÍAZ, A. M.; CALDAS, G. V.; BLAIR, M. W. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 595–601, 2010.
- DORIA, E.; CAMPION, B.; SPARVOLI, F.; TAVA, A.; NIELSEN, E. Anti-nutrient components and metabolites with health implications in seeds of 10 common bean (*Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L.) landraces cultivated in southern Italy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, n. 1–2, p. 72–80, 2012.
- ESPADA-BELLIDO, E.; FERREIRO-GONZÁLEZ, M.; CARRERA, C.; PALMA, M.; BARROSO, C. G.; BARBERO, G. F. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. **Food Chemistry**,

v. 219, p. 23–32, 2017.

FAN, G. J.; NDOLO, V. U.; KATUNDU, M.; KERR, R. B.; ARNTFIELD, S.; BETA, T. Comparison of Phytochemicals and Antioxidant Capacity in Three Bean Varieties Grown in Central Malawi. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 204–210, 2016.

FAN, J. P.; XU, X. K.; SHEN, G. L.; ZHANG, X. H. Measurement and correlation of the solubility of genistin in eleven organic solvents from T = (283.2 to 323.2) K. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 89, p. 142–147, 2015.

FAOSTAT (2017) Food and Agriculture data. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Accessed 20 Feb 2018

FARONI, L. R. A.; CORDEIRO, I. C.; DE ALENCAR, E. R.; ROZADO, A. F.; ALVES, W. M. Influence of the harvest moisture content and of the drying temperature upon the bean quality. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 1, p. 148–154, 2006.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 2, p. 179–186, 2007.

GAN, R. Y.; DENG, Z. Q.; YAN, A. X.; SHAH, N. P.; LUI, W. Y.; CHAN, C. L.; CORKE, H. Pigmented edible bean coats as natural sources of polyphenols with antioxidant and antibacterial effects. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 168–177, 2016.

GOMES, S. V. F.; PORTUGAL, L. A.; DOS ANJOS, J. P.; DE JESUS, O. N.; DE OLIVEIRA, E. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in Passiflora species. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 28–35, 2017.

HAYTA, M.; İŞÇİMEN, E. M. Optimization of ultrasound-assisted antioxidant compounds extraction from germinated chickpea using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 208–216, 2017.

KAN, L.; NIE, S.; HU, J.; WANG, S.; CUI, S. W.; LI, Y.; XU, S.; WU, Y.; WANG, J.; BAI, Z.; XIE, M. Nutrients, phytochemicals and antioxidant activities of 26 kidney bean cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 467–477, 2017.

KHAZAEI, K. M.; JAFARI, S. M.; GHORBANI, M.; KAKHKI, A. H.; SARFARAZI, M. Optimization of Anthocyanin Extraction from Saffron Petals with Response Surface Methodology. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 7, p. 1993–2001, 2016.

LIN, L. Z.; HARNLY, J. M.; 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.

LOS, F. G. B.; ZIELINSKI, A. A. F.; WOJEICCHOWSKI, J. P.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. **Current**

Opinion in Food Science, v. 19, p. 63–71, 2018.

LUNA-VITAL, D. A.; MOJICA, L.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E.; MENDOZA, S.; LOARCA-PIÑA, G. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. **Food Research International**, v. 76, n. P1, p. 39–50, 2015.

MARQUEZI, M.; GERVIN, V. M.; WATANABE, L. B.; BASSINELLO, P. Z.; AMANTE, E. R. Physical and chemical properties of starch and flour from different common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, 2016.

MOJICA, L.; MEYER, A.; BERHOW, M. A.; DE MEJÍA, E. G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. **Food Research International**, v. 69, p. 38–48, 2015.

MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Separation and Purification Technology**, v. 162, p. 68–76, 2016.

RAFIEE, Z.; JAFARI, S. M.; ALAMI, M.; KHOMEIRI, M. Rafiee, Z., Jafari, S.M., Alami, M., Khomeiri, M. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. **J. Anim. Plant Sci.**, v. 21, n. 4, p. 738–745, 2011.

RAHMANIAN, N.; JAFARI, S. M.; GALANAKIS, C. M. Recovery and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 1, p. 1–18, 2014.

RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A. K.; REYNOSO-CAMACHO, R.; MENDOZA-DÍAZ, S.; LOARCA-PIÑA, G. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. **Food Chemistry**, v. 161, p. 254–260, 2014.

RANILLA, L. G.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 13, p. 5734–5742, 2009.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

ROCHA-GUZMÁN, N. E.; HERZOG, A.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; IBARRA-PÉREZ, F. J.; ZAMBRANO-GALVÁN, G.; GALLEGOS-INFANTE, J. A. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 521–527, 2007.

RORIZ, C. L.; PRIETO, M. A.; CARVALHO, A. M.; MORALES, P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Flowers of *Gomphrena globosa* L. as an alternative source of betacyanins: optimization of the extraction using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 229, p. 223–234, 2016.

SARFARAZI, M.; JAFARI, S. M.; RAJABZADEH, G. Extraction Optimization of Saffron Nutraceuticals Through Response Surface Methodology. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 9, p. 2273–2285, 2015.

SHARMA, S.; SAXENA, D. C.; RIAR, C. S. Analysing the effect of germination on phenolics, dietary fibres, minerals and γ -amino butyric acid contents of barnyard millet (*Echinochloa frumentaceae*). **Food Bioscience**, v. 13, p. 60–68, 2016.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A.; JR, J. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 16, p. 144–158, jan. 1965.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268–3295, 2007.

YOLMEH, M.; JAFARI, S. M. Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes Food and Bioprocess Technology. **Food and bioprocess technology**, v. 10, n. 3, p. 413–433, 2017.

ZHANG, H. .; WANG, S. Optimization of Total Polyphenols Extraction from *Vigna angularis* and Their Antioxidant Activities. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, n. 5, p. 608–614, 2016.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; WU, J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555–559, 1999.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; NUNES, C. A.; SCHNITZLER, E.; VAN RUTH, S. M.; GRANATO, D. Chemical Composition, Sensory Properties, Provenance, and Bioactivity of Fruit Juices as Assessed by Chemometrics: A Critical Review and Guideline. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 3, p. 300–316, 2014.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; BETA, T. Multi-response optimization of phenolic antioxidants from white tea (*Camellia sinensis* L . *Kuntze*) and their identification by LC-DAD-Q-TOF-MS/MS . **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 897–907, 2016.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este trabalho evidenciou não haver diferenças significativas entre as características morfológicas e teor de amilose em amido de feijão Carioca cultivar Campos Gerais produzido em diferentes áreas da região dos Campos Gerais, no Paraná, bem como diferença entre safras, para essa mesma cultivar produzida numa única área, no decorrer de três anos. A diferença no teor de amido total pode ter influenciado as características térmicas, de pasta, e propriedades tecnológicas como solubilidade, poder de inchamento e sinérese.

Amostras de feijão Carioca das cultivares Campos Gerais, Pérola, Dama, Estilo e ANFC cultivadas na safra de 2016 numa única área, foram estudadas em relação aos mesmos parâmetros e ao perfil de digestibilidade do amido, cujo resultado demonstrou alto teor de amido resistente em amido de feijão cru. Essa característica pode ser explorada para atender a demanda por produtos de apelo por saudabilidade, em formulações onde não se ocorre completa gelatinização do amido, como em massas assadas com pouca ou nenhuma presença de água.

No estudo da fração proteica de feijão foi possível comprovar que a hidrólise enzimática melhorou características tecnológicas da proteína. A formação de peptídeos de menor massa molar permitiu melhora na solubilidade, na capacidade de emulsificação e na capacidade de formação de espuma. Com isso, nosso estudo sugere que a substituição de proteína hidrolisada de soja por proteína hidrolisada de feijão em produtos emulsionados e/ou produtos que demandem espuma estável, pode ser uma excelente alternativa.

Dentre os compostos fenólicos identificados no feijão Carioca destacaram-se o camferol e o ácido clorogênico. Comparando-se os métodos distintos de extração de fenólicos disponíveis na literatura e métodos propostos por RSM, foi evidenciado que o uso acetona a 70% apresentou melhor desempenho na extração de flavonoides, enquanto metanol a 50% foi capaz de extrair ácidos fenólicos com maior eficiência.

O estudo das características químicas, estruturais e funcionais dos macronutrientes do feijão Carioca pode colaborar com o incremento de consumo e com o aproveitamento de grãos de baixo valor comercial, como grãos partidos ou HTC. O uso do feijão Carioca ou de suas frações como ingrediente tecnológico apresenta ainda o apelo da não-transgenia e baixa alergenicidade.

ANEXOS



RightsLink®

Home

Create
Account

Help



ELSEVIER

Title: Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition

Author: Francine Gomes Basso
Los, Acácio Antonio Ferreira
Zielinski, José Pedro
Wojeicchowski, Alessandro
Nogueira, Ivo Mottin Demiate

Publication: Current Opinion in Food Science

Publisher: Elsevier

Date: February 2018

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

LOGIN

If you're a **copyright.com** user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink** user or want to [learn more?](#)

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2019 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

16/04/2019

RightsLink Printable License

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 16, 2019

This Agreement between Francine Gomes Basso Los ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4571040683662
License date	Apr 16, 2019
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Food Analytical Methods
Licensed Content Title	Extraction Optimization of Phenolic Extracts from Carioca Bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Using Response Surface Methodology
Licensed Content Author	Francine Gomes Basso Los, Acácio Antonio Ferreira Zielinski, José Pedro Wojeicchowski et al
Licensed Content Date	Jan 1, 2018
Licensed Content Volume	12
Licensed Content Issue	1
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	full article/chapter
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	yes
Title	Uso do feijão Carioca como potencial ingrediente para a industria de alimentos
Institution name	Universidade Estadual de Ponta Grossa
Expected presentation date	Jul 2019
Requestor Location	Francine Gomes Basso Los Rua Tibagi 240 Carambei, Parana 84145000 Brazil Attn: Francine Gomes Basso Los
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below: