UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

WELLINGTON LEAL DOS SANTOS

Bioprospecção de moléculas bioativas de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.): multifuncionalidade e aplicações

RECIFE – PE
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

WELLINGTON LEAL DOS SANTOS

Bioprospecção de moléculas bioativas de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.): multifuncionalidade e aplicações

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito necessário para a obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira

Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

RECIFE – PE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237b LEAL DOS SANTOS, WELLINGTON
Bioprospecção de moléculas bioativas de feijão-fava (Phaseolus lunatus L.): multifuncionalidade e aplicações / WELLINGTON LEAL DOS SANTOS. - 2022.
145 f. : il.

Orientadora: KEILA APARECIDA MOREIRA.
Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2022.

1. Feijão-fava. 2. Antioxidante. 3. Tecnologia de alimentos de origem vegetal. I. MOREIRA, KEILA APARECIDA, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

WELLINGTON LEAL DOS SANTOS

Bioprospecção de moléculas bioativas de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.): multifuncionalidade e aplicações

Tese apresentada e aprovada pela comissão examinadora:

_____

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira - Presidente
Universidade Federal do Agreste de Pernmabuco

_____

Profa. Dra. Daniele Silva Ribeiro - Membro Externo
Universidade Federal do Agreste de Pernmabuco

_____

Dr. José Erick Galindo Gomes - Membro Externo
Programa de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Regional (PDCTR)
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

_____

Dra. Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento - Membro Externo
Programa Pós-Doutoral de Jovens Doutores (PDJD/FUNCAP)
Universidade Federal do Ceará

_____

Profa. Dra. Rosangêla Estevão Alves Falcão - Membro Externo
Universidade de Pernambuco

RECIFE – PE
2022

Aos meus pais, **Maria Ferreira dos Santos** e **José Leal dos Santos**, por serem exemplos e modelos de conduta, pelo amor incondicional e respeito, os mesmos não mediram esforços para que esta conquista se tornasse real.

DEDICO!!

AGRADECIMENTOS

Uma tese, independente do fato de sua autoria ser individual, é uma construção fruto do esforço de muitos que contribuem direta e indiretamente com a sua construção, e para a constituição desta contei com importantes apoios e incentivos sem os quais não teria tornado uma realidade e aos quais estarei eternamente grato.

A espiritualidade e ancestralidade por me ensinar sobre humildade, amor, respeito e acima de tudo sobre superar as adversidades, nosso axé nasce das nossas dores, e se eu fosse desamparado certamente não estaria aqui.

Aos meus guardiões e guias espirituais. Vocês que sempre estiveram comigo, sobretudo, nos momentos em que eu mais precisei, sempre por meio de energia, intuição e força. A vocês que me ensinam todos os dias a reescrever meus sonhos, que quem luta mostra os dentes e lava a alma, parafraseando a cantora Maria Sil.

Aos meus orixás pela harmonia entre meus amigos de caminhada, pela força da minha fé, pela determinação, força e coragem para prosseguir mesmo quando era difícil sair da cama e por minha saúde. Adupè, orisà.

Essa tese também é sobre ocupar espaços e sobre superar as expectativas e as estatísticas, quem diria que um homem gay, negro pardo, filho de agricultores, candomblecista poderia se tornar doutor? E eu não poderia deixar de agradecer a todos àqueles que vieram antes de mim. Suas lutas não foram em vão. Obrigado por me ensinarem a (R)EXISTIR todos os dias. E, que apesar de todo sofrimento, buscam força de superação e a capacidade de encontrar a **Vida** em meio às situações mais desesperadoras. Muito obrigado a todos os que me antecederam, que me possibilitaram ocupar ambientes que antes me foram negados. Que a nossa luta continue. Muito obrigado a vocês, ilustres desconhecidos. A dignidade pertence a nós.

A meus pais Dona Nininha e Seu Zé, pelo exemplo de humildade, humanidade, amor incondicional e pelo incentivo, apesar de nem entender direito tudo que eu faço, Olorum acertou em cheio ao me encarnar nessa família. Quem dera vocês fossem eternos.

A minha orientadora, professora Keila Moreira, tenho muito orgulho ao citá-la como uma das responsáveis pela minha formação profissional, afinal são quase dez anos de orientação. Agradeço pela confiança, pela amizade, conselhos e paciência. A senhora é um grande exemplo de simplicidade, compreensão e competência, além de ser dona de uma grande humanidade. Admiro seu comprometimento, sua

dedicação e amor ao trabalho, e sobretudo, a pesquisa. Nos últimos anos tive a percepção de que ela se preocupa não só com a realização do trabalho, mas principalmente com o ser humano. Muito obrigado por me ensinar a dimensão humana da pesquisa e, principalmente, que é mais fácil multiplicar quando sabemos apenas dividir. Nós, seus orientados, sabemos que sempre teremos um amigo e um lugar onde encontramos apoio e alguns puxões de orelha.

A Luiz Gênova por todo o amor, apoio e incentivo durante os últimos anos de doutorado, não é fácil está do lado de alguém estressado com o processo de escrita, muito obrigado por me ensinar sobre resiliência, e acima de tudo por está ao meu lado em todos os momentos, sem você a carga seria bem mais pesada.

À Aline Bomfim, Edson Teixeira, Emília Brito, Raquel Silva e Euzanyr Gomes que ao longo do doutoramento se tornaram bons amigos. Obrigado pela força, apoio, pelo companheirismo e ajuda durante boa parte dos experimentos. Sem vocês a jornada durante esses quatro anos não teria sido tão leve.

À Deborah Canejo, Humberto Silva, Marcia Lima e Nathally Bernardo, meus primeiros orientandos de trabalho de conclusão de curso, por acreditarem no meu trabalho e embarcarem nessa “loucura” que é a vida cientifica, vou ser sempre grato por me lembrarem sobre a extensão humana presente na docência, a vocês meus caros, muito obrigado.

À Melry Medeiros. Alana Queiroz e Flávio Quintino pela amizade, carinho e dedicação. Vocês são a prova viva de que algumas amizades transcendem a existência nesse mundo e que verdadeiras amizades se mantem, apesar da distância e da presença constante. Vejo em vocês, um exemplo de profissionais, de luta, força e coragem. Obrigado por me ajudarem a entender que Deus (N’zambi) nunca desampara seus filhos.

À Alane Pereira, Gleidson Lima e Thayná Marinho pela ajuda durante todos os experimentos da tese, sem vocês não conseguiria ter feito tanto, muito obrigado, vejo em vocês a excelência. O futuro pertence àqueles que não tem medo de arriscar.

À Camila Nascimento que mesmo distante sempre esteve disposta a me ajudar, por me incentivar a ser melhor e por ter me ensinado tanto sobre a vida, não apenas a cientifica, agradeço a Iansã por ter te colocado nos meus caminhos desde a graduação.

À Isabelle Ferreira, minha amiga, desde o primeiro dia da seleção da pós-graduação nossos Orixás se bateram (risos!), pelo apoio, companheirismo e parceria durante essa jornada, que as águas de Iemanjá e os ventos de Iansã continuem nos abençoando. Como diz aquele provebio africano “A luz com que vês os outros, é a luz com que os outros te vêem a ti” e poder te conhecer, e conviver contigo só ilustra o que está representado nesse proverbio ancestral, vejo em você um exemplo de ser humano e profissional. Adupè.

Aos meus amigos-irmãos e os que se tornaram bons amigos Ana Maria Severo, Debóra Miranda, Gabriel Teixeira, Geovânio Silva, Rosangela Gomes e Thamires Gomes pelo apoio, pelos abraços e por toda a força durante essa jornada, por me ensinarem que a vida não tem necessariamente que ser levada a sério e que grandes amizades não necessitam de presença física constante.

Agradeço também aos meus amigos da pós graduação, Lais Santos, Givanildo Silva, Giselle Woolley. Vocês fizeram as semanas de disciplinas menos desgastantes. As brincadeiras e as histórias, carregarei comigo e espero que no futuro, depois de cada um encontrar seu caminho, possamos relembrar e dar boas risadas com elas.

Agradeço aos funcionários da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco e da coordenação do Programa de pos graduação em Biociencia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, e aos coordenadores, Tatiana Porto e Rinaldo Mota, que passaram pela gestão do PPGBA, pelo apoio e incentivo.

A CAPES que contribuiu com o auxílio financeiro sem o qual essa tese não poderia ser concluída.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que essa tese fosse construída.

“Alguns de nós estão construindo do zero. Sem herança, sem favores, sem parentes ricos, sem conexões. Apenas sangue, suor trabalho e muita habilidade”.

Autor desconhecido

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1. Exemplar de *Phaseolus lunatus* L. (A), flores (B) e vagem (C).....15

Figura 2. Produção anual de *Phaseolus lunatus* L. em Pernambuco, no Nordeste e no Brasil de 2009 a 2018.....19

Figura 3. Visão geral dos peptídeos bioativos derivados de plantas.....27

Capítulo 1

Figura 1. Espectro FTIR das farinhas de *Phaseolus lunatus* L. variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).....53

Capítulo 2

Figura 1. Grau de hidrólise da digestão gastrointestinal in vitro dos isolados proteicos de *Phaseolus lunatus* L. das variedades Lavandeira (CPL), Mulatinho (CPM), Olho de Ovelha (CPO) e Rosinha (CPR).....74

Figura 2. Efeito da digestão gastrointestinal in vitro sobre isolados proteicos das variedades Lavandeira (CPL), Mulatinho (CPM), Olho de Ovelha (CPO) e Rosinha (CPR), de *Phaseolus lunatus* L., sobre a atividade de eliminação dos radicais ABTS (A), DPPH (B), hidroxila (C) e superóxido (D).....76

Figura 3. Efeito da digestão gastrointestinal in vitro sobre isolados proteicos das variedades Lavandeira (CPL), Mulatinho (CPM), Olho de Ovelha (CPO) e Rosinha (CPR) de *Phaseolus lunatus* L. frente ao poder redutor férrico (3a), poder de redução (3b), quelação de cobre (3c) e quelação de ferro (4d).....77

Figura 4. Efeito da digestão gastrointestinal in vitro sobre isolados proteicos de *Phaseolus lunatus* L., variedades Lavandeira (CPL), Mulatinho (CPM), Olho de Ovelha (CPO) e Rosinha (CPR) sobre a atividade anti-inflamatória in vitro.....81

Figura 5. Efeito da digestão gastrointestinal in vitro sobre isolados proteicos de *Phaseolus lunatus* L., var Lavandeira (CPL), Mulatinho (CPM), Olho de Ovelha (CPO)

e Rosinha (CPR) sobre a tolerância de células de levedura ao estresse oxidativo induzido por H2O2.....82

Figura 6. Efeito da simulação da digestão gastrointestinal in vitro sobre isolados proteicos *Phaseolus lunatus* L. var Lavandeira (CPL), Mulatinho (CPM), Olho de elha (CPO) e Rosinha (CPR) sobre a peroxidação lipídica; A - digestão gástrica, B - digestão intestinal.....83

Capítulo 4

Figura 1. Estabilidade da espuma dos concentrados proteicos de *Phaseolus lunatus* L. variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), branquinha (V5) e Lavandeira (V6).....129

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1. Composição química em termos de proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta, cinzas e extrato não nitrogenado de variedades de feijão-fava.....20

Tabela 2. Presença de inibidores enzimáticos em diversos vegetais.....22

Tabela 3. Mecanismos de ensaios químicos comumente usados para avaliar a capacidade antioxidante de compostos naturais.....30

Capítulo 1

Tabela 1. Composição centesimal das variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6) de Phaseolus lunatus L.....52

Tabela 2. Fatores antinutricionais e digestibilidade da proteína e do amido in vitro de Phaseolus lunatus, variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).....55

Tabela 3. Propriedades tecnológicas das farinhas de *Phaseolus lunatus* L. variedades Rosarinho (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).....56

Tabela 4. Capacidade de formação de espuma (CFE) e estabilidade da espuma ao longo do tempo, de farinhas de *Phaseolus lunatus* L. variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).....57

Capítulo 2

Tabela 1. Matriz de variáveis do melhor ensaio para as diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* L.....67

Capítulo 3

Tabela 1. Componentes extraíveis totais (CET) de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) var. Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5), Lavandeira (V6).....98

Tabela 2. Fenólicos totais presentes em extratos de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* L. pré e pós-digestão in vitro. Extrato de hexano (E1), éter de petróleo (E2), clorofórmio (E3), acetato de etila (E4), etanol (E5), acetona (E6) e água (E7). Var. Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).....101

Tabela 3. Atividade quelante de ferro de compostos fenólicos presentes em extratos de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* L. pré e pós-digestão in vitro. Extrato de hexano (E1), éter de petróleo (E2), clorofórmio (E3), acetato de etila (E4), etanol (E5), acetona (E6) e água (E7). Var. Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).....103

Tabela 4. Atividade quelante de cobre de compostos fenólicos presentes em extratos de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* L. pré e pós-digestão in vitro. Extrato de hexano (E1), éter de petróleo (E2), clorofórmio (E3), acetato de etila (E4), etanol (E5), acetona (E6) e água (E7). Var. Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).....105

Tabela 5. Atividade de eliminação do radical DPPH da digestão gastrointestinal in vitro de compostos fenólicos presentes em extratos de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* L. Extrato de hexano (E1), éter de petróleo (E2), clorofórmio (E3), acetato de etila (E4), etanol (E5), acetona (E6) e água (E7). Var. Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6)....108

Tabela 6. Atividade de eliminação do radical ABTS da digestão gastrointestinal in vitro de compostos fenólicos presentes em extratos de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* L. Extrato de hexano (E1), éter de petróleo (E2), clorofórmio (E3), acetato de etila (E4), etanol (E5), acetona (E6) e água (E7). Var. Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6)....111

Capítulo 4

Tabela 1. Matriz de planejamento fatorial 23 para extração proteica das farinhas de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* L.....127

Tabela 2. Combinação de variáveis do melhor ensaio para as diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* L.....128

Tabela 3. Capacidade de retenção de água (CRA) e óleo (CRO), capacidade de emulsificação (CE), estabilidade da emulsão (EE) e capacidade de formação de espuma (CFE) dos concentrados proteicos de *Phaseolus lunatus* L. variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), branquinha(V5) e Lavandeira V6).....129

Tabela 4. Potencial de sequestro dos radicais ABTS, DPPH, superóxido, hidroxila, quelante de cobre e quelante de ferro das variedades Galo de Campina (V3) e branquinha (V5).....130

Capítulo 5

Tabela 1. Formulações das maioneses com substituição parcial da gema de ovo por farinha de feijão-fava (FFF) em percentual.....137

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ABTS – 2-2′-Azino-bis (3- etilbenzotiazolina -6-ácido sulfônico)

CAA – Capacidade de absorção de água

CE – Capacidade de emulsificação

CFE – Capacidade de formação de espuma

CRO – Capacidade de absorção de óleo

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EE – Estabilidade da espuma

EFE – Estabilidade da formação de espuma

FRAP - Poder antioxidante redutor férrico

ISA – Índice de solubilidade em água

RESUMO

O desenvolvimento de ingredientes funcionais com atividades bioquímicas produtos agrícolas, como sementes de leguminosas, pode ser uma opção econômica para as indústrias alimentícia e farmacêutica. O uso de sementes de leguminosas, para o desenvolvimento de novos produtos ou ingredientes funcionais, pode ser uma opção econômica para as industrias alimentícia e farmacêutica. Dessa forma, objetivou-se caracterizar os aspectos funcionais, nutricionais e os espectros de infravermelho das farinhas obtidas a partir das variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5), Lavandeira (V6) de *P. lunatus* L. para uso em matrizes alimentares, além do efeito da digestão gastrointestinal sobre o potencial antioxidante das frações peptídicas e compostos fenólicos presentes no feijão-fava. Avaliou-se a presença de fatores antinutricionais, capacidade de absorção de água (CAA) e óleo (CRO), solubilidade em água (ISA), capacidade de formação de espuma (CFE), emulsificante (CE), estabilidade da espuma (EFE), emulsão das farinhas (EE) e os espectros de infravermelho das farinhas. As amostras foram submetidas a extração dos compostos fenólicos utilizando hexano (E1), éter de petróleo (E2), clorofórmio (E3), acetato de etila (E4), etanol (E5), acetona (E6) e água (E7) na proporção 1:5 (m/v). Os compostos fenólicos obtidos foram submetidos a digestão gastrointestinal *in vitro* e determinado seu potencial antioxidante frente aos radicais DPPH, ABTS e, bem como, sua capacidade de quelação de cobre e ferro. As farinhas das variedades Lavandeira, Rosinha, Olho de Ovelha e Mulatinho passaram pelas etapas de extração proteica, solubilização alcalina, precipitação isoelétrica, e submetidas ao ensaio de digestão gástrica e intestinal *in vitro*, posteriormente determinou-se o potencial antioxidante através dos ensaios de eliminação dos radicais DPPH, ABTS, hidroxila, superóxido, poder redutor férrico (FRAP), poder redutor, atividade anti-desnaturação proteica, inibição da peroxidação lipídica, sobrevivência de *Saccharomyces cerevisiae*, frente ao estresse oxidativo e quelação de cobre e ferro. As farinhas apresentaram baixos índices de inibidores de tripsina (2,21 - 2,24 $UIT.g^{-1}$) e elevados índices de inibidores de amilase (4,68 – 13,52 $UIT.g^{-1}$), ademais, o CAA (149 - 240 $g.g^{-1}$), ISA (2,54 - 2,83 $g.g^{-1}$), CAA (0,63 – 102 $g.g^{-1}$), CE e EE mantiveram-se acima de 50%, e com estabilidade após 60 min. Observou-se picos nas faixas espectrais de infravermelho entre 500 e 3350 cm^{-1} com regiões de estiramento na OH, CH, anéis aromáticos, amida I e amida II. A água foi mais eficiente na extração de compostos fenólicos nas variedades V1, V3, V4, V5, V6 e éter de petróleo para a V2 antes do processo digestivo. A digestão gastrointestinal acarretou no aumento dos compostos fenólicos presentes nos extratos e frente a eliminação dos radicais DPPH, ABTS e quelação de ferro e cobre. Em relação a fração proteica, a digestão *in vitro* demonstrou ser uma ferramenta eficaz para obter hidrolisados com capacidade antioxidante frente a eliminação dos radicais ABTS, DPPH, hidroxila, superóxido e quelação de cobre e ferro. Também foram observados efeitos anti-desnaturante, diminuição da peroxidação lipídica e aumento na sobrevivência de *S. cerevisiae*. Os resultados do presente estudo sugerem que farinhas das variedades de *P. lunatus* L. poderiam ser usadas como um substituto potencial em formulação de produtos alimentícios com alto valor tecnológico e nutricional.

Palavras-chave: Bioacessibilidade; bioprodutos; Feijão-lima; potencial antioxidante.

ABSTRACT

The use of agricultural products, such as legume seeds, for the development of functional ingredients with biochemical activities can be an economical option for the food and pharmaceutical industries. Thus, the objective was to characterize the functional and nutritional aspects and the infrared spectra of the flours obtained from the varieties Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5), and Lavandeira (V6) of *Phaseolus lunatus* L. for use in food matrices, as well as the effect of gastrointestinal digestion on the antioxidant potential of peptide fractions and phenolic compounds present in the faba bean. The presence of antinutritional factors, water absorption capacity (WAC) and oil absorption capacity (ORC), water solubility (WSS), foaming capacity (CFE), emulsifier (EC), foam stability (EFE), emulsion of the flours (EE), and the infrared spectra of the flours were evaluated. The flours were submitted to phenolic compound extraction using hexane (E1), petroleum ether (E2), chloroform (E3), ethyl acetate (E4), ethanol (E5), acetone (E6), and water (E7) in a 1:5 (w/v) ratio. The phenolic compounds obtained were submitted to gastrointestinal digestion *in vitro* and their antioxidant potential against DPPH and ABTS radicals was determined, as well as their copper and iron chelation capacity. The flours of the varieties Lavandeira, Rosinha, Olho de Ovelha, and Mulatinho went through the stages of protein extraction, alkaline solubilization, isoelectric precipitation, and were subjected to gastric and intestinal digestion *in vitro*. Afterwards, the antioxidant potential was determined through the DPPH radical scavenging assays, ABTS, hydroxyl, superoxide, ferric reducing power (FRAP), reducing power, protein denaturation activity, inhibition of lipid peroxidation, survival of Saccharomyces cerevisiae against oxidative stress, and chelation of copper and iron. The flours showed low levels of trypsin inhibitors (2.21–2.24 $ITU.g^{-1}$) and high levels of amylase inhibitors (4.68–13.52 $ITU.g^{-1}$). Furthermore, after 60 minutes, the SAC (149–240 $g.g.^{-1}$), ISA (2.54–2.83 $g.g.^{-1}$), SAC (0.63–102 $g.g.^{-1}$), EC, and EE remained above 50% and stable. Peaks were observed in the spectral ranges between 500 and 3350 cm^{-1} with stretching regions at OH, CH, aromatic rings, amide I and amide II. Water was most efficient in extracting phenolic compounds in varieties V1, V3, V4, V5, V6 and petroleum ether for V2 before the digestive process. The gastrointestinal digestion resulted in an increase of the phenolic compounds present in the extracts and the elimination of DPPH and ABTS radicals as well as chelation of iron and copper. In the case of the protein fraction, *in vitro* digestion proved to be an efficient method for obtaining hydrolysates with antioxidant capacity against ABTS, DPPH, hydroxyl, superoxide radicals elimination, and copper and iron chelation. Anti-saturant effects, decreased lipid peroxidation, and increased survival of S. cerevisiae were also observed. The results of the present study suggest that the flours of the varieties of *P. lunatus* L. (of which one is the most prominent) could be used as a potential substitute in the formulation of food products with high technological and nutritional value.

Keywords: Bioaccessibility; bioproducts; Lima beans; antioxidant potential.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
2. REVISÃO DE LITERATURA 20
2.1. Taxonomia distribuição geográfica, potencial agronômico e composição das sementes de Phaseolus lunatus L. 20
2.2. Fatores antinutricionais 23
2.2.1. Inibidores de tripsina 23
2.2.2. Inibidores de α-amilase 25
2.3. Propriedades tecnológicas e funcionais da farinha e dos isolados proteicos 26
2.4. Peptídeos bioativos vegetais: obtenção e características 27
2.5. Compostos fenólicos 30
2.6. Estresse oxidativo e atividade antioxidante de compostos naturais 31
3.1. Objetivo geral 34
3.2. Objetivos específicos 34
REFERÊNCIAS 35
CAPÍTULO1 42
1. INTRODUÇÃO 43
2. MATERIAL E MÉTODOS 45
2.1. Obtenção das farinhas de Phaseolus lunatus L. e determinação da composição centesimal 45
2.2. Análise dos espectros de infravermelho com transformada de Fourrier 45
2.3. Inibição de tripsina 46
2.4. Inibição de α-amilase 46
2.5. Determinação da digestibilidade das farinhas 47
2.5.1. Digestibilidade proteica *in vitro* 47
2.5.2. Digestibilidade de amido *in vitro* 47
2.6. Características funcionais e tecnológicas 48
2.6.1. Capacidade de absorção de água 48
2.6.2. Solubilidade em água 49
2.6.3. Capacidade de absorção de óleo 49
2.6.4. Atividade emulsificante 49
2.6.5. Estabilidade da emulsão 50
2.6.6. Capacidade espumante 50
2.6.7. Estabilidade da espuma 51

2.6.8. Estabilidade da espuma 51
2.7. Análise estatística.....51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
3.1. Rendimento e análise centesimal das variedades *Phaseolus lunatus* L. estudadas.....52
3.2. Espectros de infravermelho com transformada de Fourrier.....53
3.3. Inibição de tripsina, amilase e digestibilidade *in vitro* das farinhas de *Phaseolus lunatus* L. 56
3.4. Propriedades tecnológicas 57
4. CONCLUSÃO 60
REFERÊNCIAS 60
CAPÍTULO 2 64
RESUMO 65
1. INTRODUÇÃO 65
2. MATERIAL E MÉTODOS 67
2.1. Obtenção e preparo do concentrado proteico de P. lunatus 67
2.2. Simulação da digestão gastrointestinal in vitro.....68
2.3. Determinação do grau de hidrólise.....68
2.4. Potencial antioxidante dos hidrolisados proteicos 69
2.4.1. Eliminação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....69
2.4.2. Eliminação do radical ABTS 69
2.4.3. Eliminação do radical hidroxila 70
2.4.4. Eliminação do radical superóxido 70
2.4.5. Atividade antioxidante por meio do poder redutor férrico (FRAP).....71
2.4.6. Poder redutor.....71
2.4.7. Atividade quelante de Cu^{2+} e Fe^{2+} 72
2.4.8. Atividade antidesnaturação *in vitro* 72
2.4.9. Sobrevivência de *Saccharomyces cerevisiae*.....73
2.4.10. Inibição de peroxidação lipídica.....73
2.5. Análise estatística.....74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 74
3.1. Grau de hidrólise 74
3.2. Eliminação dos radicais DPPH, ABTS, hidroxila e superóxido 76
3.3. Atividade antioxidante por meio do poder redutor férrico (FRAP), poder de redução e quelante de cobre e ferro 79

3.4. Inibição da desnaturação proteica 81
3.5. Avaliação do estresse oxidativo 82
3.6. Inibição da peroxidação lipídica 84
4. CONCLUSÃO 86
REFERÊNCIAS 86
CAPÍTULO 3 93
1. INTRODUÇÃO 94
2. MATERIAL E MÉTODOS 96
2.1. Obtenção dos grãos e das farinhas de P. lunatus 96
2.2. Produção dos extratos vegetais 96
2.3. Determinação do conteúdo fenólico total 97
2.4. Atividade de quelação de Fe^{2+} 97
2.5. Atividade de quelação de Cu^{2+} 98
2.6. Ensaio de eliminação do radical DPPH 98
2.7. Ensaio de eliminação do radical ABTS 99
2.8. Simulação da digestão gastrointestinal in vitro 99
2.9. Análise Estatística 100
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 100
4. CONCLUSÃO 115
REFERÊNCIAS 115
CAPÍTULO 4 118
REIVINDICAÇÕES 119
Campo da invenção 121
Antecedentes da invenção 121
Descrição da Invenção 123
Exemplos de concretizações da invenção 129
CAPÍTULO 5 135
DESENVOLVIMENTO DE MAIONESE COM SUBSTITUIÇÃO PARCIAL E TOTAL DA GEMA DE OVO POR FARINHA DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.) 135
REIVINDICAÇÕES 136
Campo da invenção 137
Antecedentes da invenção 137
Descrição da Invenção 139
CONSIDERAÇÕES FINAIS 143

1. INTRODUÇÃO

Proteínas alimentares de origem animal, comumente, apresentam preço mais elevado que àquelas de origem vegetais, além disso, em diversas regiões do globo são relativamente de difícil aquisição. Ademais, os vegetais podem ser produzidos em uma menor área que os animais, esses são alguns dos motivos que impulsiona pesquisas que visem a substituição das proteínas animais por vegetais bem como, seu potencial biológico.

Dessa forma, as leguminosas, especificamente a espécie *Phaseolus lunatus* L., são importantes alternativas de alimentos ricos em proteínas e outros nutrientes, principalmente em países subdesenvolvidos. O feijão-fava ou feijão lima, nomes comuns dados a espécies *P. lunatus*, é a segunda espécie do gênero mais produzida e consumida no mundo, sendo cultivada no continente americano, africano, europeu e asiático. Trata-se de uma cultura dotada de excelente rusticidade e boa adaptação a condições climáticas tropicais e de solo, portanto, é uma leguminosa com alto potencial alimentar.

As sementes de feijão-fava apresentam cerca de 26% de proteína, enquanto, os isolados proteicos oriundo desses grãos contem aproximadamente 75%, esse conteúdo pode ser usado tanto para fabricar concentrado proteico, quanto para isolar proteínas com propriedades funcionais que podem ser aproveitadas principalmente nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

Outros componentes importantes são os compostos fenólicos, metabólicos secundários produzidos pelos vegetais, que apresentam capacidade antioxidante e farmacológica, portanto, pode ser utilizado no desenvolvimento de alimentos, cosméticos, nutracêuticos e fitoterápicos.

Mesmo apresentando características nutricionais desejáveis, adaptabilidade em termos de solo e clima, e presença de compostos bioativos como compostos fenólicos e peptídeos, são escassas pesquisas empregando *P. lunatus* para obtenção de bioprodutos, ou seu uso como alimento funcional. Devido o grande número de cultivares e subespécies de feijão-fava, é indispensável que sejam realizados estudos de caracterização nutricional, biológica, toxicológica, bioquímica e farmacológica.

Mediante isso, objetivou-se com esse trabalho caracterizar quimicamente e avaliar as características funcionais e nutricionais das farinhas de *P. lunatus*, obter e avaliar o efeito da digestão *in vitro* dos isolados proteicos e dos compostos fenólicos extraídos a partir de diferentes variedades de *P. lunatus*. frente a atividade antioxidante.

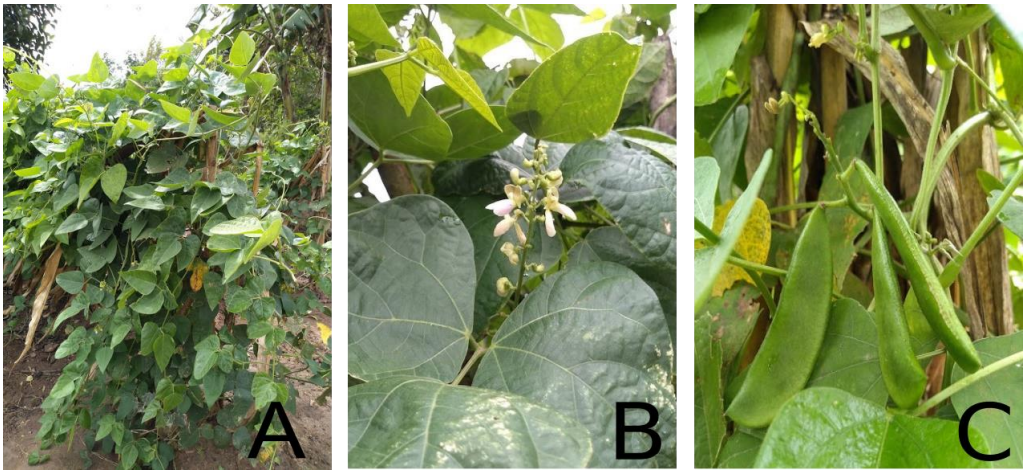
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia distribuição geográfica, potencial agronômico e composição das sementes de *Phaseolus lunatus* L.

O gênero *Phaseolus* foi descrito pela primeira vez por Linné em 1753, validado também por Bentham em 1840 (LEITÃO-FILHO, 1974). De acordo com Ilias *et al.* (2020), a espécie *P. lunatus* é classificada no reino Plantae; divisão Magnoliphyta; ordem: Fabales; Família: Fabaceae; Subfamilia: *Papilionoideae*; tribo: *Phaseoleae*.

Phaseolus lunatus é uma leguminosa com hábito de crescimento ramador, meio ramador, de moita e trepadeira. Apresenta folhas e vagens verde intenso e flores branco-esverdeadas ou amarelo-pálidas (Figura 1), de acordo com a variedade (DIAS; PORFILIO; FREIRE, 2016).

Figura 1. Exemplar de *Phaseolus lunatus* (A), flores (B) e vagem (C).



Fonte: Arquivo pessoal.

Essa espécie pertencente à família Fabaceae, que reúne 643 gêneros com aproximadamente 18.000 espécies distribuídas em todo o globo, concentrando-se nas regiões com clima tropical e subtropical (OLIVEIRA; TORRES; BEBEDITO, 2011). A

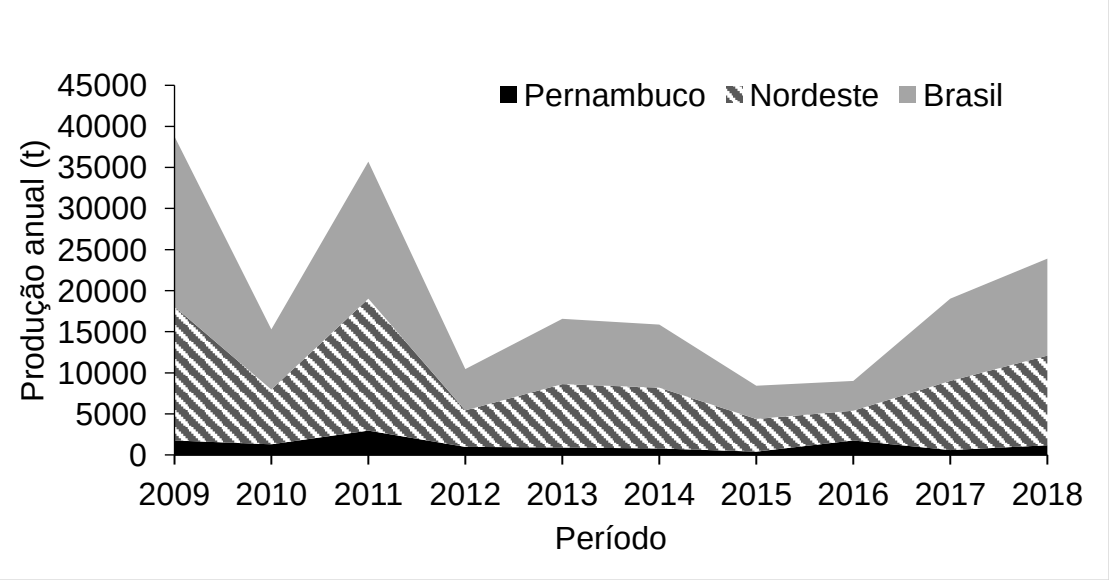
fava, feijão-fava, feijão-de-lima ou fava-de-lima, nomes comuns dados ao *P. lunatus* é consumida em grande parte do continente americano, europeu, africano e asiático (PORTELA *et al.*, 2019).

No Brasil, é a segunda espécie do gênero *Phaseolus* mais produzida, sendo cultivada na região Nordeste do país e no norte de Minas Gerais (PEREIRA-FILHO *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019; SOUSA, 2020). Entretanto, na região Nordeste, a produção de feijão-fava tem-se destacado, devido principalmente a sua boa adaptabilidade ao clima semiárido (OLIVEIRA; TORRES; BEBEDITO, 2011).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE os maiores produtores de feijão-fava são Estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Sergipe, Piauí, e Minas Gerais (IBGE, 2018). A produção média nacional aproxima-se de cerca de 9496 toneladas/ano.

A produção anual de feijão fava em Pernambuco corresponde a aproximadamente 13% da produção brasileira e 14% da produção nordestina (IBGE, 2016). No Nordeste em 2018 a produção de fava foi de aproximadamente 10.880 toneladas (Figura 2), correspondendo a aproximadamente 50% da produção nacional (IBGE, 2018).

Figura 2. Produção anual de *Phaseolus lunatus* em Pernambuco, no Nordeste e no Brasil de 2009 a 2018.



Fonte: IBGE (2018) adaptada pelo autor.

O feijão-fava apresenta importante papel econômico e social, devido a sua rusticidade, com colheita prolongada, sobretudo no período seco. Azevedo, Franco e Araújo (2003) ao avaliar a composição química de grãos de sete variedades de *P lunatus*, encontraram níveis médios de 91,42% de matéria seca, 23,60% de proteína bruta, 1,06% de extrato etéreo, 3,90% de fibra bruta, 3,52% de cinzas e 67,93% de extrato não nitrogenado (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química em termos de proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta, cinzas e extrato não nitrogenado de variedades de feijão-fava.

Variedades	MS (%)	PB (%)	EE (%)	FB (%)	Cinzas (%)	CHO (%)
Va	92,06	26,19	1,11	3,86	3,09	65,75
Vb	90,25	26,70	0,88	4,29	3,73	64,40
Vc	91,38	22,71	1,42	4,59	3,23	68,05
Vd	90,44	25,49	0,90	2,27	3,57	67,77
Ve	92,80	23,85	1,05	4,28	3,06	67,76
Vf	92,48	22,24	1,14	4,33	4,10	68,19
Vg	90,52	17,95	0,90	3,70	3,86	73,59

MS - matéria seca; PB - proteína bruta; EE - extrato etéreo; FB - fibra bruta; ENN- extrato não nitrogenado; CHO: carboidratos; Va- variedade branca; Vb – variedade bege-clara; Vc – variedade bege-escura; Vd – variedade preta; Ve – variedade rajada; Vf – variedade chata e rajada; Vg – variedade pintada.

Fonte: Adaptada de Azevedo, Franco e Araújo (2003).

A baixa produtividade média do feijão-fava é atribuída à parte da produção ser originada da agricultura de subsistência, na qual, não há emprego de tecnologia, bem como, a ausência de variedades mais adaptadas às condições ambientais da região (BASTOS *et al.,* 2020). Além desses fatores, Guimarães (2007) aponta que o menor cultivo do feijão-fava em comparação ao feijão comum deve-se ao sabor amargo que desagrada parte dos consumidores e ao maior tempo de cocção.

O feijão-fava por possuir valores de carboidratos (~ 63%), proteína (~ 25%) e fibra (~ 6%) semelhantes ao do feijão comum, e segundo Pereira-Filho *et al.* (2019), é uma rica fonte de aminoácidos como o triptofano, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina, isoleucina e leucina, sendo assim, uma excelente fonte alternativa de proteína (JONES *et al.*, 1922; GARCIA *et al.*, 2021).

As leguminosas apresentam elevado teor proteico, presença de nutrientes essenciais e do alto consumo mundial, para que as sementes de feijão-fava na elaboração de farinhas e/ou uso das suas proteínas na elaboração de alimentos pela indústria, é necessária a caracterização química e bioquímica (DE MARIA; FERRARI; MARESCA, 2016). Além disso, a determinação de propriedades como, solubilidade proteica, capacidade de retenção de água e óleo, capacidade emulsificante e formação de espuma, e da ausência de fatores antinutricionais torna-se essencial para o uso de produtos oriundos de leguminosas no desenvolvimento de novos produtos (PHONGTHAI *et al.*, 2018; NWACHUKWU; ALUKU, 2021).

2.2. Fatores antinutricionais

Os fatores antinutricionais são compostos presentes nos alimentos que tendem a bloquear nutrientes, inibição metabólica ou redução da digestão o que indisponibiliza os nutrientes, em leguminosas, estão presentes inibidores da tripsina e de α-amilase, lectinas, taninos, ácido fítico, oxalatos, compostos fenólicos, saponinas e oligossacarídeos (RAMIREDDY; RADHAKRISHNAM, 2021). Curiosamente, nos últimos anos, muitos desses compostos antinutricionais demonstraram vários beneficios para a saúde e potencial para se tornarem ingredientes ativos para a indústria de alimentos (KUMAR *et al.*, 2021; YEGREM, 2021).

2.2.1. Inibidores de tripsina

Os inibidores de tripsina atuam no bloqueio do sítio ativo da enzima ou alteram a conformação estrutural que reduz ou cessa a atividade catalítica. Os inibidores deste tipo de protease se classificam em dois tipos: Tipo Kunitz (KTI), que atuam na inibição da tripsina, mas sem potencial inibitório frente a quimiotripsina; diferentemente do tipo Bowman-Birk (BBI), que inibe as duas enzimas (COLARES *et al.,* 2017).

Os inibidores KTI e BBI diferem em relação ao tamanho e quantidade de pontes dissulfeto em sua estrutura, o primeiro apresenta cerca de 20 kDa e 7 pontes de dissulfeto, já o segundo possui cerca de 8 kDa e 7 pontes dissulfeto e, por isso, apresentam potencialis de inibição diferentes frente às enzimas gástricas (KUMAR *et al.*, 2021). De acordo com Świeca; Baraniak (2014), os inibidores enzimáticos são encontrados em diversas espécies vegetais, como apresentado na Tabela 2, sobretudo em leguminosas.

Tabela 2. Presença de fatores antinutricioonais, inibidores enzimáticos em diversos vegetais.

Nome comum	Nome científico	Inibidores de tripsina ($UIT.mg^{-1}$)	Inibidores de α-amilase ($UI.g^{-1}$)	Referência
Lentilha	*Lens culinaris*	3,60 - 7,60	0,00	Świeca; Baraniak (2014); Shi (2015).
Grama preta	*Vigna mungo*	7,10 - 10,60	-	Suneja *et al.* (2011)
Ervilha do campo	*Pisum sativum*	0,78 - 6,32	16,80	Habiba (2002)
Feijão	*Phaseolus vulgaris*	3,10 - 31,3	76,00 - 675,00	Alonso *et al.* (2000); Shi (2015)
Feijão silvestre	*Vicia faba*	2,31 - 7,20	18,90	Alonso *et al. (*2000); Shi (2015)
Grama-verde	*Vigna radiata*	15,80	-	Lorensen *et al.* (1981)
Ervilha de pintainho	*Cicer arietinum*	8,10 - 20,89	3,10 - 10,5	Shi (2017)
Feijão-guandu	*Cajanus cajan*	8,10 - 31,28	22,50 - 34,20	Solomon *et al.* (2017)
Ervilha de vaca	*Vigna unguiculata*	3,40 - 67,10	1,40 - 89,50	Gonçalves *et al.* (2016)
Soja	*Glycine max*	94,10	-	Lorensen *et al.* 1981

Fonte: Adaptado de Avilés-Gaxiola; Chuck-Hernández e Saldivar (2018) e Kumar (2021).

Os inibidores de tripsina apresentam inibição competiva, ligam-se aos resíduos aminoacídicos de lisina e arginina presentes no sítio ativo, dessa forma, a digestão proteica é reduzida e a quantidade de aminoácidos dietéticos disponibilizados para

absorção diminui, acarretando quantidades de aminoácidos abaixo da exigência nutricional (VERMA; THAKUR, 2021).

Os inibidores de tripsina também podem apresentar efeitos benéficos para a saúde humana, entre os quais, a prevenção de diversos tipos de câncer, seja por ação efetiva na inibição de genes ou pela proteção contra a formação dos radicais livres (HALL; MORARU, 2021). De acordo com Pedrosa *et al.* (2012), para serem considerados seguros para o consumo humano, os inibidores de tripsina devem estar abaixo dos limiares de 1,0 - 1,5 $UIT.mg^{-1}$, no entanto, alimentos que apresentam resultados superiores a esse limiar ao passar por processos industriais, como o aumento da temperatura, tem os inibidores de tripsina inativados ou reduzidos.

Poucos estudos avaliaram os efeitos antinutricionais do feijão-fava, Egbe e Akinyele (1990) e Adeparusi (2001) reportaram 7,8 $UIT.mg^{-1}$ e 73,7 UIT.mg. $proteína^{-1}$, respectivamente, na farinha crua e esses resultados reduziram a zero após o tratamento térmico. De modo que, existe um déficit em estudos relacionados a quantificação e identificação dos componentes com potencial inibitório da tripsina presentes no feijão-fava.

2.2.2. Inibidores de α-amilase

As α-amilases (α-1,4-glucano-4-glucano-hidrolases, EC 3.2.1.1) são um conjunto de enzimas pertencentes à família de endo-amilases (glicosil hidrolases), que clivam as ligações α-1,4 dos polímeros de glicose presentes em componentes do amido, glicogênio e outros carboidratos, desempenhando papel importante no metabolismo dessas substâncias em diversos organismos (FRANCO *et al.*, 2002).

Os inibidores de amilase interferem na digestão amilácea ao diminuir ou inativar a atividade enzimática com consequente redução da digestibilidade, e da taxa de absorção energética do organismo sob a forma de monossacarídeos (SAMTIYA; ALUKO; DHEWA, 2020). As propriedades bioquímicas, físico-químicas e funcionais têm sido estudadas e relatadas há duas décadas, apesar da ausência de estudos sobre características estruturais, mecanismos envolvidos no processo inibitório, já é sabido que os inibidores de α-amilase possuem propriedades nutracêuticas (RODDA; SANDHYA; SWETHA, 2014; YAO *et al.*, 2016).

Os inibidores de α-amilase de origem vegetal não são capazes de inibir as α-amilases presentes em microrganismos e outros vegetais, no entanto, inibem α-amilases dos seres humanos e de insetos (RAFIEI *et al.*, 2016). De acordo com Micheli *et al.* (2019), os inibidores de α-amilase estão presentes em diversas espécies vegetais, incluindo, as leguminosas. Em se tratando do feijão-fava, há poucos relatos na literatura com relação à presença de inibidores de amilase na espécie, porém existe indícios da ocorrência desses inibidores na forma inativa ou com menor potencial de inibição que os inibidores presentes no feijão comum (*P. vulgaris*) , que apresentam quatro formas de inibidores de α-amilase, α-AI1, α-AI 2, α-AI 3 e α-AI I, sendo a primeira amplamente distribuída.

2.3. Propriedades tecnológicas e funcionais da farinha e dos isolados proteicos

O uso de farinhas e isolados/concentrados proteicos derivados das mais diversas fontes vegetais tem atraído a atenção da comunidade científica, tanto na análise das características funcionais, quanto no desenvolvimento de produtos alimentícios com características ímpares (HASMADI *et al.*, 2020). Essas propriedades tecnológicas e funcionais nomeadamente são: índice de solubilidade em água; capacidade de absorção de água e óleo; capacidade de emulsificação de formação de espuma e estabilidade da emulsão e da espuma.

De acordo com Okenzie e Bello (1988), o índice ou capacidade de absorção de água está diretamente ligada a capacidade que a farinha, o amido ou a fração proteica, apresentam de ligar-se às moléculas de água, impedindo a separação, para Kohn *et al.* (2015), essa água compreende a água capilar, a água fisicamente presa, a hidrodinâmica ou a água retida. Diante disso, está diretamente relacionada à presença de macromoléculas, dentre as quais, os carboidratos hidrofílicos e diferentes estruturas proteicas, na farinha e isolados proteicos respectivamente, podem ser responsáveis pela variação na capacidade de absorção de água (JULIANTI *et al.*, 2017; HASMADI *et al.*, 2020).

De acordo com Chawafambira (2021), as farinhas e isolados proteicos podem ser empregados na formulação de diversos alimentos devido a alta capacidade de absorção aquosa, além disso, as farinhas com boa absorção de água podem ter mais

constituintes hidrofílicos, já os isolados proteicos, por apresentarem aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos, podem interagir ou não com a água nos alimentos, por conseguinte, essa proteína pode apresentar fragmentos peptídicos que desempenham papel fundamenta no potencial tecnológico e bioativo.

O índice ou capacidade de retenção/absorção de óleo, refere-se ao aprisionamento físico do lipídeo e indica o percentual ou taxa proteica que estará ligada a gordura nas formulações alimentícias. A presença da gordura na composição dos alimentos atua como flavorizante ou realçador de sabor (SEGURA-CAMPOS, 2020). Dessa forma, aumenta a retenção de sabor e melhora significativamente a palatabilidade (AWUCHI; IGWE; ECHETA, 2019).

A composição aminoacídica e proteica da farinha está diretamente relacionada a capacidade de reter óleo, dessa forma, farinhas vegetais que apresentam maior teor de aminoácidos apolares que se ligam intermolecularmente com as cadeias apolares dos lipídeos, tendem a apresentar aumento na absorção de gorduras (MARUATONA; DUODU; MINNAAR, 2010; MUDAU *et al.*, 2021). Bem como, o teor lipídico da farinha vegetal influencia no aumento do aprisionamento do óleo devido as interações lipídicas (CHANDRA; SINGH; KUMARI, 2015).

A formação de espumas deve-se a presença de proteínas tensoativas que quando agitadas criam uma área interfacial entre as proteínas e os componentes aquoso e oleoso que incorpora ar a solução alimentar o que forma e estabiliza a espuma (ZHU *et al.*, 2017), com consequente redução da densidade do alimento (AWUCHI; IGWE; ECHETA, 2019).

O potencial emulsificante, sistema bifásico constituído de água e óleo, presente em farinhas vegetais e isolados proteicos, deve-se à presença de proteínas que transformam o óleo dietético em partículas finas (GULÃO *et al.*, 2018). A capacidade de emulsão e a sua estabilidade, confere às farinhas vegetais a possibilidade de serem utulizadas na produção de derivados cárneos, molhos de salada, sobremesas congeladas e biopolímeros (YADA, 2017).

2.4. Peptídeos bioativos vegetais: obtenção e características

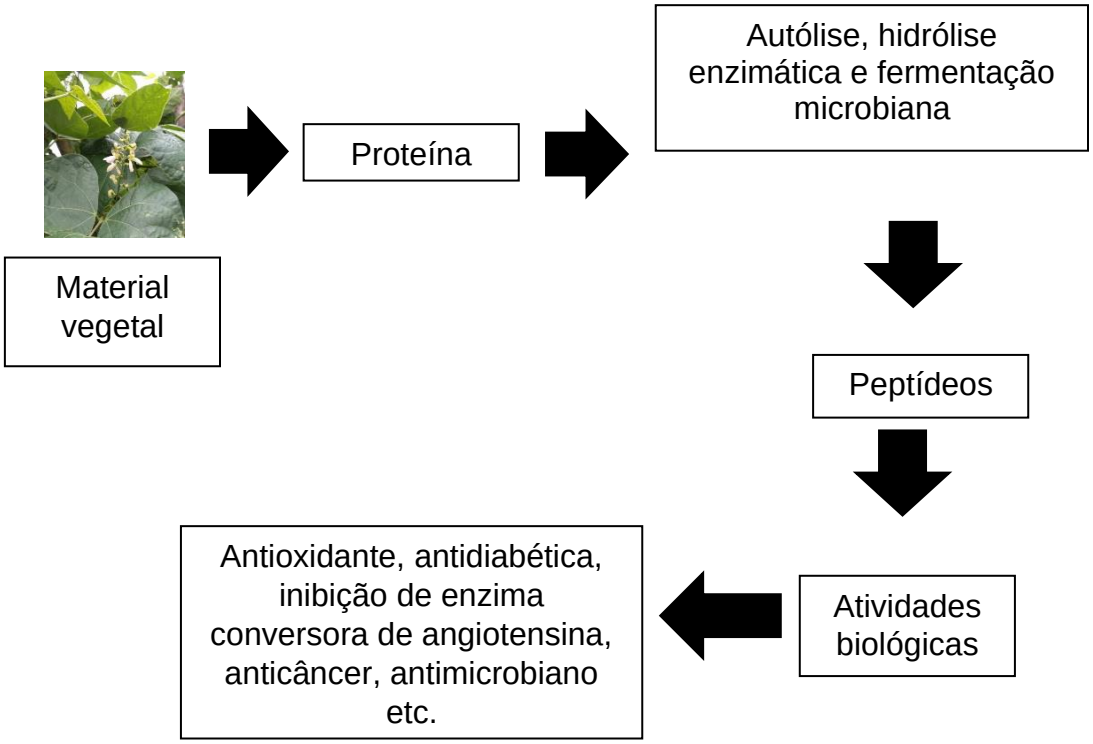
O uso de proteínas de origem vegetal tem aumentado na nutrição humana, por questões ambientais, baixa oferta de proteína de origem animal ou mudança de hábitos alimentares. Principalmente, nos países em desenvolvimento, nos quais, a ingestão desse nutriente acontece em níveis inferiores àqueles necessários para mantença (MEENA *et al.*, 2020).

Essas proteínas são obtidas e utilizadas na forma de isolados, concentrados ou farinhas, e vem sendo incorporadas no desenvolvimento de diversos produtos alimentícios como as bebidas proteicas, carnes, pães e biscoitos ou ainda, na forma de alimentos funcionais ou nutracêuticos. Apesar de todo o conhecimento já disponível sobre a funcionalidade proteica, ainda existe uma série de lacunas significativas do uso de ingredientes proteicos vegetais no desenvolvimento de produtos e na sua funcionalidade biológica (HERTZLER *et al.*, 2020; AKHARUME; ALUKO; ADEDEJI, 2021).

Dentre os compostos com efeito benéfico para a saúde humana, peptídeos com potencial biológico de origem vegetal têm despertado o interesse dos pesquisadores. Diversas culturas de cereais, legumes e leguminosas já foram exploradas para identificação da presença destas substâncias. As proteínas e peptídeos com potencial biológico estão presentes nas estruturas vegetativas e reprodutivas, porém, sementes são as fontes mais prováveis, devido a grande quantidade de proteínas (SELAMASSAKUL *et al.*, 2016).

Os peptídeos bioativos são cadeias curtas de aminoácidos, geralmente apresentam entre 2 e 20 unidades aminoacídicas e massa molecular inferior a 3 kDa, estas moléculas estão presentes de modo inativo na proteína original, no entanto, quando clivadas, por autólise, hidrólise enzimática ou fermentação microbiana, apresentam diferentes atividades biológicas (Figura 3) que podem exercer efeito benéfico a saúde do organismo (APONE; BARBULOVA; COLUCCI, 2019).

Figura 3. Visão geral dos peptídeos com atividade biológica derivados de plantas.



Fonte: Adaptada de Apone, Barbulova e Colucci (2019).

O alto potencial de biológico e a ampla diversidade de peptídeos bioativos derivados de vegetais tem atraído o foco das indústrias alimentícias e farmacêuticas, e recentemente, as proteínas derivadas de *Phaseolus* sp. têm recebido atenção dos pesquisadores e da indústria, em virtude, das suas propriedades funcionais e biológicas (ASHRAF *et al.*, 2020).

Tamayo *et al.* (2018), ao avaliarem o potencial antimicrobiano e anti-inflamatório de isolados e hidrolisados de *P. lunatus,* observaram elevados índices de atividade anti-inflamatória e atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas estes estudos preliminares sugerem considerável atividade biológica para aplicações nutracêuticas.

Estudos desenvolvidos por Salawu *et al.* (2019), indicam que compostos fenólicos e proteínas oriundas do feijão-fava (*P. lunatus*) apresentam altos níveis de atividade antioxidante após a digestão humana simulada *in vitro*, isso pode sugerir a sua possibilidade de uso como alimento funcional, ajudando na prevenção da formação de radicais livres e doenças associadas ao estresse oxidativo.

2.5. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, presentes no feijão-fava são originados do metabolismo secundário das plantas, se formam em condições de estresse como ataques de agentes patogênicos, radiação ultravioleta, dentre outras condições adversas, e são essenciais para a defesa das plantas nessas circunstâncias. Possuem um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxilas, incluindo seus grupos funcionais, e podem ser encontrados nas formas simples ou de polímero, o que lhes confere seu potencial antioxidante (SILVA *et al*., 2018; LEMOS; REIMER; WORMIT, 2019).

Os compostos fenólicos são um extenso grupo de fitoquímicos distribuídos na natureza, incluindo moléculas simples como os ácidos fenólicos, de massa molecular intermediária, como os flavonoides, e polímeros complexos de elevada massa molecular, como os taninos condensados e hidrolisados. Nas plantas, esses compostos são essenciais para a defesa contra agressões externas, além de estarem associados à atração ou repelência de insetos e polinização. Em humanos, ao serem consumidos através de alimentos de origem vegetal, há evidências de que os compostos fenólicos exercem atividades antioxidantes (AGOSTINI-COSTA *et al*., 2015).

Com relação a estrutura química, os compostos fenólicos são caracterizados como substâncias que apresentam, pelo menos, um anel aromático, ao qual se encontra ligado a um ou mais grupos hidroxilas e a outros grupos orgânicos, podendo ser encontrados nas formas simples ou de polímeros. Por serem quimicamente variáveis, são considerados multifuncionais e, nos vegetais, os compostos fenólicos podem estar presentes na forma livre ou associados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (LANDETE, 2012; SOLLANO-MENDIETA *et al*., 2021).

Os compostos fenólicos são classificados com base no número de anéis fenólicos e nos elementos estruturais que ligam esses anéis uns aos outros. Sendo agrupados em quatro grandes categorias: ácidos fenólicos, estilbenos, lignanas e flavonoides, os quais podem ser encontrados tanto em bebidas quanto em fontes alimentares, incluindo frutas, verduras, legumes, vinho tinto, chá verde, leguminosas dentre outros (NIEDZWIECKI *et al*., 2016).

Vale ressaltar que a efetividade dos compostos fenólicos como agentes antioxidantes está diretamente associada com os grupos funcionais presentes, com a posição que eles ocupam no anel aromático e o tamanho da cadeia desses grupos (ANGELO; JORGE, 2007). Além disso, seus efeitos benéficos para a melhoria da saúde como um todo estão associados a um consumo regular e sua biodisponibilidade (HAMINIUK *et al*., 2012).

Foi demonstrado por Teixeira-Guedes *et al*. (2019) que os extratos fenólicos de diferentes tipos de feijões possuem propriedades antioxidantes e conferem proteção contra possíveis danos ao DNA, agindo na inibição de agentes mutagênicos e como quimiopreventivos. Além disso, o consumo de leguminosas pode ajudar a diminuir os riscos de diversos processos patológicos associados ao estresse oxidativo e ao consumo de proteínas de origem animal, especialmente nos países ocidentais.

2.6. Estresse oxidativo e atividade antioxidante de compostos naturais

O estresse oxidativo está relacionado ao aumento da produção de radicais livres, ou então a diminuição da concentração de antioxidantes no organismo (NEHA *et al.*, 2019). Os radicais livres são substâncias químicas que apresentam um ou mais pares de elétrons desemparelhados, tornando-os instáveis e muito reativas com outras espécies (KIM *et al.*, 2015).

A reação de oxidação é vital para o funcionamento adequado do organismo, no entanto, devido à alta reatividade dos radicais livres, as reações de oxidação também podem ser destrutivas para as células. O acúmulo supérfluo de espécies reativas de oxigênio (EROs), prejudica os constituintes celulares, como lipídios, proteínas e DNA. As EROs transformam o DNA rompendo-o e degradando bases nitrogenadas, além de estimular a transformação, translocação e ligação cruzada com proteínas. Consequentemente, isso ocasiona danos ao tecido, resultando em várias doenças, que incluem doenças cardíacas, doenças hepáticas, câncer, doenças neurodegenerativas e envelhecimento (KSIĄŻEK-WINIAREK; GŁĄBIŃSKI, 2015).

Antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações retardam a oxidação de proteínas, carboidratos, lipídios e DNA (SINDHI *et al.*, 2013). O interesse nessas substâncias tem crescido devido ao papel protetor em alimentos e produtos

farmacêuticos contra a deterioração oxidativa, e no corpo, contra os processos patológicos mediados pelo estresse oxidativo (GULCIN, 2020).

Os antioxidantes reagem com os radicais livres por Transferência de Átomos de Hidrogênio (TAH), Transferência de Elétrons (TES) ou a combinação de ambos os mecanismos. No mecanismo do tipo TAH, o radical livre remove um átomo de hidrogênio do antioxidante, assim o próprio oxidante torna-se um radical. Já no mecanismo TES, o antioxidante fornece um elétron para o radical livre e se torna então um radical cátion. Essas duas reações tendem a acontecer de modo simultâneo e o mecanismo reacional é determinado pela estrutura e solubilidade do antioxidante e pelo coeficiente de partição, e a polaridade do solvente (SUN *et al.*, 2020).

Tabela 3. Mecanismos de ensaios químicos comumente usados para avaliar a capacidade antioxidante de compostos naturais.

Ensaio	Fonte do radical livre	Mecanismo de ação
DPPH	DPPH (2,2-difenIl-1-picrilhidrazil) dissolvido em etanol	Transferência simples de elétrons ou transferência de átomo de hidrogênio
ABTS	Oxidação do ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) com persulfato de potássio	Transferência de átomo de hidrogênio
FRAP	Complexo Fe^{3+}/ tripiridiltriazina	Transferência simples de elétrons
ORAC	AAPH (dihidrocloreto de 2,2’-azobis [2-amidinopropano])	Tranferência de elétrons
HO –	Fe^{2+} + H_2O_2; DMSO + H_2O_2; decomposição fotoquímica de H_2O_2	Não definida

O^{2-}	1. Hipoxantina/xantina + O_2 + XOD→O^{2-} + ácido úrico; PMS + NADH→O^{2-}	Não definida
Quelação de Fe^{2+}	Sulfato ferroso ($FeSO_4$) e Cloreto ferroso ($FeCl_2$) e formação do complexo ferrozina-Fe^{2+}	Não definida
Quelação de Cu^{2+}	Sulfato de cobre ($CuSO_4$) e cloreto de cobre ($CuCl_2$) e formação do complexo pirocatecol violeta-Cu^{2+}	Não definida

Fonte: Adaptado de Liang e Kitts (2014) e Sun *et al.* (2020).

O uso de fragmentos aminoacídicos ou peptídicos, a partir de proteínas vegetais intactas, tem despertado o interesse dos pesquisadores, em virtude do alto teor antioxidante (RIZZELLO *et al.*, 2016). As pesquisas desenvolvidas buscam avaliar, além dos benefícios associados à saúde humana, os antioxidantes vegetais que podem ser adicionados aos alimentos, diminuindo, por exemplo, a ocorrência de mudanças oxidativas ao longo do tempo e inibindo a peroxidação lipídica. Além disso, os peptídeos e compostos antioxidantes podem ser usados em produtos cosméticos para neutralizar os radicais livres e, consequentemente, evitar o envelhecimento da pele (OLIVARES-GALVÁN; MARINA; GARCÍA, 2020).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar o potencial biotecnológico de diferentes componentes bioativos obtidos a partir de farinhas e isolados proteicos de variedades de *Phaseolus lunatus*.

3.2. Objetivos específicos

- Capitulo 1:
    - Caracterizar quimicamenteas farinhas obtidas a partir das variedades Mulatinho, Rosinha, Olho de Ovelha, Galo de Campina e Branquinha de *P. lunatus*.
- Capitulo 2:
    - Obter isolados proteicos de diferentes variedades de *P. lunatus* e avaliar o potencial antioxidante após digestão *in vitro*.
- Capitulo 3:
    - Obter compostos fenólicos de diferentes variedades de *P. lunatus* e avaliar a influência da digestão gastrointestinal *in vitro* no conteúdo dos compostos fenólicos totais e na capacidade antioxidante

REFERÊNCIAS

ADEPARUSI, E. O. Effect of processing on the nutrients and anti-nutrients of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) flour. **Food/Nahrung**, v. 45, n. 2, p. 94-96, 2001.

AGOSTINI-COSTA, Tânia da Silveira *et al*. Total phenolics, flavonoids, tannins and antioxidant activity of lima beans conserved in a Brazilian Genebank. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 335-341, 2015.

AKHARUME, Felix U.; ALUKO, Rotimi E.; ADEDEJI, Akinbode A. Modification of plant proteins for improved functionality: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 198-224, 2021.

ALONSO, Rodrigo. *et al.* Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. **Food Chemistry**, v. 68, n. 2, p. 159-165, 2000.

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso),** v. 66, n. 1, 2007.

APONE, Fabio; BARBULOVA, Ani; COLUCCI, Maria Gabriella. Plant and microalgae derived peptides are advantageously employed as bioactive compounds in cosmetics. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 756, 2019.

ASHRAF, Jawad *et al.* Effect of thermosonication pre-treatment on mung bean (*Vigna radiata*) and white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) proteins: Enzymatic hydrolysis, cholesterol lowering activity and structural characterization. **Ultrasonics Sonochemistry**, p. 105121, 2020.

AVILÉS-GAXIOLA, Sara; CHUCK-HERNÁNDEZ, Cristina; SALDIVAR, Sergio O. Inactivation methods of trypsin inhibitor in legumes: a review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 1, p. 17-29, 2018.

AWUCHI, Chinaza Godswill; IGWE, Victory Somtochukwu; ECHETA, Chinelo Kate. The functional properties of foods and flours. **International Journal of Advanced Academic Research**, v. 5, n. 11, p. 139-160, 2019.

AZEVEDO, Joaquim Nazário; FRANCO, Luis José Duarte; ARAÚJO, Rejane Oliveira da Costa. **Composição química de sete variedades de feijão-fava.** Embrapa Meio-Norte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2003.

BASTOS, Ricardo Leoni Gonçalves *et al*. Efeito da utilização de biofertilizantes na produção de biomassa de cultivares de feijão-fava. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 19748-19757, 2020.

CHANDRA, Suresh; SINGH, Samsher; KUMARI, Durvesh. Evaluation of functional properties of composite flours and sensorial attributes of composite flour biscuits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3681-3688, 2015.

CHAWAFAMBIRA, Armistício. Efeito da adição de polpa de fruta de Piliostigma thonningii nas propriedades nutricionais, funcionais e sensoriais de misturas de farinha de milho. **Cogent Food & Agriculture**, v. 7, n. 1, pág. 1911423, 2021.

COLARES, Lara Franca *et al.* Detecção de inibidores de proteases em sementes de *Punica granatum*. **Química Nova**, v. 40, p. 270-274, 2017.

DE MARIA, S.; FERRARI, Giovana; MARESCA, Paula. Effects of high hydrostatic pressure on the conformational structure and the functional properties of bovine serum albumin. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 33, p. 67-75, 2016.

DIAS, Emanuel; PORFILIO, Agamenon; FREIRE, Adriana Galvão. **Semente da Paixão: Catálogo das sementes crioulas da Borborema – Esperança/PB**: AS-PTA, 2016.

EGBE, I. A.; AKINYELE, I. O. Effect of cooking on the antinutritional factors of lima beans (*Phaseolus lunatus*). **Food Chemistry**, v. 35, n. 2, p. 81-87, 1990.

FRANCO, Octávio *et al.* Plant α-amylase inhibitors and their interaction with insect α-amylases: Structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 397-412, 2002.

GARCIA, Tatiana *et al.* Comprehensive genomic resources related to domestication and crop improvement traits in Lima bean. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2021.

GONÇALVES, Alexandre *et al.* Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: nutritional advantages and constraints. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 2941-2951, 2016.

GUIDOTI, David Teixeira *et al*. Interrelationship between morphological, agronomic and molecular characteristics in the analysis of common bean genetic diversity. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 40, 2018.

GUIMARÃES, Walma NR *et al.* Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 37-45, 2007.

GULÃO, Eliana da Silva *et al.* Stability and rheological behavior of coconut oil-in-water emulsions formed by biopolymers. **Polímeros**, v. 28, p. 413-421, 2018.

GULCIN, İlhami. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651-715, 2020.

HABIBA, Ramadan. Changes in anti-nutrients, protein solubility, digestibility, and HCl-extractability of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods. **Food Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 187-192, 2002.

HALL, Alexandra; MORARU, Carmen. Effect of high pressure processing and heat treatment on *in vitro* digestibility and trypsin inhibitor activity in lentil and faba bean protein concentrates. **LWT - Food Science and Technology**, p. 112342, 2021.

HAMINIUK, Charles W. I. *et al*. Phenolic compounds in fruits – an overview. **Journal Food Science and Technology**, v. 27, p. 2023-2044, 2012.

HASMADI, M. *et al*. Functional properties of composite flour: a review. **Food Research**, v. 4, n. 6, p. 1820-1831, 2020.

HERTZLER, Steven R. *et al.* Plant proteins: Assessing their nutritional quality and effects on health and physical function. **Nutrients**, v. 12, n. 12, p. 3704, 2020.

IBGE, Censo. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**-IBGE. 2016.

IBGE, Censo. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**-IBGE. 2018.

ILIAS, Loannis *et al.* Antidiabetic drugs and blood pressure changes. **Pharmacological Research**, p. 105108, 2020.

JONES, D. B. *et al.* The proteins of the Lima bean, *Phaseolus lunatus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 231-240, 1922.

JULIANTI, Elisa *et al.* Functional and rheological properties of composite flour from sweet potato, maize, soybean and xanthan gum. Journal of the Saudi **Society of Agricultural Sciences**, v. 16, n. 2, p. 171-177, 2017.

KIM, Geon Ha *et al.* The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325, 2015.

KÖHN, Cecília *et al.* Assessment of different methods for determining the capacity of water absorption of ingredients and additives used in the meat industry. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 1, 2015.

KSIĄŻEK-WINIAREK, Dominika; GŁĄBIŃSKI, Andrzej. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. In: **Studies on Psychiatric Disorders. Humana Press**, New York, NY, 2015. p. 151-167.

KUMAR, Yogesh *et al.* Anti-nutritional compounds in pulses: Implications and alleviation methods. **Legume Science**, p. e111, 2021.

LANDETE, José Maria. Updated knowledge about polyphenols: Functions, bioavailability, metabolism, and health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 10, p. 936-48, 2012.

LEITÃO FILHO, Hermógenes de Freitas. Contribuição ao estudo taxonômico do gênero Phaseolus L: no Brasil. **Bragantia**, v. 33, p. 55-63, 1974.

LEMOS, Virgínia Carvalho; REIMER, Julia Jessica; WORMIT, Alexandra. Color for life: Biosynthesis and distribution of phenolic compounds in pepper (*Capsicum annuum*). **Agriculture**, v. 9, n. 4, p. 81, 2019.

LIANG, Ningjian; KITTS, David. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 19180-19208, 2014.

LORENSEN, Elke; PREVOSTO, Regina; WILSON, Karl A. The appearance of new active forms of trypsin inhibitor in germinating mung bean (*Vigna radiata*) seeds. **Plant Physiology**, v. 68, n. 1, p. 88-92, 1981.

MARUATONA, Gaamangwe Nehemiah; DUODU, Kwaku Gyebi; MINNAAR, Amanda. Physicochemical, nutritional and functional properties of marama bean flour. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 400-405, 2010.

MEENA, Supriya *et al.* Biologia futura: medicinal plants-derived bioactive peptides in functional perspective-a review. **Biologia Futura**, p. 1-14, 2020.

MICHELI, Laura *et al.* *Phaseolus vulgaris* L. extract: Alpha-amylase inhibition against metabolic syndrome in mice. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1778, 2019.

MUDAU, Masala *et al.* Physicochemical characteristics of bread partially substituted with finger millet (*Eleusine corocana*) flour. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, 2021.

NEHA, Kumari *et al.* Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 687-704, 2019.

NIEDZWIECKI, Aleksandra *et al*. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. **Nutrients**, v. 8, p. 552, 2016.

NWACHUKWU, Ifeanyi; ALUKO, Rotimi. **Food Protein Structures, Functionality and Product Development**. 2021.

OKEZIE, Onuma; BELLO, August. Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 2, p. 450-454, 1988.

OLIVARES-GALVÁN, Saúl; MARINA, María Luisa; GARCÍA, María Concepción. Extraction and characterization of antioxidant peptides from fruit residues. **Foods**, v. 9, n. 8, p. 1018, 2020.

OLIVEIRA, Fabricia Nascimento; TORRES, Salvador Barros; BENEDITO, Clarisse Pereira. Caracterização botânica e agronômica de acessos de feijão-fava, em Mossoró, RN. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 1, p. 143-148, 2011.

PEDROSA, Mercedes M. *et al.* Effect of instant controlled pressure drop on the oligosaccharides, inositol phosphates, trypsin inhibitors and lectins contents of different legumes. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 862-868, 2012.

PEREIRA FILHO, João V. *et al.* Physiological responses of lima bean subjected to salt and water stresses. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n. 12, p. 959-965, 2019.

PHONGTHAI, Suphat *et al.* Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 240, p. 156-164, 2018.

PORTELA, Gilson Lages Fortes *et al.* Silicon as resistance inducer in to control black aphid *Aphis craccivora* Koch, 1854 in *Phaseolus lunatus* lima beans. **Arquivos do Instituto Biológico**, p. e0512018-e0512018, 2019.

RAFIEI, Bahareh *et al.* Purification and characterization of α-amylase in *Moroccan locust*, *Dociostaurus maroccanus* Thunberg (*Orthoptera: Acrididae*) and its inhibition by inhibitors from *Phaseolus vulgaris* L. **Toxin Reviews,** v. 35, n. 3-4, p. 90-97, 2016.

RAMIREDDY, Lokeswari; RADHAKRISHNAN, Mahendran. Cold plasma applications on pulse processing. **Pulse Foods. Academic Press**, 2021. p. 295-307.

RIZZELLO, Carlo G. *et al.* Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 549-569, 2016.

RODDA, Harish C.; SANDHYA, T.; SWETHA, P. Evaluation of [alpha]-amylase inhibitory activity of some clinically used drugs. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 5, p. 1843, 2014.

SALAWU, Sule O. *et al.* Antioxidant indices and amino acid composition of phenolic containing Lima beans (*Phaseolus lunatus*) after simulated human gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Studies**, v. 8, n. 1, 2019.

SAMTIYA, Mrinal; ALUKO, Rotimi; DHEWA, Tejpal. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: An overview. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 2020.

SEGURA-CAMPOS, Maira Rubi. Isolation and functional characterization of chia (*Salvia hispanica*) proteins. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 334-339, 2019.

SELAMASSAKUL, Orrapun *et al.* A novel multi-biofunctional protein from brown rice hydrolysed by endo/endo-exoproteases. **Food & Function**, v. 7, n. 6, p. 2635-2644, 2016.

SHI, Lan *et al.* Changes in levels of enzyme inhibitors during soaking and cooking for pulses available in Canada. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 1014-1022, 2017.

SILVA, Maira Oliveira *et al*. Phenolic compounds and antioxidant activity of two bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) submitted to cooking. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

SINDHI, Vinita *et al.* Potential applications of antioxidants - A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 828-835, 2013.

SOLLANO-MENDIETA, Xochitl Cruz *et al*. Effect of *in vitro* digestion on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of 12 plum (*Spondias purpurea* L.) ecotypes. **Foods**, v. 10, n. 9, p. 1995, 2021.

SOLOMON, Solomon Gabriel; OKOMODA, Victor Tosin; ODA, Samson Omirenya. Nutritional value of toasted pigeon pea, *Cajanus cajan* seed and its utilization in the diet of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings. **Aquaculture Reports**, v. 7, p. 34-39, 2017.

SOUSA, Antônia Maria de Cássia Batista de *et al.* Prediction of grain yield, adaptability, and stability in landrace varieties of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, n. 1, 2020.

SOUZA, Tiago Pinho *et al.* Seleção de acessos promissores de feijão-fava na Baixada Fluminense, RJ, por meio de descritores morfoagronômicos. **Magistra**, v. 30, p. 211-224, 2019.

SUN, Xiaohong *et al.* Peptide–mineral complexes: Understanding their chemical interactions, bioavailability, and potential application in mitigating micronutrient deficiency. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1402, 2020.

SUNEJA, Yadhu *et al.* Levels of nutritional constituents and antinutritional factors in black gram (*Vigna mungo* L. Hepper). **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 621-628, 2011.

ŚWIECA, Michał; BARANIAK, Barbara. Influence of elicitation with H_2O_2 on phenolics content, antioxidant potential and nutritional quality of *Lens culinaris* sprouts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 3, p. 489-496, 2014.

TAMAYO, Javier *et al.* Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities of proteins of *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) baby lima beans produced in Ecuador. **BioRxiv**, p. 401323, 2018.

TEIXEIRA-GUEDES, Catarina I. *et al*. Impact of cooking method on phenolic composition and antioxidant potential of four varieties of *Phaseolus vulgaris* L. and *Glycine max* L. **LWT - Food Science and Technology**, v. 103, p. 238-246, 2019.

VERMA, Deepak Kumar; THAKUR, Mamta (Ed.). Phytochemicals in food and health: Perspectives for research and technological development. 1ª edição. Florida: **CRC Press**, 2021.

YADA, Rickey Y. (Ed.). **Proteins in Food Processing**. Woodhead Publishing, 2017.

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

YEGREM, Lamesgen. Nutritional composition, antinutritional factors, and utilization trends of Ethiopian chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Food Science,** v. 2021, 2021.

ZHU, Songming *et al.* Enhancement of functional properties of rice bran proteins by high pressure treatment and their correlation with surface hydrophobicity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 2, p. 317-327, 2017.

CAPÍTULO1

Propriedades nutricionais, funcionais e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourrier (FTIR) da farinha de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)

A ser submetido no *Journal of Food Science and Technology*

Propriedades nutricionais, funcionais e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourrier (FTIR) da farinha de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)

RESUMO

O uso de produtos de origem agrícola, dentre os quais sementes de leguminosas pode ser uma alternativa econômica para a indústria alimentar e farmacêutica para o desenvolvimento de ingredientes funcionais. Objetivou-se caracterizar os aspectos funcionais, nutricionais e espectros de infravermelho das farinhas de *P. lunatus* obtidas a partir das variedades Mulatinho, Rosinha, Olho de Ovelha, Galo de Campina, Lavandeira e Branquinha. Foram avaliados os fatores antinutricionais, a capacidade de absorção de água (CAA) e de óleo (CRO), a solubilidade em água (ISA), a capacidade de formação de espuma (CFE), emulsificante (CE), estabilidade da espuma (EFE), emulsão das farinhas (EE), bem como os espectros de inframermelho das seis variedades. As farinhas apresentaram baixos índices de inibidores de tripsina (2,21 - 2,24 UIT.g^{-1}) e elevados índices de inibidores de amilase (4,68 – 13,52 UIT.g^{-1}), ademais, o CAA (149 - 240 g.g^{-1}), ISA (2,54 -2,83 g.g^{-1}), CRA (0,63 – 102 g.g^{-1}), CE e EE mantiveram-se acima de 50%, e com estabilidade após 60 min. Observou-se picos nas faixas espectrais entre 500 e 3350 cm^{-1} com regiões de estiramento na OH, CH, anéis aromáticos, amida I e amida II. Os resultados do presente estudo mostram que farinhas das variedades de *P. lunatus* podem ser usadas como um substituto potencial em formulação de produtos alimentícios com alto valor nutricional e melhoria das características de tecnológicas.

Palavras-chave: Alimentos funcionais; nutracêutico; compostos bioativos; fava.

1. INTRODUÇÃO

As proteínas animais apresentam todos os aminoácidos essenciais nas proporções especificadas pela Organização Mundial da Saúde. No entanto, devido ao aumento populacional e, consequentemente no consumo proteico, bem como no preço dos alimentos, a disponibilidade limitada das proteínas animais e as preocupações em relação a segurança proteica de origem animal, é crescente a procura por aquelas comestíveis de origem vegetal (VINAYASHREE; VASU, 2021).

Proteínas de origem vegetal são consideradas as melhores alternativas para substituir fontes animais, além disso, são relativamente mais baratas e abundantes. Dentre os vegetais com elevado conteúdo proteico destacam-se as leguminosas, cosumidas na forma de grãos e comuns nas dietas tradicionais em todo o mundo, que é fonte de diversos nutrientes como carboidratos de lenta digestão, fibra dietética,

minerais, vitaminas, e sobretudo, proteína (KOURIS-BLAZOS; BELSKI, 2016). Ademais, sementes de leguminosas apresentam diferentes substâncias bioativas, tais como fenólicos, flavonoides e peptídeos bioativos, que podem oferecer, benefícios para a saúde humana, principalmente porque são capazes de interagir com enzimas relacionadas à fisiopatologias (CAKIR *et al.*, 2019; HERTZLER *et al.*, 2020).

Phaseolus lunatus, também conhecida como feijão-fava, apresenta diversas variedades cultivadas em todo o globo, exceto no continente Antártico, suas sementes são empregadas na culinária, sendo a segunda espécie do gênero mais consumida no mundo, exibindo grande diversidade de variedades e cultivares ainda pouco, caracterizadas nutricionalmente as substâncias (LACERDA *et al.*, 2017).

A utilização de produtos de origem agrícola, para o desenvolvimento de novos ingredientes funcionais, visando o enriquecimento alimentar, dentre eles as sementes de leguminosas, poderá ser uma alternativa econômica para a indústria alimentar e farmacêutica (OSORIO; FLOREZ-LOPEZ; GRANDE-TOVAR, 2021). Assim, as proteínas do feijão-fava presentes na farinha e/ou isolados proteicos com benefícios para a saúde serão de grande utilidade com aplicação alimentar se as proteínas tiverem propriedades bioquímicas, nutricionais e funcionais favoráveis (SHARAN *et al.*, 2021).

Para utilização de farinhas e proteínas de origem vegetal são necessárias sua caracterização química e bioquímica, e a avaliação de propriedades funcionais desejáveis, tais como, solubilidade proteica, capacidade de retenção de água e óleo, capacidade emulsificante e de formação de espuma, e ausência de fatores antinutricionais, como os inibidores de α-amilase e tripsina (DE MARIA; FERRARI; MARESCA, 2016; PHONGTHAI *et al.*, 2018; NWACHUKWU; ALUKU, 2021).

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo caracterizar os aspectos funcionais, nutricionais e os espectros de infravermelho das farinhas obtidas a partir das variedades Mulatinho, Rosinha, Lavandeira, Olho de Ovelha, Galo de Campina e Branquinha de *P. lunatus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das farinhas de *Phaseolus lunatus* L. e determinação da composição centesimal

Foram utilizados grãos de *P. lunatus*, das variedades Branquinha, Galo de Campina, Lavandeira, Rosinha, Olho de Ovelha e Mulatinho, foram adquiridas no comércio local, no município de Garanhuns, Pernambuco/Brasil. Para preparo das farinhas os grãos foram triturados, e tamisados (18 mesh) em moinho de facas (Marconi, MA 340, São Paulo) e a farinha resultante foi seca em estufa de circulação forçada a 60 ºC até peso costante, e posteriormente armazenadas a 25 ºC para as determinações analíticas.

Os teores de umidade, cinzas, proteínas (utilizando fator de conversão 6,25) e lipídios, foram determinados, em triplicata, nas farinhas cruas, de acordo com metodologia descrita pela AOAC (2003). O teor de carboidratos na base seca (%CHO) foi determinado por diferença, utilizando a Equação 1.

$$\%CHO = 100 - proteína - lipídeo - fibra$$

(Equação 1)

Enquanto o valor energético total (VET) foi determinado pela Equação 2.

$$VET = Proteína * 4 + CHO * 4 + Lipídeo * 9$$

(Equação 2)

2.2. Análise dos espectros de infravermelho com transformada de Fourrier

Para medições espectroscópicas FT-IR, empregou-se um espectrometro de infravermelhos com transformada de Fourrier Shimadzu (IRPrestige-21, Laval, Canadá). Os espectros das seis amostras em triplicata foram obtidos com resolução de 4 cm^{-1} com um intervalo de número de ondulação de 450 a 4000 cm^{-1} em 50

varreduras. Os espectros foram recolhidos em percentagem transmitância a partir de quantidades constantes nas seis amostras em pastilhas misturadas ao brometo de potássio (KBr). As pastilhas de KBr foram preparadas misturando 300 mg de KBr com 1 mg d*as* amostras de farinha das seis variedades *de P. lunatus* e prensagem do pó num sistema de formação de pellets a 10 toneladas de pressão. Um branco empregando pastilhas de KBr sem amostra foi utilizado para zerar o equipamento.

2.3. Inibição de tripsina

A análise dos inibidores de tripsina foi realizada segundo a metodologia descrita por Arnon (1970). Os extratos a 1% (p/v) das farinhas das seis variedades de feijão-fava foram solubilizadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6, e mantidas a 4 ºC por 30 min sob agitações periódicas, posteriormente, sucedeu-se centrifugação a 4000 x *g* por 5 min a 4 ºC. Para a reação, 125 µL do extrato foi adicionado a 100 µL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6, e 100 µL de solução de tripsina 0,5 $mg.mL^{-1}$. A mistura reacional foi incubada por 10 min a 37 ºC e, adicionou-se 250 µL de solução de caseína 1% (p/v), incubado por mais 10 min a 37 ºC. A reação foi interrompida com a adição de 750 µL de ácido tricloroacético (10% v/v) e os tubos deixados à 25 ± 2 ºC por 30 min. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 4000 x *g* por 10 min a 4 ºC e a leitura da absorbância realizada no comprimento de onda de 280 nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra, Cambridge, Reino Unido). O controle foi realizado com água substituindo a amostra. Uma unidade de enzima (UE) foi definida como sendo a alteração de 0,1 na absorbância a 280 nm. A unidade de inibição (UIT) foi determinada de acordo com a Equação 3.

$$UIT(UI/g) = UI_{enzima\ sem\ extrato} - UI_{enzima\ com\ extrato}$$

(Equação 3)

2.4. Inibição de α-amilase

A capacidade de inibição de α-amilase foi determinada, de acordo com Deshpande *et al.* (1982), usando amido como substrato. Farinhas de feijão-fava 1% (p/v) foram solubilizadas em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, sob agitação periódica a 4 ºC por 30 min. A reação foi conduzida adicionando-se 100 µL de solução de amido 0,5% (p/v) em um tubo contendo 20 µL de extrato da farinha, 60 µL de

tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, e 20 µL de α-amilase (4 $mg.mL^{-1}$). A mistura reacional foi incubada a 40 ºC, por 15 min. Da reação foram coletados 100 µL, e acrescido de 1000 µL do reagente DNSA (ácido 3,5-dinitrossalicílico) e incubada em banho fervente (100 ºC), por 5 min, e interrompida com banho de gelo (MILLER, 1959). As amostras foram, então, resfriadas em banho de gelo e a leitura da absorbância realizada a 550 nm. A atividade da α-amilase foi expressa em unidades (U) que correspondem à formação de um µmol de açúcar redutor por min nas condições de ensaio. Uma unidade de inibição de α-amilase ($UIA.g^{-1}$) corresponde à inibição total de 1 U de α-amilase por grama de farinha.

2.5. Determinação da digestibilidade das farinhas

2.5.1. Digestibilidade proteica *in vitro*

A digestibilidade proteica (DP) *in vitro* foi determinada pelo método multienzimático descrito por Akeson e Stahmann (1964), com modificações de Mauron (1973). Em 200 mg de farinha foram adicionados 5 mL de uma solução de pepsina 4 $mg.mL^{-1}$ em HCl 0,1 $mol.L^{-1}$, pH 2,5. A reação foi incubada a 37 ºC por 3 h. Logo após, o pH das amostras foi ajustado para pH 8,0 com uma solução de NaOH 200 mM e adicionou-se 4 mL de uma solução de pancreatina 10 $mg.mL^{-1}$ em tampão fosfato pH 8,0, sendo a suspensão incubada a 37 ºC por 4 h. A digestão foi interrompida com a adição de 1 mL de solução de ácido tricloroacético 50% (p/v). Um controle utilizando caseína em substituição as amostras, posteriormente centrifugadas a 4000 x *g* por 10 min a 4 ºC, o sobrenadante foi quantificado de acordo coma metodologia descrita por Bradford (1976), usando leucina como padrão. A extensão da hidrólise foi calculada de acordo com a Equação 4:

$$DP(\%) = \frac{[leucina]\ na\ farinha\ hidrolisada - [leucina]\ na\ farinha}{[leucina] na\ caseína\ hidrolisada - [leucina]\ na\ caseína} x100$$

(Equação 4)

2.5.2. Digestibilidade de amido *in vitro*

A digestibilidade de amido (DA) *in vitro* foi determinada de acordo com metodologia adaptada de Zabidi e Aziz (2009). No ensaio continha 200 $mg.mL^{-1}$ de farinha solubilizadas em 5 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,6, com 100 µL de α-amilase de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich). Transcorrido este período, a reação foi resfriada e o pH ajustado para 4,8 com solução de acetato de sódio 0,1 M e incubou-se por 2 h, a 55 ºC na presença de pancreatina. A solução foi aquecida a 100 ºC por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 4000 x *g* por 10 min e a quantidade de açúcar redutor no sobrenadante foi determinada utilizando o método descrito por Miller (1959). Foram adicionados 100 µL do hidrolisado a 1000 µL de reativo DNSA e a mistura reacional foi fervida por 5 min. Os tubos foram resfriados até alcançarem a temperatura ambiente (25±2 ºC), durante 15 min, e a absorbância foi lida a 550 nm. A digestibilidade do amido da farinha foi expressa como porcentagem de açúcar redutor obtida após a hidrólise, usando uma solução de amido 1% (p/v) como controle, e para os cálculos utilizou-se a Equação 5.

$$DA(\%) = \frac{[açúcar\ redutor]na\ farinha\ hidrolisada - [açúcar\ redutor]na\ farinha}{[açúcar\ redutor]no\ amido\ hidrolisada - [açúcar\ redutor]\ no\ amido} x100$$

(Equação 5)

2.6. Características funcionais e tecnológicas

2.6.1. Capacidade de absorção de água

A capacidade de absorção de água (CAA) das farinhas foi determinado segundoa metodologia adaptada de Okezie e Bello (1988). Uma suspensão com 25 mL de água e 0,5 g de farinha (base seca) foi preparada em tubos de centrífuga com tampa. Os tubos foram agitados por 1 min em vortex e centrifugados a 3800 x *g* por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o material remanescente (farinha úmida) foi pesado. A diferença entre o peso da amostra antes e após a absorção de água representou a quantidade de água absorvida. A medida do índice de absorção de água foi calculada de acordo com a Equação 6.

$$CAA = \frac{água\ absorvida\ pela\ amostra(g)}{peso\ da\ amostra(g)}$$ **(Equação 6)**

2.6.2. Solubilidade em água

A solubilidade em água (ISA) foi determinada de acordo com Okezie e Bello (1988). Uma suspensão com 25 mL de água e 0,5 g de farinha (base seca) foi preparada em tubos de centrífuga com tampa, agitados por 1 min em seguida centrifugados a 3800 *x g* por 20 min *a* 4 ºC. O foi adicionado em uma placa de Petri previamente tarada, incubada em estufa para secagem a 60 ºC por 24 h. A solubilidade em água foi calculada pela relação entre o peso do resíduo seco do sobrenadante (resíduo de evaporação) e o peso inicial da amostra, conforme a Equação 7.

$$ISA = \frac{resíduo\ de\ evaporação\ (g)}{peso\ da\ amostra\ (g)}$$

(Equação 7)

2.6.3. Capacidade de absorção de óleo

A capacidade de absorção de óleo (CAO) foi determinada conforme metodologia descrita por Okezie e Bello (1988), substituindo a água por óleo de soja. Os resultados foram calculados de acordo com a Equação 8.

$$CAO = \frac{óleo\ absorvido\ pela\ amostra(g)}{peso\ da\ amostra(g)}$$

(Equação 8)

2.6.4. Atividade emulsificante

A atividade emulsificante (AE) das farinhas foi determinada utilizando a metodologia descrita por Yasumatsu *et al.* (1972). Uma suspensão foi preparada contendo 1 g de amostra, 10 mL de água destilada e 10 mL de óleo de soja foi emulsificada em velocidade moderada em agitador de haste por 1 min. A emulsão

formada foi dividida em tubos graduados (15 mL), e centrifugada a 1500 *x g*, por 5 min, a 4 ºC. Para o cálculo da atividade emulsificante foi utilizada a Equação 9.

$$AE = \frac{volume\ da\ camada\ emulsificada}{volume\ total\ do\ tubo} x100$$

(Equação 9)

2.6.5. Estabilidade da emulsão

Para determinar a estabilidade da emulsão uma suspensão foi preparada contendo 1 g de amostra, 10 mL de água destilada e 10 mL de óleo de soja foi emulsificada em agitador de haste (AM-70, Gehaka, São Paulo Brasil) por 1 min., em velocidade moderada. A emulsão formada foi dividida em tubos graduados (15 mL), aquecida em banho-maria por 30 min a 80 ºC. Os tubos foram resfriados por 20 min., e centrifugados a 1500 x *g* por 5 min a 4 ºC. A estabilidade da emulsão foi calculada através da Equação 10.

$$EE = \frac{volume\ da\ camada\ emulsificada\ remanescente}{volume\ total\ da\ camada\ emulsificada\ no\ tubo} x100$$

(Equação10)

2.6.6. Capacidade espumante

A capacidade de formação de espuma (CE) foi determinada de acordo com metodologia adaptada de Coffmann e Garcia (1977). Uma suspensão de 1 g de amostra em 50 mL de tampão fosfato de sódio pH 8,0 foi preparada em béquer de polietileno de 100 mL, agitada a 250 rpm por 5 min em agitador de haste (AM-70, Gehaka, São Paulo Brasil). Transferiu-se a dispersão para uma proveta graduada de 100 mL e, calculou-se o aumento percentual do volume com base nos volumes inicial e final após a formação de espuma (Equação 11).

$$\%aumento\ de\ volume = \frac{volume\ final - volume\ inicial}{volume\ inicial} 5x100$$

(Equação 11)

2.6.7. Estabilidade da espuma

A proveta contendo a espuma obtida no procedimento anterior foi mantida a temperatura ambiente e a estabilidade da espuma (EE) foi avaliada por meio da verificação da redução percentual do volume em intervalos de 15, 30, 45 e 60 min e a estabilidade da espuma calculada de acordo com a equação 12.

$$\%aumento\ de\ volume = \frac{volume\ final - volume\ inicial}{volume\ inicial} x100$$

(Equação 12**)**

2.6.8. Estabilidade da espuma

A proveta contendo a espuma obtida no procedimento anterior foi mantida a temperatura ambiente e a estabilidade da espuma (EE) foi avaliada por meio da verificação da redução percentual do volume em intervalos de 15, 30, 45 e 60 min e a estabilidade da espuma calculada de acordo com a equação 12.

$$\%\ aumento\ de\ volume = \frac{volume\ final - volume\ inicial}{volume\ inicial}\ x\ 100$$

(Equação 12)

2.7. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados foram expressos como média ± desvio-padrão. A análise de variância unidirecional (ANOVA) foi realizado no software SISVAR (Versão: 5.6, UFLA, Brasil), sendo realizado o teste post-hoc de Scott-Knott, no qual $p < 0,05$, indicando que as diferenças foram estatisticamente significativas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Rendimento e análise centesimal das variedades *Phaseolus lunatus* L. estudadas

Os grãos de *P. lunatus* das variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6) apresentaram para a farinha rendimento de 88,85%, 89,45%, 93,30%, 89,52%, 92,39% e 88,59% por quilo de grão, respectivamente.

Os resultados da composição centesimal das farinhas de *P. lunatus* estão apresentados na Tabela 1. Foram observados teores de umidade entre 8,13 e nn 10,18%; proteína entre 17,55 e 26,13%; de lipídeos entre 0,86 e 1,23%; e de fibra e cinzas variaram de 2,47 e 4,62%, e 3,01 e 4,11%, respectivamente. Os teores de carboidratos apresentaram-se entre 69,35 e 77,98% e o valor energético total entre 389,27 e 393,98 Kcal. O conhecimento em relação a composição nutricional das farinhas de feijão-fava é necessário porque as farinhas de diferentes variedades têm diferencial no perfil nutricional (SANTOS *et al.*, 2021), além disso, a presença de proteínas, gorduras e amido influenciam diretamente nas propriedades funcionais e tecnológicos (PALUPI *et al.*, 2021).

Tabela 1. Composição centesimal de de *Phaseolus lunatus* L., variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).

Parâmetros	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Umidade (%)	8,37±0,26	10,18±0,27	9,37±0,24	8,53±0,18	8,13±0,11	9,53±0,10
Proteína (%)	26,13±1,08	25,41±1,18	17,55±0,92	23,14±0,37	25,73± 0,72	22,01±1,60
Gordura (%)	1,34±0,18	0,87±0,08	1,33±0,23	0,86±0,05	0,98± 0,06	1,14±0,07
Fibras (%)	3,78±0,20	4,43±0,27	2,47±0,48	4,41± 0,34	4,62± 0,29	3,44±0,26
Cinzas (%)	3,18±0,20	3,72±0,14	3,13±0,09	3,34± 0,24	3,01±0,03	4,11±0,10
Carboidrato (%)	69,35±0,82	70,00±1,22	77,98±0,72	72,67±0,63	70,27±0,76	72,74±1,57
Valor energético total (Kcal)	393,98±0,63	389,49±1,02	394,16±0,86	390,92±0,71	392,86±0,20	389,27± 0,77

Dados expressos em média ± desvio padrão

De acordo com Azevedo, Franco e Araújo (2003) e por Pereira-Filho *et al.* (2019), que avaliaram a composição química dos grãos diferentes variedades de *P. lunatus*, encontraram níveis médios de 91,42% de matéria seca, 23,60% de proteína bruta, 1,06% de extrato etéreo, 3,90% de fibra bruta, 3,52% de cinzas e 67,93% de extrato não nitrogenado indicando que não ocorre perda na qualidade nutricional da farinha em relação aos grãos como demonstram os resultados encontrados no presente estudo.

3.2. Espectros de infravermelho com transformada de Fourrier

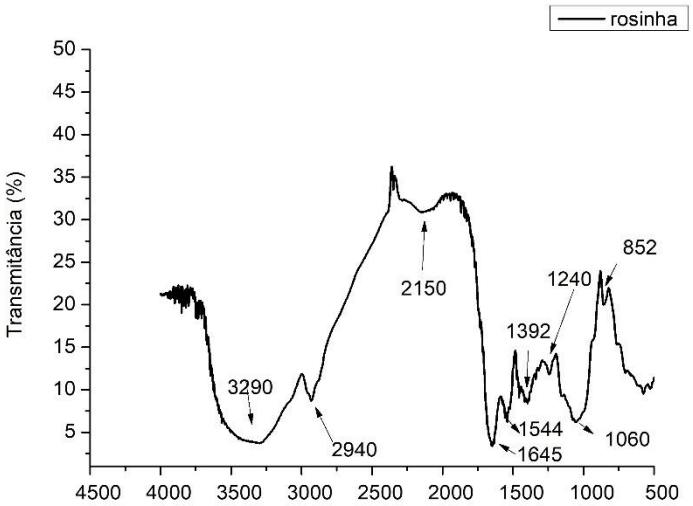
Picos das seis variedades foram observadas nas regiões espectrais entre 3350 e 500 cm^{-1} (Figura 1), o que indica a presença de diversos grupos químicos que caracterizam os componentes das proteínas, gordura e carboidratos. Os picos observados nas regiões 4500-3000 cm^{-1} correspondem a região de estiramento dos grupos hidroxílicos (O-H) associado e quelato, presentes na D-glicose do amido, que é o principal constituinte das farinhas de *P. lunatus.* Essa faixa espectral de bandas orgina-se, sobretudo, da vibração da amilose e amilopectina (SUJKA; KOCZOŃ, 2018; TYSKA *et al*., 2021). Ademais, segundo Ikram *et al.* (2021) o pico na região entre 2940 a 1924 cm^{-1} indica presença de grupos alifáticos (região de estiramento do CH).

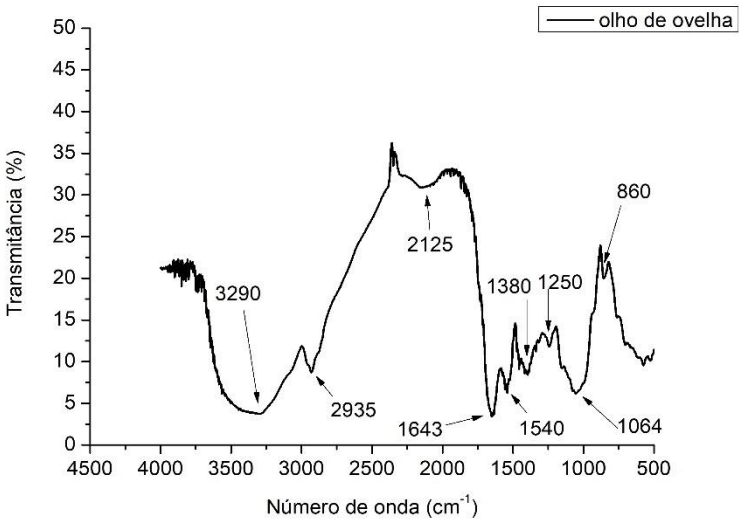
Ao analisar os espectros das diferentes variedades de *P. lunatus,* Figura 1, observa-se faixas espectrais nas 1500 a 800 cm^{-1} que, de acordo com Swer *et al*., (2018) uma região de impressão digital, além disso indicam a presença de anéis aromáticos e deformação angular dos grupos etila e propila.

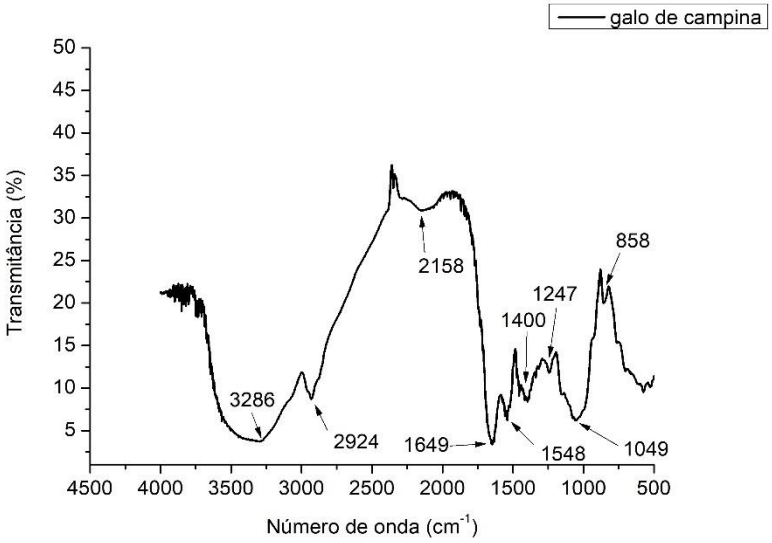
As bandas de absorção de amida primária e secundária presentes nas amostras de feijão-fava foram observadas entre 1653 e 1650 cm^{-1} e entre 1548-1540 cm^{-1}, respectivamente. A amida I surge do trecho de C=O do grupo peptídico na proteína já banda amida II é principalmente da flexão NH e secundariamente do efeito do estiramento CN. A forte absorbância do trecho NH nos espectros indicam que as variedades de *P. lunatus* é rica em proteínas (RANI; SING, 2018).

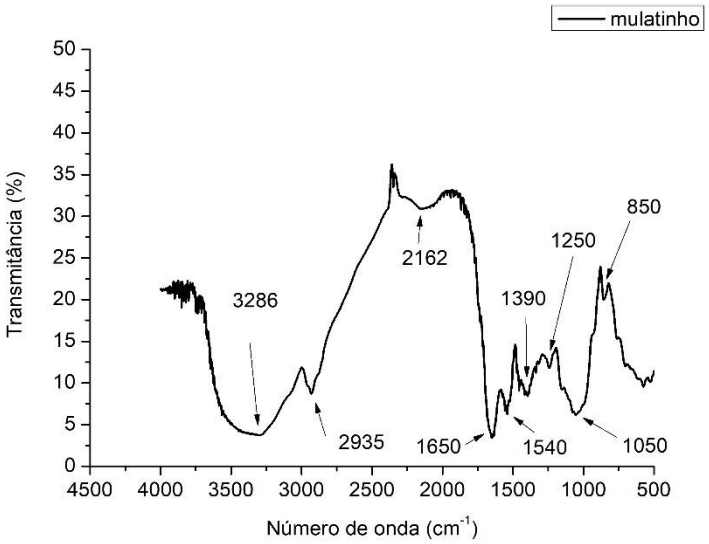
Figura 1. Espectro FTIR das farinhas de *Phaseolus lunatus,* variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e

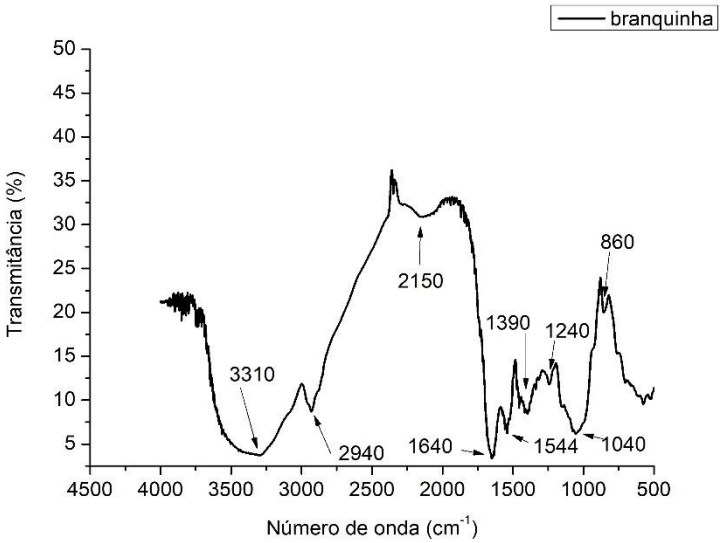
Lavandeira (V6).

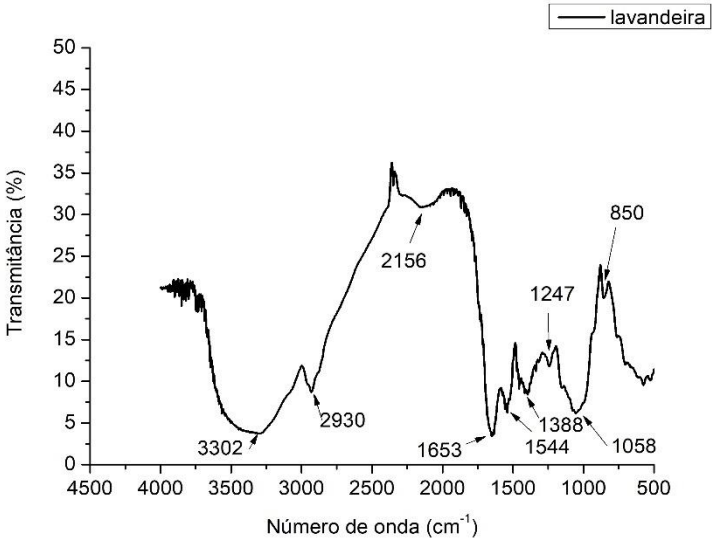







mulatinho
Transmitância (%)
Número de onda (cm-1)
3286
2935
2162
1650
1390
1540
1250
1050
850


branquinha
Transmitância (%)
Número de onda (cm-1)
3310
2940
2150
1640
1390
1544
1240
1040
860


lavandeira
Transmitância (%)
Número de onda (cm-1)
3302
2930
2156
1653
1388
1544
1247
1058
850

A gordura bruta das amostras de farinha de *Phaseolus. lunatus* foi observada com picos entre 1600 a 1500 cm^{-1} determinados, conforme Jiang *et al*., (2016), com base nas ligações CH, dessa forma, os espectros de absorção da farinha de feijão-fava tomados também mostram picos fortes na mesma região que representam presença de gordura na farinha.

3.3. Inibição de tripsina, amilase e digestibilidade *in vitro* das farinhas de *Phaseolus lunatus* L.

Os inibidores de tripsina presentes nas farinhas de feijão-fava do estudo mantiveram-se entre 2,21 e 2,24 $UIT.g^{-1}$ da amostra (Tabela 2). A análise de variância demonstrou que as variedades V1, V4 e V5 foram estatisticamente iguais, no entanto, diferiram das variedades V2, V3 e V4 que, por sua vez, mantiveram o mesmo potencial de inibição. Os inibidores de tripsina, bem como os encontrados nas diferentes variedades de *P. lunatus*, podem inibir a proteólise causada pelas células transformadas, e, dessa forma, inibir metástase, angiogênese, crescimento e proliferação tumoral, uma vez que esses eventos necessitam de proteases para ocorrer; reduzindo principalmente a ocorrência de câncer de cólon, próstata, pele e mama (HSIEH *et al.,* 2010).

Em relação ao processo digestivo, de acordo Cuccioloni *et al*., (2016), essas proteínas inibitórias podem atuar tanto diretamente, visando receptores pró-inflamatórios específicos, quanto indiretamente, prejudicando a atividade das enzimas digestivas, sendo que este último evento causa o acúmulo de peptídeos não digeridos com propriedades imunogênicas potenciais em indivíduos predispostos, no entanto, os resultados aqui obtidos não podem ser extrapolados a esse ponto.

Tabela 2. Fatores antinutricionais e digestibilidade da proteína e do amido de *Phaseolus lunatus*, variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).

Variedades	Inibição de tripsina ($UIT.g^{-1}$)	Inibição de α-amilase ($UIA.g^{-1}$)	Digestibilidade do amido (%)	Digestibilidade proteica (%)

V1	2,24±0,0[a]	4,68±0,94[e]	83,29±0,36[a]	99,95±0,02[a]
V2	2,22±0,01[b]	7,10±0,26[c]	77,83±0,24[b]	99,43±0,01[a]
V3	2,23±0,00[b]	9,42±0,88[b]	74,71±3,15[b]	99,37±0,15[a]
V4	2,25±0,01[a]	8,26±1,22[c]	82,36±1,11[a]	99,47±0,02[a]
V5	2,24±0,00[a]	5,60±0,87[d]	80,9±0,44[a]	99,61±0,01[a]
V6	2,21±0,01[b]	13,52±0,30[a]	74,75± 0,23[b]	99,77±0,01[a]

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as variedades (p < <0,05).

De acordo com Lima *et al.*, (2019), os inibidores de tripsina presentes em leguminosas como o gênero *Phaseolus* apresentam potencial regulatório na atividade da elastase em neutrófilos, diminuem agregação plaquetária, fibrinólise, além disso, a presença de inibidores de tripsina pode favorecer a perda de peso corpóreo, devido a regulação do apetite.

Os resultados de inibição de α-amilase encontrados no presente estudo demonstram que o potencial inibitório das variedades testadas se manteve entre 5,6 e 13,52 UIA.g^{-1} de amostra. A presença de inibidores de α-amilase modifica a digestão do amido, como os encontrados no presente estudo, leva a diminuição da glicose absorvida, aumento do amido resistente e elevação do número de bactérias no cólon (Castañeda-Pérez *et al.,* 2021). Assim, os resultados encontrados no presente estudo podem sugestionar que as farinhas, que são inibidores de α-amilase, por exemplo, podem ser empregadas no controle de diabetes tipo 2, obesidade e mitigar para a ocorrência de câncer colorretal (YE *et al.*, 2020)

Em relação a digestibilidade *in vitro* do amido observou-se que os maiores valores (Tabela 2), foram observados para as variedades V1, V4 e V5, diferindo estatisticamente de V2, V3 e V6, a digestibilidade do amido manteve-se acima de 70%. Não houve diferença significativa (p < 0,05) para a digestibilidade proteica *in vitro* que se manteve acima de 99%.

3.4. Propriedades tecnológicas

A capacidade de absorção de água das farinhas de feijão-fava variou entre 1,31 g.g^{-1} a 2,40 g.g^{-1}. A variedade V2 apresentou o maior índice de absorção de água (2,4 g de água.g de farinha^{-1}), seguida pelas variedades V1, V3 e V4, que não diferiram estatisticamente entre si, e as variedades V5 e V6 foram iguais para p 0,05 (Tabela

3). Em relação ao índice de solubilidade em água não foi identificada diferença significativa entre as variedades. A capacidade de absorção de óleo manteve-se entre 0,63 $g.g^{-1}$ e 1,02 $g.g^{-1}$. As variedades V1, V3, V4 e V6, apresentaram maior potencial de absorção de óleo, não apresentando diferença significativa entre si (p< 0,05), no entanto, diferiram de V2 e V5 (Tabela 3). Para a capacidade de emulsificação e a estabilidade da emulsão, os valores mantiveram-se acima de 50% com maiores potenciais encontrados nas variedades V2, V3 e V6, que não apresentaram diferença significativa entre si (p < 0,05).

Resultados semelhantes foram obtidos por Okekunle *et al.* (2020), que investigaram as propriedades tecnológicas de farinhas de diferentes variedades de *P. lunatus* e observaram índice de absorção de água entre 0,85 e 0,93 $g.g^{-1}$ e capacidade de absorção de óleo que variavam de 0,90 $g.g^{-1}$ a 1,16 $g.g^{-1}$. Enquanto Marquezi *et al.* (2017), que avaliaram diferentes variedades de *P. vulgaris*, obtiveram capacidade de absorção de água entre 1,23 $g.g^{-1}$ a 1,38 $g.g^{-1}$ e capacidade de absorção de óleo com variação entre 0,86 $g.g^{-1}$ a 0,98 $g.g^{-1}$.

Tabela 3. Propriedades tecnológicas das farinhas de *Phaseolus lunatus* variedades Rosarinho (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).

Variedade	IAA ($g.g^{-1}$)	ISA ($g.g^{-1}$)	IAO ($g.g^{-1}$)	CE (%)	EE (%)
V1	1,74±0,06 ^{b}	2,75±0,55 ^{a}	1,01±0,03 ^{a}	51,11±1,27 ^{b}	50,44±0,51 ^{b}
V2	2,40±0,03 ^{a}	2,83±0,61 ^{a}	0,79±0,044 ^{b}	54,00±0,67 ^{a}	53,33±0,67 ^{a}
V3	1,83±0,02 ^{b}	2,54±0,12 ^{a}	1,02±0,033 ^{a}	54,44±0,51 ^{a}	53,22±0,51 ^{a}
V4	1,69±0,10 ^{b}	2,75±0,44 ^{a}	1,01±0,12 ^{a}	50,78±0,51 ^{b}	50,22±0,69 ^{b}
V5	1,31±0,06 ^{c}	2,63±0,17 ^{a}	0,63±0,03 ^{b}	51,00±1,00 ^{b}	49,94±0,92 ^{b}
V6	1,43±0,02 ^{c}	2,62±0,60 ^{a}	1,02±0,06 ^{a}	54,33±0,88 ^{a}	53,67±0,58 ^{a}

Capacidade de absorção de água (CAA), índice de solubilidade em água (ISA), índice de absorção de óleo (IAO), capacidade de emulsificação (CE) e estabilidade da emulsão (EE) de Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as variedades (p <0,05).

A capacidade de emulsão e a estabilidade da emulsão do presente estudo mantiveram-se acima de 50%, esses resultados apontam que as farinhas podem ser

utilizadas na indústria alimentícia para criar uma grande variedade de produtos alimentares emulsionados, tais como bebidas, leite, cremes, molhos, sobremesas, maionese, margarina e manteiga (NWACHUKWU; ALUKO, 2021). Como também, a natureza das emulsões confere a estes alimentos atributos funcionais distintos, tais como aparências desejáveis, texturas, flavor, e perfis de sabor. E, as emulsões são um veículo amplamente utilizado para o encapsulamento e entrega de agentes bioativos, tais como vitaminas e nutracêuticos (TAN; MACCLEMENTS, 2021).

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da capacidade de formação de espuma. Pode-se observar que em pH 8,0, ocorreu maior formação para as variedades V2, V4 e V6, que não diferiram estatisticamente entre si, seguidas pela variedade V1. Os menores percentuais foram observados para as variedades V3 e V5 entre 60 e 70%.

Esse alto potencial de formação de espuma, encontrado para as diferentes variedades de *P. lunatus*, está relacionado com a formação de cargas negativas nas proteínas presentes na farinha, dessa forma, cargas com o mesmo sinal levam a repulsão aumentando a flexibilidade das cadeias polipeptídicas e levando-as a espalhar-se mais rapidamente em direção a interface ar-água e a encapsular moléculas de água, dessa forma, ocorre a formação de espuma (MARQUEZI *et al.*, 2017). Por conseguinte, as espumas melhoram a densidade alimentar e a redução da densidade calórica, modificam a textura, características sensoriais, e a melhoria das propriedades reológicas (LEE *et al.,* 2021).

Tabela 4. Capacidade de formação de espuma (CFE) e sua estabilidade ao longo do tempo de farinhas de *Phaseolus lunatus,* variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).

Variedade		Estabilidade da espuma (%)			
	CFE (%)	15	30	45	60
V1	87,33±2,05 ^{b}	84,00±1,00 ^{aA}	63,77±2,10^{bB}	62,72±1,06^{bB}	58,11±0,22^{Bc}
V2	93,33±1,36 ^{a}	83,88±1,12 ^{aA}	82,66±0,67^{aA}	81,18±1,18^{aA}	77,45±0,89^{Ab}
V3	63,33±2,35 ^{c}	61,00±0,66 ^{bA}	58,95±1,05^{cA}	59,66±0,34^{bcA}	57,89±0,44^{bA}
V4	95,56±2,07 ^{a}	45,88±0,88 ^{cA}	29,87±0,13^{eB}	24,88±0,13^{eC}	20,88±0,88^{Dd}
V5	68,33±6,23^{c}	44,95±0,05 ^{cA}	40,77±0,77^{dB}	39,72±0,28^{dB}	35,83±0,84^{cC}

V6	98,33±2,35 ^{a}	86,22±1,23 ^{aA}	60,38±0,38^{bcB}	57,88±0,45^{cB}	57,39±0,95^{bB}

As letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as variedades; Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$).

A estabilidade da espuma em pH 8,0 diminuiu ao longo do tempo de forma diferente para cada variedade. A capacidade de formação de espuma no tempo de 60 min apresentou estabilidade superior a 50% para as variedades V1, V2, V3 e V6. Partículas de amido, proteínas e gordura presentes nas farinhas funcionam como tensoativos o que fornece espumas mais estáveis devido a um aumento de viscosidade dilatacional (NARSIMHAN; XIANG, 2018).

4. CONCLUSÃO

A investigação atual mostra que as variedades de *P. lunatus* apresentam características nutricionais e funcionais que podem ser aproveitados pela indústria, principalmente, formular os novos produtos com melhorias especiais para a saúde. A espectroscopia de infravermelho de transferência de Fourier mostrou a presença de grupos funcionais idênticos (C-H, C=C, OH, amida Ie amida II), com diferença apenas de intensidade de absorção o que demonstra que independente da variedade utilizada o perfil de carboidratos, proteínas e gorduras será similar. Portanto, os resultados do presente estudo mostram que farinhas das variedades de *Phaseolus lunatus* podem ser usadas na formulação de produtos alimentícios com alto valor nutricional e tecnológicas funcionais.

REFERÊNCIAS

AKESON, Walter R.; STAHMANN, Mark A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **The Journal of nutrition**, v. 83, n. 3, p. 257-261, 1964.

AZEVEDO, Joaquim Nazário; FRANCO, Luis José Duarte; ARAÚJO**,** Rejane Oliveira da Costa. Composição química de sete variedades de feijão-fava. **Embrapa Meio-Norte-Comunicado Técnico** (INFOTECA-E), 2003.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAKIR, Özgür *et al.* Nutritional and health benefits of legumes and their distinctive genomic properties. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 1-12, 2019.

CASTAÑEDA-PÉREZ, Eduardo *et al.* Antidiabetic potential of protein hydrolysates and peptide fractions from lima bean (*Phaseolus lunatus* L.): An *in vitro* study. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, p. 1-10, 2021.

COFFMANN, C. W.; GARCIA J. V. V. Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 12, n. 5, p. 473-484, 1977.

CUCCIOLONI, Massimiliano *et al*. Interaction between wheat alpha-amylase/trypsin bi-functional inhibitor and mammalian digestive enzymes: Kinetic, equilibrium and structural characterization of binding. **Food Chemistry**, v. 213, p. 571-578, 2016.

DE MARIA, S.; FERRARI, G.; MARESCA, P. Effects of high hydrostatic pressure on the conformational structure and the functional properties of bovine serum albumin. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 33, p. 67-75, 2016.

DESHPANDE, S. S. *et al.* Effects of dehulling on phytic acid, polyphenols, and enzyme inhibitors of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, v. 47, n. 6, p. 1846-1850, 1982.

HERTZLER, Steven R. *et al.* Plant proteins: Assessing their nutritional quality and effects on health and physical function. **Nutrients**, v. 12, n. 12, p. 3704, 2020.

HSIEH, Lan-Chi *et al*. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on protein metabolism in bed-ridden elderly receiving tube feeding. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 19, n. 2, p. 200-208, 2010.

IKRAM, Ali *et al*. Structural and nutritional portrayal of rye-supplemented bread using fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. **Food Science & Nutrition**, v. 9, n. 11, p. 6314-6321, 2021.

JIANG, Xiuming et al. Determination of the acid values of edible oils via FTIR spectroscopy based on the OH stretching band**. Food chemistry**, v. 212, p. 585-589, 2016.

KOURIS-BLAZOS, Antigone; BELSKI, Regina. Health benefits of legumes and pulses with a focus on Australian sweet lupins. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 25, n. 1, p. 1-17, 2016.

LACERDA, Rodrigo Rodrigues *et al.* Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. Cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 1072-1081, 2017.

LEE, Amelia Yilin *et al.* Three-dimensional printing of food foams stabilized by hydrocolloids for hydration in dysphagia. **International Journal of Bioprinting**, v. 7, n. 4, 2021.

LIMA, Vanessa *et al.* Trypsin inhibitors: promising candidate satietogenic proteins as complementary treatment for obesity and metabolic disorders? **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 405-419, 2019.

LIU, Xinhua; DAN, Nianhua; DAN, Weihua. Preparation and characterization of an advanced collagen aggregate from porcine acellular dermal matrix. **International journal of biological macromolecules**, v. 88, p. 179-188, 2016.

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

MAURON, J**. Analysis of food proteins, amino acid composition and nutritive value**. Proteins in Human Nutrition, London, Academic Press, 1973, p.139-154. 1973.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NARSIMHAN, Ganesan; XIANG, Ning. Role of proteins on formation, drainage, and stability of liquid food foams. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 45-63, 2018.

NWACHUKWU, Ifeanyi D.; ALUKO, Rotimi E. **Food Protein Structures, Functionality and Product Development**. 2021.

NWACHUKWU, Ifeanyi D.; ALUKO, Rotimi E. **Food Protein Structures, Functionality and Product Development**. 2021.

OBIRO, Wokadala Cuthbert; ZHANG, Tao; JIANG, Bo. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* α-amylase inhibitor. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 1, p. 1-12, 2008.

OFFICIAL, A. O. A. C. **Methods of analysis of AOAC International**. AOAC INTERNATIONAL, Maryland, USA, 2003.

OKEKUNLE, Mary Oluwaseun *et al.* Physicochemical, morphological and thermal properties of oxidized starches from Lima bean (*Phaseolus lunatus*). **Scientific African**, v. 8, p. e00432, 2020.

OKEZIE, B. Onuma; BELLO, A. B. Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 2, p. 450-454, 1988.

OSORIO, Lady Laura Del Rio; FLÓREZ-LÓPEZ, Edwin; GRANDE-TOVAR, Carlos David. The potential of selected agri-food loss and waste to contribute to a circular economy: Applications in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 515, 2021.

PALUPI, H. T. *et al.* Characterization of nutritional and functional properties of Lima bean flour (*Phaseolus lunatus* L.). **In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing**, 2021. p. 012033.

PEREIRA FILHO, João V. *et al.* Physiological responses of lima bean subjected to salt and water stresses. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n. 12, p. 959-965, 2019.

PHONGTHAI, Suphat *et al.* Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 240, p. 156-164, 2018.

RANI, Savita; SINGH, Rakhi. Characterization of nutritional, rheological and infrared spectroscopy of refined wheat, soybean and sorghum flour. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 9, n. 4, p. 25992-25996, 2018.

SANTOS, Nair Hildelgard Soares dos *et al.* Efeito do extrato de algas sem desempenho germinativo e crescimento radicular em sementes de feijão BRS Estilo em resposta a diferentes de aplicação. **Hoehnea**, v. 48, 2021.

SHARAN, Siddharth *et al.* Fava bean (*Vicia faba* L.) for food applications: From seed to ingredient processing and its effect on functional properties, antinutritional factors, flavor, and color. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 401-428, 2021.

SUJKA, Katarzyna; KOCZOŃ, Piotr. The application of FT-IR spectroscopy in discrimination of differently originated and aged whisky. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 11, p. 2019-2025, 2018.

SWER, Tanya L. *et al*. Optimization of enzyme aided extraction of anthocyanins from Prunus nepalensis L. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 382-390, 2018.

TAN, Chen; MCCLEMENTS, David Julian. Application of advanced emulsion technology in the food industry: A review and critical evaluation. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 812, 2021.

TYSKA, Denize *et al*. Near-infrared spectroscopy as a tool for rapid screening of deoxynivalenol in wheat flour and its applicability in the industry. **Food Additives & Contaminants: Part** A, v. 38, n. 11, p. 1958-1968, 2021.

VINAYASHREE, S.; VASU, Prasanna. Biochemical, nutritional and functional properties of protein isolate and fractions from pumpkin (*Cucurbita moschata* var. Kashi Harit) seeds. **Food Chemistry**, v. 340, p. 128177, 2021.

YE, Pengfei *et al*. Linking obesity with colorectal cancer: epidemiology and mechanistic insights. **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1408, 2020.

YASUMATSU, Katsuharu *et al.* Whipping and emulsifying properties of soybean products. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, n. 5, p. 719-727, 1972.

ZABIDI, Mardiana Ahamad; AZIZ, Noor Aziah Abdul. *In vitro* starch hydrolysis and estimated glycaemic index of bread substituted with different percentage of chempedak (*Artocarpus integer*) seed flour. **Food Chemistry**, v. 117, n. 1, p. 64-68, 2009.

CAPÍTULO 2

Efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre o potencial antioxidante de isolados proteicos de *Phaseolus lunatus*

A ser submetido na *Food Technology and Biotechnology*

Efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre o potencial antioxidante de isolados proteicos de *Phaseolus lunatus*

RESUMO

As sementes de *Phaseolus lunatus* L. apresentam alto teor de proteína que podem ser usados para obtenção de isolados e hidrolisados proteicos. Estes compostos podem ser usados como nutracêuticos e ingredientes funcionais de alimentos. No presente trabalho, objetivou-se obter e avaliar o efeito da digestão *in vitro* nos isolados proteicos e hidrolisados proteicos de quatro variedades de *P. lunatus* quanto sua capacidade antioxidante. A obtenção dos isolados proteicos das variedades Lavandeira, Rosinha, Olho de Ovelha e Mulatinho de *P. lunatus* deu-se por extração alcalina, seguida de precipitação isoelétrica, posteriormente, as amostras foram submetidas ao ensaio de simulação da digestão gástrica e intestinal *in vitro* utilizando pepsina, tripsina e pancreatina. Foram determinadas as atividades antioxidantes tanto dos isolados, quanto dos hidrolisados, foram submetidos aos ensaios de eliminação de radicais, poder redutor, atividade anti-desnaturação proteica, inibição da peroxidação lipídica, sobrevivencia de *Saccharomyces* cerevisiae frente ao estresse oxidativo, e quelação de íons metálicos. Os isolados e os hidrolisados proteicos das quatro variedades de *P. lunatus* apresentaram potencial de eliminação dos radicais ABTS, DPPH, hidroxila, superóxido e quelação de cobre e ferro. Observou-se bons efeitos frente a desnaturação proteica, peroxidação lipídica e sobrevivencia de *S. cerevisiae*. Este estudo apresenta as primeiras informações sobre o uso de extração alcalina, seguida de precipitação isoelétrica, na obtenção de isolados proteicos das variedades de *P. lunatus* estudadas. A digestão *in vitro* demonstra ser uma ferramenta eficaz para obter hidrolisados proteicos com efetivas e elevadas propriedades antioxidantes. Os resultados obtidos sugerem que tanto os isolados, quanto os hidrolisados proteicos obtidos após digestão simulada, podem ser usados como umas fontes naturais de peptídeos antioxidantes.

PALAVRAS-CHAVE: Feijão-fava; atividades antioxidantes; potencial nutracêutico; digestão *in vitro*; concentrados proteicos.

1. INTRODUÇÃO

Os radicais livres, átomos ou grupo de átomos que apresentam um elétron livre ou ausente, são produtos do metabolismo aeróbico celular que resultam tanto em

efeitos deletérios, quanto benéficos, para os organismos (CARVAJAL *et al.*, 2017; REGAL *et al.*, 2018; GUERRA *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020). O desequilíbrio entre a produção de compostos antioxidantes e a eliminação de radicais livres resulta em estresse oxidativo, deletério ao organismo. Este estresse é capaz de induzir deterioração de biomoléculas de DNA, proteínas e lipídeos, causando diversas patologias como reumatismo, câncer, doenças inflamatórias, asma, diabetes, obesidade, doenças neurológicas, dentre outras (OLIVEIRA *et al.*, 2020; SASIKUMAR; ERBA; EGIGU, 2020).

Os antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou inibir o processo oxidativo, por meio do sequestro ou eliminação dos radicais livres (FARAG *et al.*, 2020). Antioxidantes sintéticos são usualmente utilizados em diferentes setores industriais, entretanto, de acordo com Lahcen *et al.* (2020), o emprego de antioxidantes sintéticos tem sido constantemente associado a riscos à saúde. Assim, segundo Mira-Sanchez, Castillo-Sánchez e Morillas-Ruiz (2020), faz-se necessário a busca por fontes naturais e abundantes de antioxidantes, e/ou substâncias bioativas, para uso como aditivos alimentares e ingredientes funcionais na indústria alimentícia.

As leguminosas têm sido uma alternativa para a produção de peptídeos bioativos em virtude do seu alto teor proteico. Diversos estudos relatam propriedades bioativas derivadas de isolados e hidrolisados proteicos de diferentes espécies da família Fabaceae, tanto para desenvolvimento e produção de biomoléculas com potencial biológico, quanto para aplicação como alimentos funcionais ou nutracêuticos, sobretudo, obtidos do gênero *Phaseolus* (GARCIA-MORA *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2020; SARKER; CHAKRABORTY; ROY, 2020).

O feijão-fava apresenta em média 24% de proteína em sua composição, incluindo ainda carboidratos complexos, vitaminas, minerais e metabólitos secundários (DINIYAH *et al.,* 2020). De acordo com Van Vliet, Kronbert e Provenza *et al.* (2020), o consumo desses componentes traz diversos benefícios à saúde. Além da função nutricional, esse produto de origem vegetal apresenta boas propriedades funcionais, permitindo amplas aplicações tecnológicas no processamento de alimentos (BERNARDI *et al.*, 2021).

As proteínas de leguminosas podem ser utilizadas na produção de concentrados de proteínas (CP) e isolados de proteínas (IP), que são fontes intactas

de peptídeos bioativos. Assim, a espécie *P. lunatus* é comumente estudada por diversos autores para a prospecção de peptídeos bioativos a partir de CP e IP, dentre os quais, com atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina (TORRUCO-UCO *et al*, 2009; BETANCUR-ANCONA *et al.*, 2015; MAGANÃ *et al.*, 2015; SANDOVAL-PERAZA *et al.*, 2015; CIAU-SOLÍS *et al.*, 2018; PERTIWI; MARSONO; INDRATI, 2020), inibição de α-amilase, β-glicosidase, e dipepdil-peptidase IV (CIAN *et al.*, 2019), atividade antioxidante (SEGURA-CAMPUS *et al*, 2012; SANDOVAL-PERAZA *et al.*, 2015; LACERDA *et al.*, 2017), antimicrobiana (WONG, 2006; WONG, 2005), anti-HIV 1 (WONG, 2001) e propriedades funcionais (BETANCUR-ANCONA *et al.* , 2009).

O presente trabalho objetivou obter e avaliar o efeito da digestão *in vitro* dos isolados proteicos de quatro variedades de *P. lunatus* frente a diferentes atividades antioxidantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e preparo do concentrado proteico de *P. lunatus*

Foram utilizados grãos comerciais das variedades Lavandeira, Rosinha, Olho de Ovelha e Mulatinho, de feijão-fava obtidas em fontes comerciais no agreste pernambucano. Para o preparo das farinhas os grãos foram triturados, tamisados em moinho de facas e a farinha resultante foi seca em estufa de circulação ar forçada a 60 ºC e submetida ao isolamento proteico. A extração proteica deu-se por solubilização em NaOH nas concentrações de 0,06% (variedade Rosinha e Olho de Ovelha) e 0,02% (Mulatinho e Lavandeira) e mantidas sob agitação a 150 rpm por 60 min, posteriormente foram submetidas ao tratamento físico por ação da sonicação (40 Hz) nos tempos de zero minuto (var. Rosinha e Lavandeira) e 60 minutos (olho de ovelha e mulatinho). O material foi centrifugado por 30 min a 12.000 x *g* a 4 ºC. O pH do sobrenadante dos ensaios foi ajustado para as variedades Rosinha, Olho de ovelha e lavandeira empregou-se pH 4,5 e 6,5 para a Mulatinho empregando HCl 1 M e uma nova centrifugação foi realizada a 12.000 x *g*, então o precipitado foi coletado e acondicionado a -80 °C até ser liofilizado.

2.2. Simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*

A simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* consistiu de uma fase gástrica seguida por uma fase intestinal, de acordo com a metodologia descrita por Minekus *et al.* (2014). Para a fase gástrica, 5 mL de cada concentrado (50 $mg.mL^{-1}$) foram adicionados a 3,75 mL de uma solução contendo KCl (6,9 mM), KH_2PO_4 (0,9 mM), $NaHCO_3$ (25 mM), NaCl (47,2 mM), $MgCl_2$ (0,1 mM) e $(NH_4)_2CO_3$ (0,5 mM), e 0,8 mL de solução de pepsina (2500 $U.mL^{-1}$) com $CaCl_2$ 0,3 M. O pH foi ajustado para 3, utilizando HCl 1 M e o volume completado para 10 mL com a solução descrita anteriormente. A mistura foi incubada em banho-Maria a 37 ºC por 2 h a 100 rpm em agitador orbital. Imediatamente após este período, alíquotas de 20 mL foram coletadas, submetidas a banho fervente por 5 min e armazenadas a -20 °C.

Para a fase intestinal, 7 mL da solução de digestão gástrica foram misturados com 3,85 mL de KCl (6,9 mM), KH_2PO_4 (0,9 mM), $NaHCO_3$ (25 mM), NaCl (47,2 mM), $MgCl_2$ (0,1 mM) e $(NH_4)_2CO_3$ e posteriormente misturados a 1,75 mL de uma solução de pancreatina 20 $mg.mL^{-1}$ e extrato biliar (10 mM) e 140 µL $CaCl_2$ 0,3 M. O pH da mistura reacional foi ajustado para 8 com NaOH 1 M e o volume final ajustado para 14 mL, utilizando a solução descrita anteriormente. A mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C por 2 h a 100 rpm em agitador orbital. Imediatamente após este período, alíquotas foram coletadas, submetidas a banho fervente por 5 min e armazenadas a -20 °C. E parapara as determinações analíticas, foram retiradas alíquotas da digestão gástrica, intestinal e sem digestão (controle) das variedades Lavandeira (CPL), Mulatinho (CPM), Olho de Ovelha (CPO) e Rosinha (CPR) de *P. lunatus*.

2.3. Determinação do grau de hidrólise

O teor de aminoácidos foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Adler-Nissen (1979) modificada. Para esta análise, 31,25 µL de cada hidrolisado foram misturados com 500 µL de tampão fosfato (pH 8,2; 0,3 M) e em seguida foi adicionado 250 µL de solução de TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico) a 0,01%. A mistura reacional foi incubada em banho-maria a 50 ºC por 30 min, posteriormente interrompida com a adição de 0,5 mL de sulfito de sódio (0,1 M), sendo mantida ao abrigo da luz por 15 min a 24±2 ºC. A absorbância foi lida a 420 nm em

espectrofotômetro Biochrom Libra *S22* UV/Vis (Cambridge, Reino Unido) e os aminoácidos expressos em relação a L-leucina. O grau de hidrólise (GH) foi calculado de acordo com a equação 1.

$$GH = \left[\frac{(A_t - A_0}{A_{max} - A_0}\right] X\ 100 \qquad \textbf{(Equação 1)}$$

Onde A_t é a quantidade de ligações peptídicas clivadas no tempo t. A_0 e A_{max} é a quantidade de aminoácido da proteína presente no substrato sem hidrólise e após hidrólise ácida (HCl 6 M a 100 °C durante 24 h).

2.4. Potencial antioxidante dos hidrolisados proteicos

2.4.1. Eliminação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

O efeito de eliminação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrasil) frente as amostas foi determinado de acordo com a metodologia previamente descrita por Yen e Chen (1995). A mistura reacional consistiu em 200 µL de hidrolisados da fase gástrica intestinal e do grupo sem hidrólise, e 200 µL de solução etanólica de DPPH a 0,16 mM. A reação foi incubada por 30 min ao abrigo da luz, e a absorbância mensurada a 517 nm. A habilidade de eliminação do radical DPPH foi calculada usando a Equação 2:

$$ERDPPH(\%) = \left[\left(\frac{A_{amostra} - A_{amostra\ branco}}{A_{Controle}}\right)\right] * 100 \qquad \textbf{(Equação 2)}$$

Onde, o $A_{amostra}$ é a absorbância das amostras, $A_{amostra\ branco}$ é a absorbância da amostra sem o DPPH e $A_{Controle}$ é a absorbância do controle (solução de DPPH sem amostra).

2.4.2. Eliminação do radical ABTS

Este ensaio de atividade antioxidante envolveu a eliminação do radical cátion ABTS, gerado a partir da oxidação de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) a 7 mM com persulfato de potássio (2,45 mM), de acordo com metodologia descrita por Re *et al.* (1999). Uma alíquota de 50 µL dos hidrolisados da simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* e do grupo sem hidrólise foi adicionada a 950 µL da solução diluída de $ABTS^{+\bullet}$, a mistura reacional foi incubada por 10 min ao abrigo da luz na temperatura de 24±2 ºC. A absorbância da reação foi mensurada a

734 nm e a atividade de eliminação do $ABTS^{+\bullet}$ foi calculada de acordo com a Equação 3.

$$ERABTS(\%) = \left[\left(\frac{A_{Controle} - A_{amostra}}{A_{Controle}}\right)\right] * 100$$

(Equação 3)

Onde, $A_{amostra}$ é a absorbância das amostras, e $A_{Controle}$ é a absorbância do controle negativo empregando tampão fosfato.

2.4.3. Eliminação do radical hidroxila

Os ensaios de eliminação do radical hidroxila foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Zhu, Zhou e Qian *et al.* (2006). Foram misturados 30 µL da amostra contendo os diferentes hidrolisados, 50 µL de 1,10-fenantrolina (5 mM), 50 µL de $FeSO_4$ (5 mM), 50 µL de EDTA (15 mM) e 30 µL de tampão fosfato de sódio (200 mM, pH 7,4) em microplacas de 96 poços de poliestireno (Corning®, Tewksbury, Massachusetts, EUA). Após 5 min, 60 µL de H_2O_2 foram adicionados para iniciar a reação de eliminação. A mistura reacional foi incubada por 1h a 37 ºC e a absorbância mensurada a 340 nm empregando leitor de microplaca Asys UVM 340 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido). A atividade de eliminação do radical hidroxila foi calculado de acordo com a Equação 4.

$$AERH(\%) = \left(\frac{A_{Amostra} - A_{Degradada}}{A_{não\ Degradada} - A_{Degradada}}\right) * 100$$ **(Equação 4)**

Onde, os grupos degradados contêm todos dos reagentes envolvidos na reação, exceto pelo uso de água destilada substituindo a amostra. O grupo não-degradado corresponde as soluções da amostra do grupo degradado exceto pelo uso de água substituindo o H_2O_2.

2.4.4. Eliminação do radical superóxido

A atividade de eliminação do radical superóxido (ERS) foi determinada de acordo com o método descrito por Marklund e Marklund (1974). Um volume de 80 µL das amostras hidrolisadas foi misturado a 80 µL de tampão Tris-HCl 50 mM contendo EDTA 1 mM, pH 8,2. A mistura reacional foi incubada a 25 ºC por 10 min.

Posteriormente, foi adicionado 40 µL de solução de pirogalol 1,5 mM, e tampão Tris-HCl-EDTA como controle. A absorbância foi determinada a 340 nm por 5 min empregando leitor de microplaca Asys UVM 340 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido). A capacidade de eliminação do radical superóxido foi quantificada de acordo com a Equação 5.

$$ERS\ (\%) = [\frac{(\Delta A_{Controle}/min - \Delta A_{Amostra}/min)}{(\Delta A_{Controle}/min)}]*100 \qquad \textbf{(Equação 5)}$$

Na qual, $A_{controle}/min$ representa a absorbância por minuto da solução controle contendo pirogalol e tampão, e $A_{amostra}/min$ representa a absorbância por minuto da amostra.

2.4.5. Atividade antioxidante por meio do poder redutor férrico (FRAP)

A determinação da atividade antioxidante por meio do poder redutor férrico (FRAP) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996). A mistura reacional consistiu de 10 µL da amostra da fase gástrica e intestinal do grupo sem hidrólise em 30 µL de água e 300 µL do reagente FRAP com a seguinte composição: 10 partes de tampão acetato 300 mM e pH 3,6; 1 parte de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM e 1 parte de $FeCl_3$ 20 mM. A mistura foi incubada a 37 °C por 30 min e a leitura realizada a 593 nm empregando leitor de microplacas. O FRAP foi calculado a partir da curva padrão Trolox® (100-1600 µM) e expresso em µMol de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) para cada 100 g de amostra.

2.4.6. Poder redutor

A determinação do poder de redução empregando ferricianeto de potássio, foi realizada de acordo a metodologia descrita em Zhu *et al.* (2002), com modificações e sob proteção da luz. A mistura reacional foi constituída por 1,0 mL da amostra hidrolisada e sem hidrólise (controle), 2,5 mL da solução tampão de fosfato (50 mM, pH 7,0) e um volume igual solução de ferricianeto de potássio a 1%. Após 20 min de incubação a 50 °C, foram adicionados 2,5 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e a amostra foi centrifugada a 4000 x *g* por 10 min a 4 ºC. O sobrenadante

resultante da centrifugação (2,5 mL) foi diluído com 2,5 mL de água destilada e depois adicionado a 0,5 mL de solução de $FeCl_3$ a 0,1%, e a leitura realizada a 700 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico, obtidos por curvas de calibração com ácido gálico (0-60 $mg.L^{-1}$).

2.4.7. Atividade quelante de Cu^{2+} e Fe^{2+}

A atividade quelante de ferro foi realizada de acordo com a metodologia descrita em Sánchez-Vioque *et al.* (2012) com modificações. Para a mistura reacional foram utilizados 125 µL dos hidrolisados da fase gástrica intestinal e do grupo sem hidrólise, misturados a 500 µL de tampão acetato de sódio (100 mM e pH 4,9) e a 12,5 µL de solução de Fe^{2+} (2 mM). Após 30 min de incubação, foi adicionado 50 µL de solução ferrozina (5mM) e decorrido mais 30 min foi realizado leitura a 562 nm.

A atividade quelante de cobre foi realizada de acordo com a metodologia descrita Gil-Chávez *et al.* (2013), com modificações, em que 500 µL de solução tampão acetato de sódio (pH 6,0, 50 mM) foi misturado a 12,5 µL de solução de $CuSO_4$ (5 mM) e 125 µL da amostra. Essa mistura foi incubada por 30 min e em seguida adicionado 12,5 µL da solução de violeta de pirocatecol (4 mM). Transcorridos 30 min de incubação, a mistura foi lida a 632 nm em espectrofotômetro. Para ambas as atividades o controle negativo foi realizado com água destilada ao invés da amostra e a porcentagem de inibição foi determinada de acordo com a Equação 6.

$$AQ(\%) = \left[\frac{\mathrm{A}controle - \mathrm{A}\ amostra}{A_{Controle}}\right] * 100 \qquad \textbf{(Equação 6)}$$

2.4.8. Atividade antidesnaturação *in vitro*

A avaliação da atividade antidesnaturação *in vitro* foi determinada empregando a metodologia descrita por Ullah *et al.* (2014). A mistura reacional (5 mL) consistiu em 0,2 mL de ovoalbumina, 2,8 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 6,4) e 2 mL das amostras. Volume semelhante de água deionizada foi empregada como controle. A mistura reacional foi incubada a 37±2 °C por 15 min e posteriormente aquecidas a 70 °C por 5 min. Após o resfriamento, a absorbância foi medida a 660 nm. O diclofenaco de sódio nas concentrações finais de 100, 200, 300, 400, 500

µg.mL^{-1} foi usado como referência e tratado de forma semelhante para determinação da absorbância. A inibição percentual da desnaturação da proteína foi calculada usando a Equação 7.

$$\%\ inibição = \left[\frac{(A_{Controle} - A_{Amostra})}{A_{Controle}}\right] * 100 \qquad \textbf{(Equação 7)}$$

Onde $A_{Controle}$ é a absorbância da amostra não digerida. $A_{Amostra}$ é a absorbância da amostra digerida.

2.4.9. Sobrevivência de *Saccharomyces cerevisiae*

O ensaio empregando a levedura como modelo de estresse oxidativo foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ibrahim, Isono e Miyata (2018). As células de *S. cerevisiae*, cultivadas em caldo de peptona dextrose com extrato de levedura (YPD), foram suspensas no mesmo caldo com absorbância (600 nm) de 0,1. Os hidrolisados e isolados proteicos (200 µg.mL^{-1}) foram incubados a 28 °C com a suspensão de leveduras por 1 h. Foi adicionado um agente oxidante (H_2O_2 a 2 mM) e a incubação prolongada por 48 h. Uma porção de 10 µL de culturas diluídas em série em 2 mM de H_2O_2 foi transferida para placas de ágar YPD contendo 2 mM de H_2O_2 empregando alça drigalski. As placas foram incubadas por 72 h a 28 °C e as unidades formadoras de colônias de levedura, foram estimadas após esse período de incubação e os dados apresentados em UFC.mL^{-1}.

2.4.10. Inibição de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada segundo Osawa e Namiki (1985), empregando um sistema modelo com ácido linoleico. Foram dissolvidos 5 mg de amostra em 10 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0). Adicionou-se 0,13 mL de ácido linoleico e 10 mL de etanol 99,5%. A suspensão foi homogeneizada em agitador de soluções tipo vórtex e seu volume ajustado para 25 mL com água destilada. A mistura reacional foi incubada em estufa, no escuro, a 40 °C, sendo então analisado a cada 24 h durante 6 dias. A análise diária consistiu em medir a oxidação do ácido linoleico. Assim, 100 µL de amostra incubada foram misturadas com 4,7 mL de etanol 75%, 100 µL de tiocianato de amônio 30% e 100 µL de cloreto ferroso 0,02

M em HCl 3,5% em frascos âmbar. Esta mistura foi deixada em repouso durante 3 min e lida em espectrofotômetro a 500 nm. Foram utilizados como padrão o antioxidante comercial EDTA e o ácido ascórbico diluídos em etanol 99,5%, na mesma concentração.

2.5. Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio-padrão. A análise de variância unidirecional (ANOVA) foi realizada no software SISVAR (Versão: 5.6, UFLA, Brasil), sendo realizado o teste post-hoc de Scott-Knott, no qual $p < 0,05$, indicou se as diferenças são estatisticamente significativas.

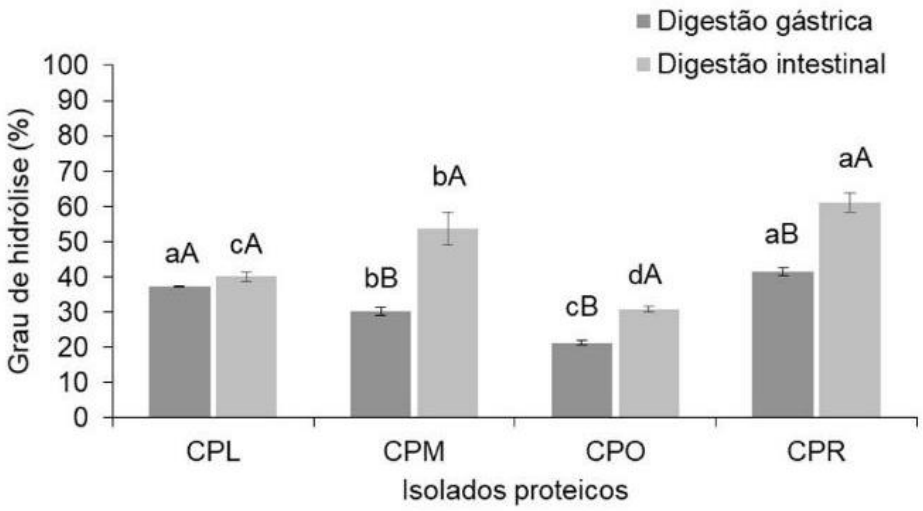
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

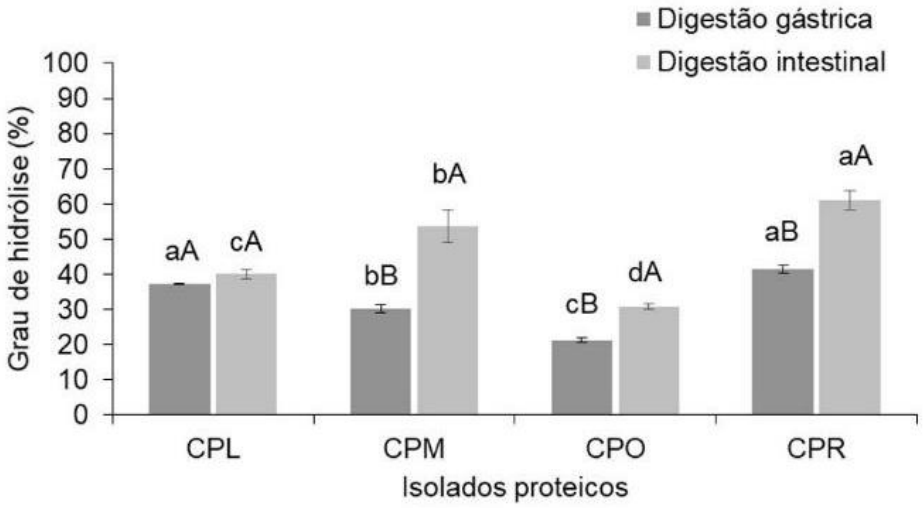
3.1. Grau de hidrólise

O grau de hidrólise (GH) dos isolados proteicos de feijão-fava (*P. lunatus*) das variedades Lavandeira, Mulatinho, Olho de Ovelha e Rosinha mantiveram-se entre 20 e 60% (Figura 1). A variedade Rosinha apresentou maior GH ($p < 0,05$), tanto sob ação das enzimas envolvidas na digestão gástrica quanto na digestão intestinal. Enquanto não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados proteicos das variedades Lavandeira e Mulatinho.

O GH está relacionado a clivagem das cadeias polipeptídicas por ação das enzimas gastrointestinais, fermentação microbiana e o emprego de enzimas vegetais e microbianas (GARCIA; BARROS; ROCHA, 2020), consequentemente ocorrerá liberação de fragmentos proteicos com potencial biológico (ASHRAF *et al.*, 2020). A diferença no grau de hidrólise nas fases gástricas e intestinais deve-se a diferente especificidade das enzimas, de acordo com Oliveira *et al.* (2017) as principais proteínas presentes no gênero *Phaseolus* são, globulinas e albuminas, enquanto as frações menores são prolaminas e glutelinas, cuja quantidade varia com o cultivar. Além disso, a pancreatina consiste em um conjunto de enzimas digestivas que contribuem para a eficiência na produção de peptídeos bioativos (PERTIWI; MARSANO; INDRATI, 2020).

Figura 1. Grau de hidrólise da digestão gastrointestinal *in vitro* dos isolados proteicos de *P. lunatus* das variedades Lavandeira (CPL), Mulatinho (CPM), Olho de Ovelha (CPO) e Rosinha (CPR).





Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as variedades.

A digestão gástrica apresentou 37,35%, 30,25%, 21,29% e 41,55% de grau de hidrólise para CPL, CPM, CPO e CPR, respectivamente. Enquanto, o grau de hidrólise durante a digestão intestinal se manteve em 30,85 % (CPO), 40,07% (CPL), 53,71% (CPM) e 61,04% (CPR). Estes resultados diferem dos encontrados por Zombrano *et al.* (2020), que observaram resistência a hidrólise dos concentrados proteicos de feijão-fava por enzimas gastrointestinais com 9,3% e 16,2% de GH na digestão gástrica e intestinal, respectivamente. Resultados semelhantes ao presente estudo

foram obtidos por Oseguera-Toledo, Mejia e Amaya-Llano (2015), ao avaliarem a hidrólise da fração proteica do feijão comum (*P. vulgaris*.), variedade Negro 8025 e Pinto Durango, por alcalase e bromelina, observaram entre 28 e 50% de GH. Enquanto estudos realizados por Jakubczyk *et al*. (2017), apresentaram grau de hidrólise entre 40 e 98%, nas sementes de feijão comum germinado e não germinado submetidas a hidrólise por pepsina e pancreatina o que demonstra que tanto as farinhas empregadas no presente estudo quanto as utilizadas nos estudos citados apresenta suceptibilidade ao hidrolise

3.2. Eliminação dos radicais DPPH, ABTS, hidroxila e superóxido

O potencial de eliminação do radical ABTS variou entre 63,79% e 84,68% para os não hidrolisados. Observou-se um aumento gradativo significativo ($p < 0,05$) no sequestro do radical ABTS durante a fase gástrica e intestinal *in vitro*. A variedade Mulatinho apresentou maior potencialidade para o sequestro do radical ABTS com aumento de 17,43% e 16,80% para a digestão gástrica e intestinal em relação ao grupo controle, respectivamente, e manteve a atividade entre 84,68 e 99,43% (Fig. 2a).

Os isolados proteicos das quatro variedades eliminaram entre 10,34% e 99,81% do radical DPPH. A atividade de eliminação diminuíram significativamente ($p < 0,05$) durante a digestão gástrica *in vitro* em todos os hidrolisados testados. Para os fragmentos peptídicos da *P. lunatus var.* Olho de Ovelha, Lavandeira e Rosinha, observou-se um aumento na fase intestinal quando comparadas ao controle. Os melhores resultados foram observados nas variedades Lavandeira e Rosinha com atividade entre 10,34% e 56,75% na fase gástrica, e 98,54% e 99,81% na fase intestinal, respectivamente (Fig. 2b).

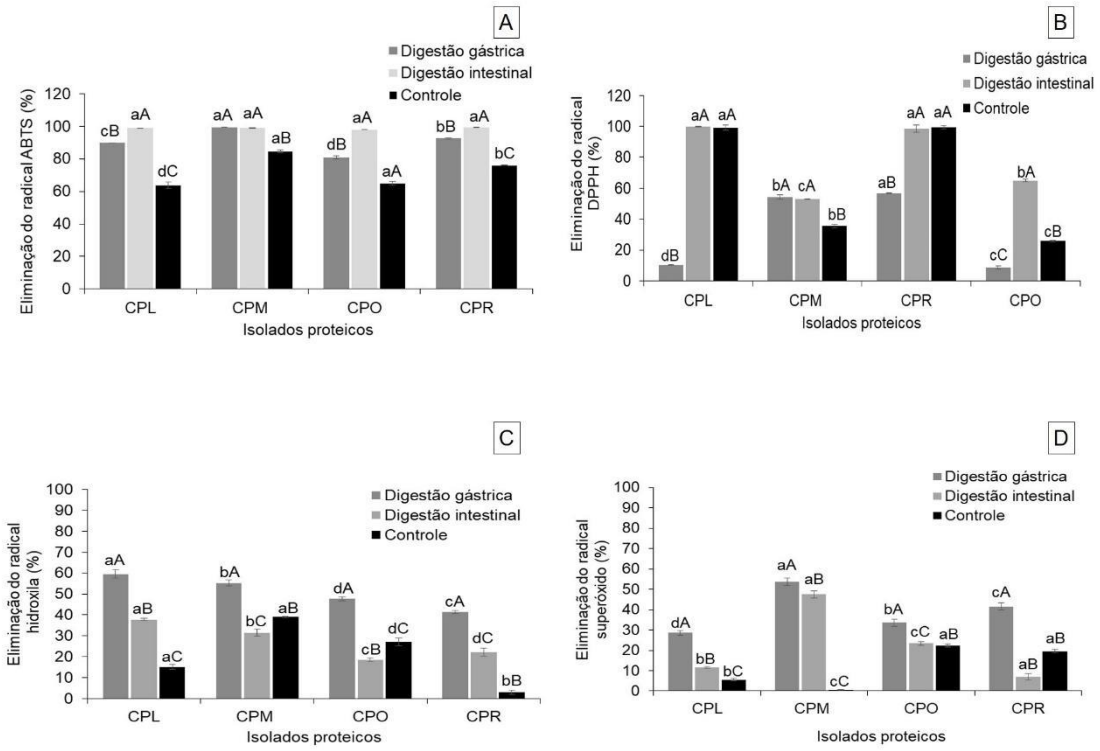
Para Del Rio *et al.* (2021) o aumento e a diminuição do potencial de eliminação dos radicais podem ser devidos à clivagem da maioria das ligações de peptídeos que expõe aminoácidos com potencial antioxidante, tais como triptofano, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina, isoleucina e leucina (GARCIA *et al.*, 2021).

No presente estudo, a eliminação do radical hidroxila (Fig. 2c) no grupo controle manteve-se entre 3 e 39,05% diferindo estatisticamente dos demais tratamentos ($p < < 0,05$). Na fase gástrica, o potencial de sequestro do radical hidroxila manteve-se

entre 41,42% e 59,59%, enquanto na fase intestinal esse potencial variou entre 18,03 e 37,31%. Dentre as variedades, os melhores resultados foram obtidos a partir dos isolados proteicos do cultivar Mulatinho que diferiu estatisticamente das demais.

Observou-se aumento do potencial de sequestro do radical superóxido, Fig. 2d), quando os isolados proteicos foram submetidos aos tratamentos gástrico (entre 28,68% e 53,66%) e intestinal (entre 6,95% e 47,48%), diferindo entre si estatisticamente ($p < 0,05$), como observado na figura 2. Entre as variedades, os maiores percentuais foram observados para a variedade Mulatinho com potencial de eliminação de 53,68% e 47,48% nas fases gástrica e intestinal, respectivamente.

Figura 2. Efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre isolados proteicos de *P. lunatus* das variedades Lavandeira (CPL), Mulatinho (CPM), Olho de Ovelha (CPO) e Rosinha (CPR), sobre a atividade de eliminação dos radicais ABTS (A), DPPH (B), hidroxila (C) e superóxido (D).



Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as variedades.

Para Saad *et al.* (2020) a atividade antiradical dos isolados proteicos das diferentes variedades de *P. lunatus* frente aos radicais DPPH e o ABTS se deu devido a capacidade dos fragmentos de proteínas atuarem como doadores de hidrogênio ou de elétrons nas reações com os radicais livres. Já Salawu *et al.* (2019) obtiveram aumento progressivo do poder de redução dos radicais DPPH e ABTS durante a simulação de digestão *in vitro* de proteínas obtidas de feijão cru e processado. O potencial antioxidante das proteínas do gênero *Phaseolus* deve-se aos fragmentos peptídicos que apresentam triptofano, metionina, histidina, lisina, cisteína, arginina e tirosina na sua composição (XU; CHE; LIU, 2017). Outros fatores também podem influenciar na capacidade antioxidante de isolados e fragmentos proteicos, tais como, massa molecular, número de grupos ionizáveis e presença de grupos hidrofóbicos (ZHAO *et al.*, 2011; EVANGELHO *et al.*, 2017). Azuero *et al.* (2005), relataram que o maior potencial de remoção do radical ABTS em relação ao DPPH pode estar relacionado à presença de proteínas hidrofílicas.

Com relação a eliminação dos radicais hidroxila e superóxido, os resultados encontrados foram semelhantes aos obtidos no estudo de Xie *et al*. (2019), que ao avaliarem o potencial antioxidante de hidrolisados de feijão Mung, a remoção do radical hidroxila foi entre 15 e 46%, para o superóxido 10 e 60%. A hidroxila é altamente reativa e reage fortemente com biomoléculas causando danos severos às células (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015; SHARIFI-RAD *et al.*, 2020). Outra espécie reativa de oxigênio é o O_2^- produzida em diversas reações biológicas. Os radicais superóxidos são precursores de diversos outros como a hidroxila (SONKLIN; LAOHAKUNJIT; KERDCHOECHUEN, 2018; PAN *et al.*, 2020). Ambos tendem a se ligar, sobretudo, com proteínas de tecidos biológicos e lipídios de membrana, o que favorece ao aparecimento da peroxidação lipídica (ASGHAR; RAMAN; DAUD, 2015) neste aspecto, os peptídeos oriundos dos isolados proteicos hidrolisados a partir da farinha de feijão-fava obtidos neste trabalho são capazes de ligar-se a esses radicais impedindo que aconteça a degradação oxidativa dos lípidos (XIE *et al.*, 2019).

3.3. Atividade antioxidante por meio do poder redutor férrico (FRAP), poder de redução e quelante de cobre e ferro

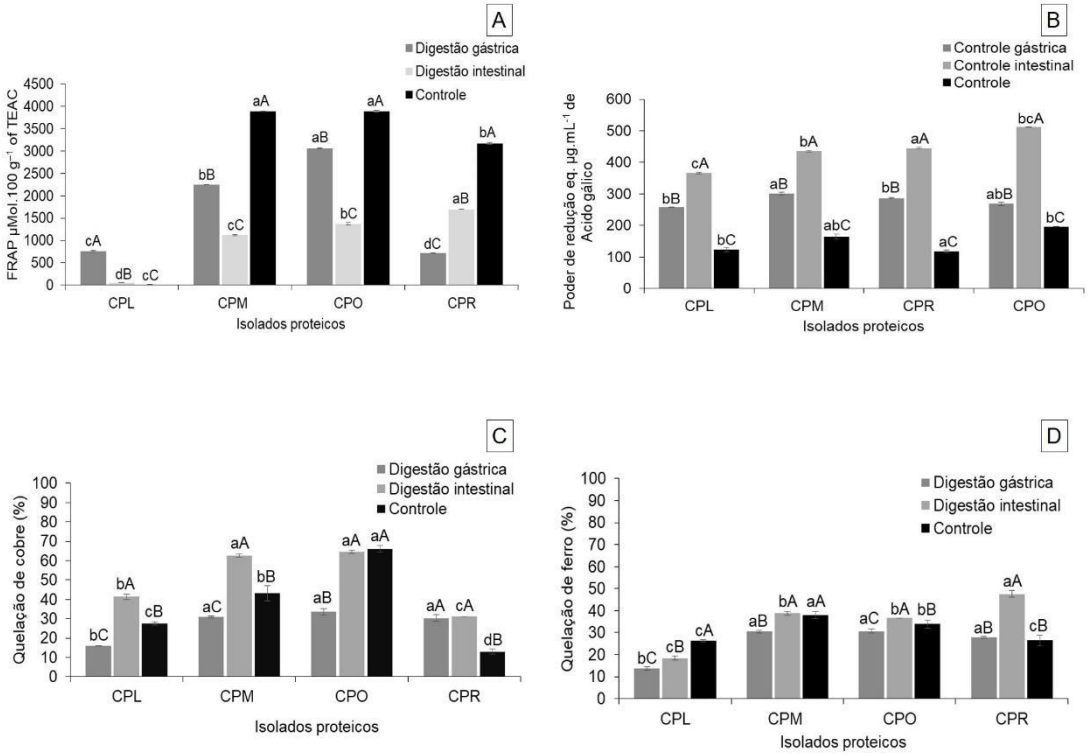
O poder redutor férrico (FRAP) dos isolados proteicos das variedades de *P. lunatus* (Fig. 3A) manteve-se entre 12,29 e 3885,57 µM.100g^{-1} de capacidade antioxidante equivalente a trolox (TEAC). Observou-se ainda, uma redução na atividade para Mulatinho, Rosinha e Olho de Ovelha, após a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* quando comparadas ao controle. Esse tratamento controle, sem ação enzimática, apresentou os melhores resultados para o FRAP (superiores a 3500 µM.100g^{-1} de TEAC), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (p < 0,05).

Em relação ao poder redutor, houve um aumento nessa atividade após a ação das enzimas envolvidas na fase gástrica (pepsina) e intestinal (pancreatina e tripsina) da simulação da digestão *in vitro* (Fig. 3B). Observou-se capacidade redutora dos isolados proteicos submetidos à fase intestinal, com valores entre 366,71 e 512,39 eq.µg.mL^{-1} de ácido gálico, seguido pelos ensaios gástrico e o grupo controle (p < 0,05). A variedade Olho de Ovelha apresentou os maiores poderes de redução quando comparadas às demais (p < 0,05).

Todas as variedades testadas apresentaram potencial para quelação do íon metálico cobre, mantendo-se entre 13,08% e 66,06% (Fig. 3C). *Phaseolus lunatus* L. var. Lavandeira, Mulatinho e Olho de Ovelha ocorreu um decréscimo na capacidade de quelação na fase gástrica, enquanto que, na intestinal ouve um aumento significativo superando grupo controle (p < 0,05). A Rosinha exibiu aumento tanto na fase gástrica quanto na intestinal. Os resultados do percentual de quelação de cobre a partir dos isolados proteicos seguiram tal comportamento Olho de Ovelha > Mulatinho> Lavandeira> Rosinha estatisticamente diferentes (p < 0,05).

Neste estudo o percentual de quelação do Fe^{2+} manteve-se entre 13,66% e 47,52% (Fig. 3D). Dentre as variedades, analisadas os isolados proteicos da Mulatinho (p < 0,05) apresentaram os melhores resultados. Em relação aos tratamentos, a digestão intestinal demonstrou maior potencialidade para liberação de quelante de ferro, diferindo estatisticamente dos ensaios submetidos a digestão gástrica e ao controle sem processo digestivo (p < 0,05).

Figura 3. Efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre isolados proteicos da variedade Lavandeira (CPL), Mulatinho (CPM), Olho de Ovelha (CPO) e Rosinha (CPR) de *P. lunatus* frente ao poder redutor férrico (3a), poder de redução (3b), quelação de cobre (3c) e quelação de ferro (4d)



Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as variedades.

Os resultados do presente estudo concordam com os resultados de Ashraf *et al.* (2020) e Zambrano *et al.* (2020), que apontaram as espécies *P. lunatus* e *P. vulgaris* como excelente fonte de proteínas ricas frações menores de peptídeo com alto potencial de limpeza de radicais livres. Garcia-Mora *et al.* (2015), atribuem o alto potencial poder redutor férrico, bem como, o potencial antioxidante a um maior acúmulo de pequenos peptídeos durante a hidrólise, evidenciando uma relação positiva entre o tamanho do peptídeo e o potencial antioxidante.

Ademais, de acordo com Ngoh e Gan (2016), o potencial de FRAP nos isolados proteicos das diferentes variedades de feijão-fava, antes e após digestão, está diretamente relacionada à presença de aminoácidos que atuam através da quebra da cadeia dos radicais livres por meio da doação de um átomo de hidrogênio. Além disso,

o poder de redução das amostras de *P. lunatus*, pode demonstrar o seu potencial antioxidante, ou seja, quanto maior o poder de redução, maior será a capacidade de remover agentes oxidativos (WONG *et al.*, 2008).

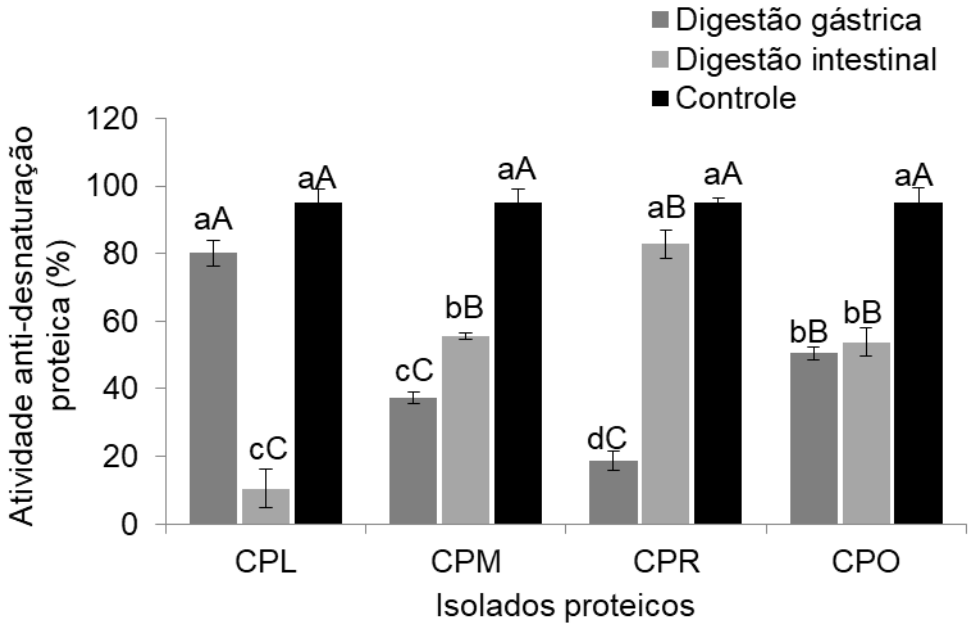
Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, para quelação de cobre e ferro, foram descritos por Carrasco-Castilla *et al.* (2012), que encontraram proteínas isoladas da faseolina do feijão-comum, hidrolisadas empregando pepsina e pancreatina, com capacidade de ligar-se ao cobre entre 21% e 82% e quelante de ferro entre 2% e 81%. Araújo *et al.* (2018), ao avaliarem diferentes métodos para extração de proteínas de semente *P. lunatus*, observaram percentual de quelar ferro entre 3,0% e 53%, e de cobre até 36%. Enquanto, Ribeiro, Batista e Fernandes (2019), detectaram o potencial quelante de cobre e ferro de peptídeos e frações peptídicas entre 30% e 95%. Já Borges-Martínez *et al.* (2021), avaliaram atividade quelante de cobre, em feijão e ervilha germinados, de 31 e 28%, respectivamente.

A capacidade de ligar-se ao cobre e ao ferro está ligada na interação entre um grupo doador de elétrons localizado na superfície da proteína ou peptídeo, e o íon metálico (RIBEIRO; BATISTA; FERNANDES, 2019). Ainda de acordo com Ashmead (2007), e Ueda, Gout e Morganti (2003), durante a quelação ocorre a formação de um complexo ferro-peptídeo e/ou cobre-peptídeo para estabilizar o elétron e a carga do íon metálico. Por conseguinte, grupos específicos presentes na estrutura das proteínas e peptídeos, tais como os grupos carboxílicos e os grupos -OH são potenciais sítios de ligação para os íons metálicos o que favorece a formação de quelatos de metais.

3.4. Inibição da desnaturação proteica

Os isolados proteicos de *P. lunatus* mantiveram o potencial de inibição da desnaturação proteica entre 10,50% e 82,85%. Entre as variedades a Lavandeira deteve o maior pontencial de inibição na fase gástrica, cerca de 80,19% (Fig. 4). Dentre os tratamentos, a inibição na fase intestinal foi superior aos obtidos na gástrica.

Figura 4. Efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* sobresobre isolados proteicos de *P. lunatus,* variedades avandeira (CPL), Mulatinho (CPM), Olho de Ovelha (CPO) e Rosinha (CPR) sobre a atividade anti-desnaturante *in vitro*.



Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as variedades.

Resultados semelhantes foram encontrados por Tomayo *et al.* (2019), que ao avaliarem atividades biológicas dos isolados proteicos e hidrolisados de *P. lunatus* cultivado no Equador, obtiveram entre 7,01% e 30,62% de inibição da desnaturação proteica. Hidrolisados e isolados proteicos de vegetais e leguminosas já foram relatados como potenciais inibidores de mediadores capazes de desencadear processos inflamatórios (POWNALL; UDENIGWE; ALUKO, 2010; NDIAYE *et al.*, 2012; CARDENAS *et al.*, 2018). Além disso, medicamentos à base de plantas têm sido empregados em diversas patologias, incluindo processos inflamatórios. Desta forma, tornaram-se objeto de estudo de diversas pesquisas, sobretudo, pela facilidade de produção das plantas, custo e alto potencial terapêutico que ademais, podem ser incluídos na dieta do homem e dos animais (ABUALHASAN *et al.*, 2014; ZUPANETS; SHEBEKO; POPOV, 2015).

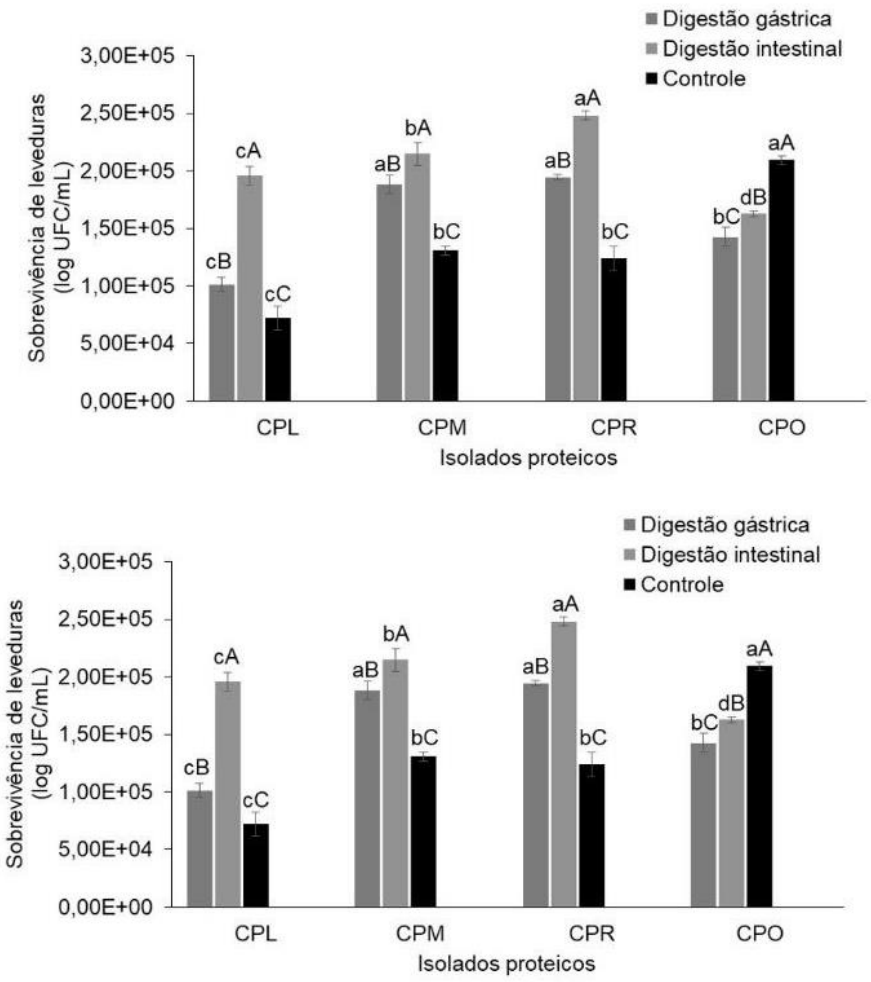
3.5. Avaliação do estresse oxidativo

Na figura 5 estão apresentados atividade do ensaio de sobrevivência de *S. cerevisiae* tratada com isolados proteicos de diferentes variedades de *P. lunatus,* foi dectectado que os valores se mantiveram entre 7,2 x 10^4 UFC.mL^{-1} e 2,48 x10^5

UFC.mL^{-1} . Houve um aumento da sobrevivência de *S. cerevisiae* nos tratamentos gástrico e intestinal, os quais foram diferentes estatisticamente ($p < 0,05$), quando comparados ao controle.

As variedades Rosinha e Mulatinho demonstraram maiores capacidade de redução do extresse oxidativo, tanto na fase gástrica, quanto na intestinal, não diferindo estatisticamente (Fig. 5). Os resultados encontrados no presente estudo, podem indicar que alguns peptídeos antioxidantes têm capacidade de modular o estado oxiredutor intracelular, desse modo, confere tolerância ao estresse oxidativo em células vivas. Assim, os tratamentos com os diferentes peptídeos, podem induzir uma proteção transitória contra as condições oxidativas (IBRAHIM; ISONO; MIYATA, 2018).

Figura 5. Efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre isolados proteicos de *P. lunatus*, *var* Lavandeira (CPL), Mulatinho (CPM), Olho de Ovelha (CPO) e Rosinha (CPR) sobre a tolerância de células de *Saccharomyces cerevisiae* ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2.

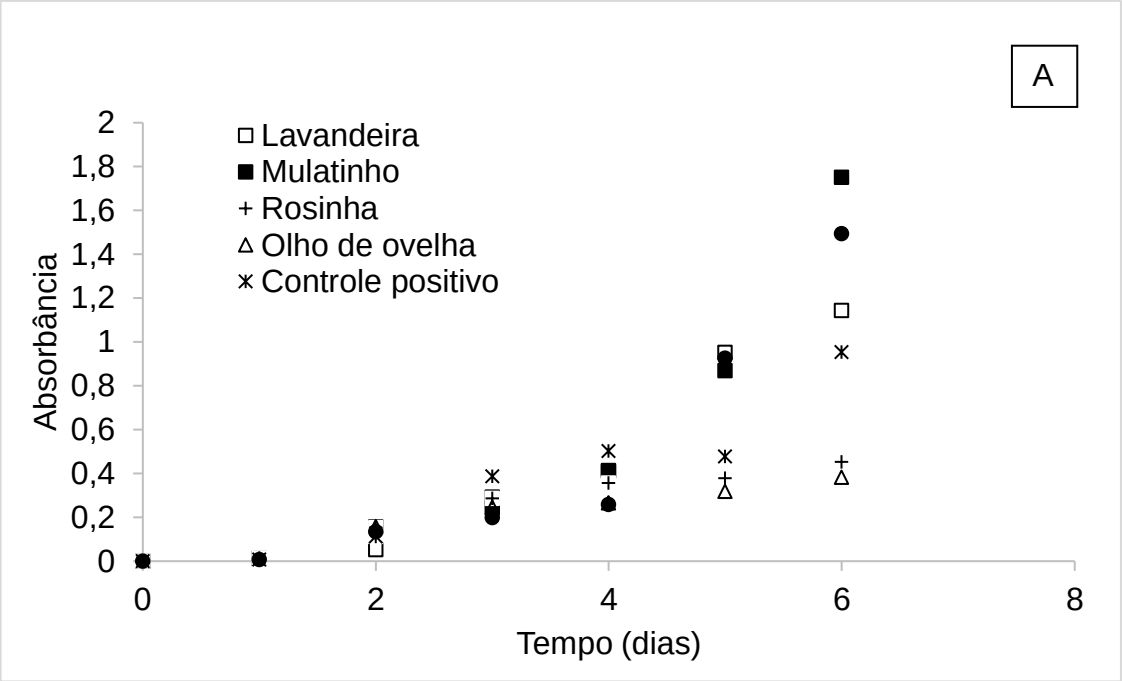


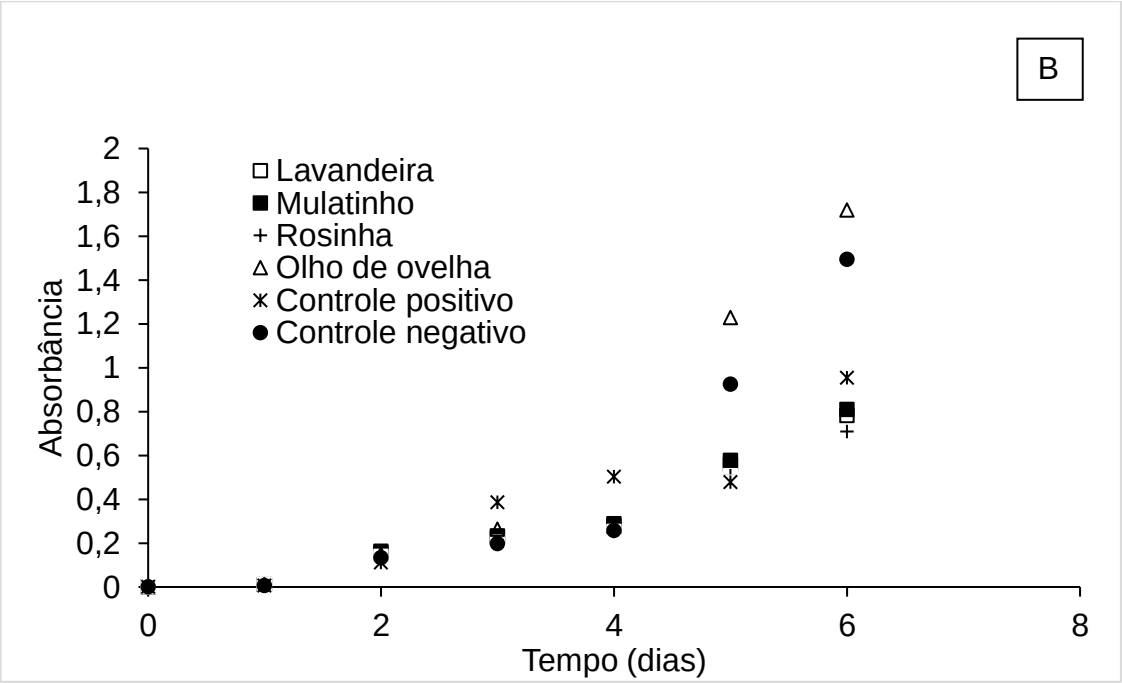
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as variedades.

3.6. Inibição da peroxidação lipídica

Os isolados proteicos de *P. lunatus*, foram empregados para determinação da inibição da peroxidação lipídica no sistema modelo ácido linoleico, Figura 6A, observou-se que, as variedades Rosinha e Olho de Ovelha apresentaram na fase gástrica capacidade de inibição inferior ao controle com ácido ascórbico (controle positivo). Na fase intestinal (Fig. 6B), os melhores resultados foram obtidos para os isolados derivados das variedades Mulatinho, Lavandeira e Rosinha, quando comparada a fase gástrica.

Figura 6. Efeito da simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre isolados proteicos *P. lunatus var* Lavandeira (CPL), Mulatinho (CPM), Olho de Ovelha (CPO) e Rosinha (CPR) sobre a peroxidação lipídica. (A) digestão gástrica e (B) digestão intestinal.





Dessa forma, os hidrolisados e isolados proteicos derivados do feijão-fava, retardaram significativamente a peroxidação lipídica e exibiram um padrão não linear. De acordo com Félix *et al*. (2020), a presença de inibição da peroxidação lipídica aponta como uma provável aplicação de peptídeos bioativos/isolados proteicos de origem alimentar, como um ingrediente potencial na indústria de alimentos. Assim como, na redução de fisiopatologias associadas ao estresse oxidativo, que levam ao

aparecimento de diversas doenças ósseas, câncer, processos inflamatórios e doenças degenerativas.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo relata a influência da digestão gastrointestinal *in vitro* de isolados proteicos de quatro variedades, Mulatinho, Olho de Ovelha, Rosinha e Lavandeira, de *P. lunatus* frente às atividades antioxidantes, anti-desnaturação proteica, inibição da peroxidação lipídica e sobrevivência das células de *S. cerevisiae*.

Enquanto, a variedade Olho de Ovelha destacou-se na atividade anti-inflamatória e do poder redutor férrico, a sobrevivência das células de levedura foi maior frente a variedade Olho de Ovelha. A inibição da peroxidação lipídica foi maior frente aos isolados de *P. lunatus var* Mulatinho, Lavandeira e Rosinha. Os resultados obtidos no presente estudo apontam que os concentrados proteicos *var* Mulatinho, Olho de Ovelha, Rosinha e Lavandeira são fontes promissoras de ingredientes funcionais ou suplementos bioativos que podem agir como antioxidante potencialmente disponíveis e acessíveis ao mercado. Além disso, o componente proteico presente nessas variedades pode ser empregado no desenvolvimento de novos produtos pela indústria alimentícia, tais como, hidrolisados proteicos, nutracêuticos, nanoencapsulados para indústria cosmética ou como aditivo para aumentar tempo de vida em prateleira.

REFERÊNCIAS

ABUALHASAN, Murad N. *et al.* Synthesis and formulation of ibuprofen pro-drugs for enhanced transdermal absorption. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 352-354, 2014.

ADLER-NISSEN, Jens. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid**. Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 27, n. 6, p. 1256-1262, 1979.

ARAÚJO, Renata Borges *et al.* Proteínas com propriedades bioativas extraídas de feijão-Lima (*Phaseolus lunatus* L.). **UNICIÊNCIAS**, v. 22, n. 3Esp, p. 51-60, 2018.

ASGHAR, Anam; RAMAN, Abdul Aziz Abdul; DAUD, Wan Mohd Ashri Wan. Advanced oxidation processes for in-situ production of hydrogen peroxide/hydroxyl radical for textile wastewater treatment: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 87, p. 826-838, 2015.

ASHMEAD, H. DeWayne**. Iron (II) amino acid chelates with reducing agents attached thereto**. U.S. Patent Application n. 11/436,112, 22 nov. 2007.

ASHRAF, Jawad *et al.* Effect of thermosonication pre-treatment on mung bean (*Vigna radiata*) and white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) proteins: Enzymatic hydrolysis, cholesterol lowering activity and structural characterization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 66, p. 105121, 2020.

AZUERO, A.; TRONCOSO, A. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Revista de Ciencia y Tecnología de alimentos**, v. 26, n. 2, p. 25-26, 2005.

BENZIE, Iris; STRAIN, John. 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.

BERNARDI, Silvia *et al*. Ultrasound: A suitable technology to improve the extraction and techno-functional properties of vegetable food proteins. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 76, n. 1, p. 1-11, 2021.

BETANCUR-ANCONA, David *et al.* ACE-I inhibitory activity from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* peptide fractions obtained by ultrafiltration. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 11, p. 1247-1254, 2015.

BETANCUR-ANCONA, David *et al.* Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 1, p. 128-137, 2009.

BORGES-MARTÍNEZ, Eduardo *et al.* Phenolic compounds profile and antioxidant activity of pea (*Pisum sativum* L.) and black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sprouts. **Food Science and Technology**, n. AHEAD, 2021.

CÁRDENAS, M. *et al.* Chia protein concentrate (*Salvia hispanica* L.) anti-inflammatory and antioxidant activity. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 11, n. 2, p. 382, 2018.

CARRASCO-CASTILLA, Janet *et al.* Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1789-1795, 2012.

CARVAJAL, Carlos. El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. **Medicina Legal de Costa Rica**, v. 34, n. 2, p. 90-100, 2017.

CHEN, Yuhuan *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory polyphenols and peptides of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) milk and yogurt in Caco-2 and HT-29 cell models. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 125-135, 2020.

CIAN, Raúl E. *et al.* Bioactive Phaseolus lunatus peptides release from maltodextrin/gum arabic microcapsules obtained by spray drying after simulated gastrointestinal digestion. International **Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 6, p. 2002-2009, 2019.

CIAU-SOLÍS, Norma A.; ACEVEDO-FERNÁNDEZ, Juan J.; BETANCUR-ANCONA, David. *In vitro* renin–angiotensin system inhibition and in vivo antihypertensive activity of peptide fractions from lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 2, p. 781-786, 2018.

DEL RIO, Andrea Rivera *et al.* Protein acidification and hydrolysis by pepsin ensure efficient trypsin-catalyzed hydrolysis. **Food & Function**, v. 12, n. 10, p. 4570-4581, 2021.

DINIYAH, Nurud *et al*. Lablab purpureus Protects HaCaT Cells from Oxidative Stress-Induced Cell Death through Nrf2-Mediated Heme Oxygenase-1 Expression via the Activation of p38 and ERK1/2. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, p. 8583, 2020.

EVANGELHO, Jarine Amaral *et al.* Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food chemistry**, v. 214, p. 460-467, 2017.

FARAG, Radwan S. *et al.* Phytochemical screening and antioxidant activity of some medicinal plants' crude juices. **Biotechnology Reports**, v. 28, p. e00536, 2020.

FÉLIX, Rafael *et al*. Evaluating the in vitro potential of natural extracts to protect lipids from oxidative damage. **Antioxidants**, v. 9, n. 3, p. 231, 2020.

GARCIA, Bianca de Fátima; BARROS, Márcio; ROCHA, Thaís de Souza. Bioactive peptides from beans with the potential to decrease the risk of developing noncommunicable chronic diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-19, 2020.

GARCIA, Tatiana *et al*. Comprehensive genomic resources related to domestication and crop improvement traits in Lima bean. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2021.

GARCIA-MORA, Patricia *et al.* Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto) proteins by subtilisins. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 319-332, 2015.

GUERRA, Hernández *et al.* Influência de los radicales libres en la génesis de la ateroesclerosis**. Revista Finlay**, v. 10, n. 2, p. 170-178, 2020.

IBRAHIM, Hisham R.; ISONO, Hiroki; MIYATA, Takeshi. Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 273-280, 2018.

JAKUBCZYK, Anna *et al.* 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.

JOANA GIL-CHÁVEZ, G. *et al*. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5-23, 2013.

LACERDA, Rodrigo Rodrigues *et al.* Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. Cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 1072-1081, 2017.

LAHCEN, S. Ait *et al.* Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan *Cistus creticus* leaves. **Chemical Data Collections**, v. 26, p. 100346, 2020.

LI, Lim Seow *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Erythroxylum cuneatum* alkaloid leaf extract. **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. e04141, 2020.

MAGAÑA, Mario Domínguez *et al.* ACE-I inhibitory properties of hydrolysates from germinated and ungerminated *Phaseolus lunatus* proteins. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 167-174, 2015.

MARKLUND, Stefan; MARKLUND, Gudrun. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MINEKUS, Mans *et al*. A standardised static in vitro digestion method suitable for food–an international consensus. **Food & function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

MIRA-SÁNCHEZ, María D.; CASTILLO-SÁNCHEZ, Julián; MORILLAS-RUIZ, Juana María. Comparative study of rosemary extracts and several synthetic and natural food antioxidants. Relevance of carnosic acid/carnosol ratio. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125688, 2020.

NDIAYE, Fatou *et al.* Anti-oxidant, anti-inflammatory and immunomodulating properties of an enzymatic protein hydrolysate from yellow field pea seeds. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 1, p. 29-37, 2012.

NGOH, Ying-Yuan; GAN, Chee-Yuen. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α-amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). **Food Chemistry**, v. 190, p. 331-337, 2016.

OLIVEIRA, Aline P. *et al.* Protein and metalloprotein distribution in different varieties of beans (Phaseolus vulgaris L.): effects of cooking. **International journal of food science,** v. 2017, 2017.

OLIVEIRA, Rafaela *et al.* Ação Quimiopreventiva dos Fitoquímicos por meio da Regulação do Fator de Transcrição Nrf2: Revisão Integrativa da Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 66, n. 1, 2020.

OSAWA, Toshihiko; NAMIKI, Mitsuo. Natural antioxidants isolated from Eucalyptus leaf waxes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 777-780, 1985.

OSEGUERA-TOLEDO, Miguel E.; DE MEJIA, Elvira Gonzalez; AMAYA-LLANO, Silvia 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.

PAN, Mingfei *et al.* Advances on food-derived peptidic antioxidants—A Review. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 799, 2020.

PERTIWI, Made Gendis Putri; MARSONO, Yustinus; INDRATI, Retno. *In vitro* gastrointestinal simulation of tempe prepared from koro kratok (*Phaseolus lunatus* L.) as an angiotensin-converting enzyme inhibitor. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 5, p. 1-9, 2020.

PHANIENDRA, Alugoju; JESTADI, Dinesh Babu; PERIYASAMY, Latha. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.

POWNALL, Trisha L.; UDENIGWE, Chibuike C.; ALUKO, Rotimi E. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4712-4718, 2010.

RE, Roberta *et al*. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REGAL, Milagros Lisset León *et al.* La teoría del estrés oxidativo como causa directa del envejecimiento celular. **MediSur**, v. 16, n. 5, p. 699-710, 2018.

RIBEIRO, J. V. V.; BATISTA, K. A.; FERNANDES, K. F. Potential iron and copper chelating activity of naturally occurring peptides and protein fractions from common bean (*Phaseolus Vulgaris*). **International Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 4, p. 000161, 2019.

SAAD, Ahmed Mohamed *et al.* Enzymatic hydrolysis of *Phaseolus vulgaris* protein isolate: Characterization of hydrolysates and effect on the quality of minced beef during cold storage. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 567-577, 2020.

SALAWU, Sule O. *et al*. Antioxidant indices and amino acid composition of phenolic containing Lima beans (*Phaseolus lunatus*) after simulated human gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Studies**, v. 8, n. 1, 2019.

SANDOVAI-PERAZA, Mukthar *et al.* Evaluation of some residual bioactivities of microencapsulated *Phaseolus lunatus* protein fraction with carboxymethylated flamboyant (*Delonix regia*) gum/sodium alginate. **Food Science and Technology,** v. 34, n. 4, p. 680-687, 2015.

SARKER, Ayesha; CHAKRABORTY, Sajan; ROY, Mukta. Dark red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates inhibit the growth of oxidizing substances in plain yogurt. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, p. 100062, 2020.

SASIKUMAR, J. M.; ERBA, Oliyad; EGIGU, Meseret C. *In vitro* antioxidant activity and polyphenolic content of commonly used spices from Ethiopia. **Heliyon**, v. 6, n. 9, p. e05027, 2020.

SHARIFI-RAD, Mehdi *et al.* Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 694, 2020.

SONKLIN, Chanikan; LAOHAKUNJIT, Natta; KERDCHOECHUEN, Orapin. Assessment of antioxidant properties of membrane ultrafiltration peptides from mungbean meal protein hydrolysates. **PeerJ**, v. 6, p. e5337, 2018.

TAMAYO, Javier *et al.* Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities of proteins of *Phaseoulus lunatus* (Fabaceae) Baby Lima beans produced in Ecuador. **BioRxiv**, p. 401323, 2019.

TORRUCO-UCO, Juan *et al.* Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1597-1604, 2009.

UEDA, E. K. M.; GOUT, P. W.; MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal ion–protein binding. **Journal of Chromatography A**, v. 988, n. 1, p. 1-23, 2003.

ULLAH, HM Arif *et al.* Evaluation of antinociceptive, in-vivo & in-vitro anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Curcuma zedoaria* rhizome. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 346, 2014.

VAN VLIET, Stephan; KRONBERG, Scott L.; PROVENZA, Frederick D. Plant-based meats, human health, and climate change**. Frontiers in sustainable food systems**, p. 128, 2020.

WANG, Hua *et al.* *In vitro* and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 888-895, 2008.

WONG, Jack Ho; NG, Tzi Bun. An antifungal peptide from baby lima bean. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 576-581, 2006.

WONG, Jack Ho; NG, Tzi Bun. Examination of lectins, polysaccharopeptide, polysaccharide, alkaloid, coumarin and trypsin inhibitors for inhibitory activity against human immunodeficiency virus reverse transcriptase and glycohydrolases. **Planta Medica**, v. 67, n. 07, p. 669-672, 2001.

WONG, Jack Ho; NG, Tzi Bun. Lunatusin, a trypsin-stable antimicrobial peptide from lima beans (*Phaseolus lunatus* L.). **Peptides**, v. 26, n. 11, p. 2086-2092, 2005.

XIE, Jianhua *et al.* Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (*Vigna radiate*). **Food Chemistry**, v. 270, p. 243-250, 2019.

XU, Naijin; CHEN, Guanqun; LIU, Hui. Antioxidative categorization of twenty amino acids based on experimental evaluation. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2066, 2017.

YEN, Gow-Chin; CHEN, Hui-Yin. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 43, n. 1, p. 27-32, 1995.

ZAMBRANO, Laura D. *et al*. Update: characteristics of symptomatic women of reproductive age with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection by pregnancy status—United States, January 22–October 3, 2020. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, n. 44, p. 1641, 2020.

ZAMBRANO, M. *et al.* Isolation of baby lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) proteins fractions and evaluation of their antioxidant activity. **Italian Journal of Food Science**, v. 32, n. 2, 2020.

ZHAO, Guanli *et al.* Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1438-1443, 2011.

ZHU, Kexue; ZHOU, Huiming; QIAN, Haifeng. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1296-1302, 2006.

ZHU, Qin Yan *et al.* Antioxidative activities of oolong tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 23, p. 6929-6934, 2002.

ZUPANETS, I. A.; SHEBEKO, S. K.; POPOV, O. S. The effect of the medication «Diclocor», containing diclofenac and quercetin, on clinico-biochemical parameters in rats with osteoarthritis. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 9, p. 101-104, 2015.

CAPÍTULO 3

Extração de compostos fenólicos e avaliação do efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* por seis variedades de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)

A ser submetida na *Plant Foods for Human Nutrition*

Extração de compostos fenólicos e avaliação do efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* por seis variedades de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)

RESUMO

Phaseolus lunatus L. é uma fonte de compostos antioxidantes, uma vez consumidos e passando pelo sistema digestório, estes compostos podem sofrer alterações que modificam sua bioacessibilidade. Este estudo teve como objetivo extrair compostos fenólicos utilizando solventes com diferentes polaridades e avaliar o efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* no conteúdo total de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante e quelante de ferro e cobre. As farinhas das variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5), Lavandeira (V6) de *P. lunatus* foram submetidas a extração utilizando hexano (E1), éter de petróleo (E2), clorofórmio (E3), acetato de etila (E4), etanol (E5), acetona (E6) e água (E7) na proporção 1:5 (m/v). Os compostos fenólicos obtidos foram submetidos a digestão gastrointestinal *in vitro* e a determinação do potencial antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS, bem como ao teste de quelação de cobre e ferro. A água foi mais eficiente na extração de compostos fenólicos nas variedades V1, V3, V4, V5, V6; e éter de petróleo para a V2 antes do processo digestivo. A digestão gastrointestinal acarretou em aumento dos compostos fenólicos presentes nos extratos e frente a eliminação dos radicais DPPH e ABTS e quelação de ferro e cobre. Estes dados fornecem evidências de que as diferentes variedades de *P. lunatus* estudadas constituem fontes ricas de compostos antioxidantes.

PALAVRAS-CHAVE: Bioacessibilidade; Biodisponibilidade; Componentes bioativos.

1. INTRODUÇÃO

Phaseolus lunatus é uma leguminosa empregada na alimentação humana e animal, tem se destacado por ser uma espécie rica em compostos bioativos e compostos fenólicos que apresentam capacidade antioxidante (AGOSTINI-COSTA *et al*., 2015; ALCÁZAR-VALLE *et al.,* 2021). Recentemente, os compostos bioativos derivados de *Phaseolus* sp. têm recebido grande atenção dos pesquisadores e da indústria, em virtude, das suas propriedades funcionais e biológicas (RODRIGUES MADRERA *et al*., 2021).

Atualmente, os compostos fenólicos são uma das classes de moléculas bioativas mais estudadas pela comunidade científica; estas moléculas têm benefícios à saúde bem relatados; uma dieta diária enriquecida com estes compostos é importante para promover o bem-estar geral do organismo. Desse modo, são

consideradas antioxidantes devido à doação de um átomo de hidrogênio e/ou um elétron a radicais livres, causando a quebra da reação em cadeia da oxidação (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021).

O conteúdo fenólico com funções bioativas é responsável pelo sequestro de radicais livres, quando estes são acumulados acarretam em estresse oxidativo, lesionando componentes celulares e aumentando a probabilidade da ocorrência de doenças graves, como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, distúrbios neurológicos, hipertensão e diabetes mellitus (SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ *et al*., 2021). Assim, os compostos fenólicos desempenham papel fundamental na mitigação do estresse oxidativo, e consequentemente, do aparecimento de fisiopatologias a ele associadas (RODRIGO; GONZÁLES; PAOLETTO, 2011). No entanto, os benefícios para a saúde dos fenólicos dietéticos dependem de sua bioacessibilidade durante a digestão gastrointestinal (BROOKS; CELLI, 2019).

Diversos modelos são empregados para avaliação da bioacessibilidade, quantidade de compostos liberada de uma matriz para o trato gastrointestinal, dos compostos bioativos *in vitro* (digestão gastrointestinal simulada, membranas artificiais, cultura de células Caco-2, *ex vivo* (avaliação laboratorial dos órgãos gastrointestinais), *in situ* (perfusão intestinal animal), *in vivo* (testes em animais e humanos) (SOLLANO-MENDIETA *et al*., 2021).

O efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* foi aplicado com sucesso a diversas matrizes alimentares para analisar o potencial de compostos antioxidantes, tais como carotenóides, compostos fenólicos, vitaminas (MOREIRA-ARAÚJO, 2019). De acordo com Verhoeckx *et al.* (2015) a simulação de *in vitro* apresenta como vantagens a rapidez, o baixo custo, segurança e não apresentam restrições éticas quando comparados aos modelos *in vivo*, ademais, permite o controle maior das variáveis experimentais, dessa forma, o modelo *in vitro* é mais reproduzível.

Portanto, o presente estudo visa avaliar a influência da digestão gastrointestinal *in vitro* do conteúdo fenólico total e capacidade antioxidante (ABTS, DPPH, quelante de cobre e ferro) das variedades Branquinha, Galo de Campina, Lavandeira, Rosinha, Olho de Ovelha e Mulatinho de feijão-fava.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos grãos e das farinhas de *P. lunatus*

Foram utilizados grãos comerciais das variedades Branquinha, Galo de Campina, Lavandeira, Rosinha, Olho de Ovelha e Mulatinho de *P. lunatus* obtidas em feiras livres de Garanhuns. Para preparo das farinhas, os grãos foram triturados, tamisados em moinho de facas (Marconi, MA 340, São Paulo) utilizando peneira de 18 mesh (1mm), e a farinha resultante foi seca em estufa de circulação forçada a 60 ºC, e, posteriormente submetida a extração dos fenólicos totais.

2.2. Produção dos extratos vegetais

Os extratos das variedades de *P. lunatus* foram obtidos através da metodologia descrita por Nawaz *et al.* (2020), com modificações, na qual os extratos foram preparados pelo método de extração consecutiva usando uma série de solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade em relação aos seus momentos de dipolo (hexano: 0,0, éter de petróleo: 0,1, clorofórmio: 4,1, acetato de etila: 4,4, etanol: 4,9, acetona: 5,1 e água: 9,2). A farinha de sementes foi submetida a extração em hexano na proporção 1:5 (m/v) por 24 h em temperatura ambiente (25 ± 5 ºC) usando agitador orbital (TE-424 Incubadora Refrigerada com Agitação, TECNAL, São Paulo, Brasil) e, posteriormente, em banho ultrassônico (USC 1600, Unique, São Paulo, Brasil) a 40 kHz por 10 min. Os extratos foram coletados e recuperados do solvente por rotaevaporação (Rotavapor R-210/215, Buchi, Suiça) a 25 ºC. Os extratos obtidos foram liofilizados, pesados e os componentes extraíveis totais (TEC) foram calculados usando a equação 1.

$$TEC(\%) = \frac{Massadoextrato}{Massadaamostra} * 100 \quad \textbf{Equação 1}$$

O resíduo obtido após extração em hexano foi posteriormente extraído consecutivamente com éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila, etanol, acetona e água. O processo de extração foi realizado em banho ultrassônico a 40 kHz durante 10 min, os extratos foram coletados e recuperados dos solventes em evaporador rotativo a 45 ºC. O resíduo obtido anteriormente foi submetido a

extração com o próximo solvente e as amotras obtidas em cada etapa extrativa foram coletadas, liofilizadas e pesadas para cálculo do TEC.

2.3. Determinação do conteúdo fenólico total

Para determinação do conteúdo fenólico total empregou-se a metodologia desenvolvida por Singleton e Rossi (1965), adaptada para microplacas de 96 poços. A mistura reacional consistiu na mistura de 50 µL de cada amostra digerida e sem digestão, 75 µL de água e 25 µL do reagente de Folin-Ciocalteau. Após 1 min, 50 µL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 20% foram adicionados e a mistura permaneceu em repouso durante 30 min à temperatura ambiente ao abrigo da luminosidade. A absorbância da mistura foi mensurada em leitora de microplacas (ASYS, UVM 340 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 750 nm. Uma curva de calibração foi preparada usando uma solução padrão de ácido gálico (0,312 – 1,000 $mg.mL^{-1}$) e o conteúdo fenólico total foi expresso em mg de ácido gálico equivalentes por mL de extrato (mg $GAE.mL^{-1}$ de extrato).

2.4. Atividade de quelação de Fe^{2+}

A capacidade dos extratos em quelar Fe^{2+} foi avaliada pelo método colorimétrico proposto por Carter (1971) com modificações. Inicialmente, 50 µL das amostras foram colocadas em microplacas de 96 poços em triplicata. Em seguida, 160 µL de água ultrapura e 20 µL de uma solução de $FeSO_4$ 0,30 mM foram adicionados em cada poço, seguido pela adição de 30 µL de uma solução de ferrozina 0,80 mM após 5 min de reação. No controle negativo e positivo empregou-se 50 µL de água destilada e EDTA 0,045%, respectivamente. Para o controle utilizou-se água em substutuição a amostra. A absorbância da atividade foi mensurada a 562 nm empregando leitora de microplaca após 15 min e a porcentagem de inibição determinada de acordo com a equação 2.

$$Fe^{2+}(\%) = \left(\frac{A_{Amostras}}{A_{Controle}}\right) * 100 \qquad \textbf{(Equação 2)}$$

Uma curva de calibração foi preparada usando uma solução de EDTA (0,312 - 1 $mg.mL^{-1}$) e os resultados foram expressos em mg equivalente de $EDTA.mL^{-1}$.

2.5. Atividade de quelação de Cu^{2+}

A capacidade dos extratos em quelar Cu^{2+} foi avaliada usando o método que emprega violeta de pirocatecol (PV) como agente cromógeno (SAIGA *et al.*, 2003). Em cada poço, 30 µL das amostras (1:30 v/v) ou água (controle) foram misturados com 200 µL de tampão de acetato de sódio (50 mM, pH 6,0) em triplicata. Em seguida, 30 µL de uma solução 100 $mg.mL^{-1}$ de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ foram adicionados em cada poço e deixados reagir por 2 min, quando 8,5 µL de uma solução de PV (2 mM) foram adicionados para iniciar a reação. A microplaca foi incubada por 20 min a 25 ± 2°C, e a absorbância foi mensurada a 632 nm empregando leitora de microplaca. A porcentagem de inibição foi determinada de acordo com a equação 3.

$$Fe^{2+}(\%) = \left(\frac{A_{Amostras}}{A_{Controle}}\right) * 100 \qquad \textbf{(Equação 3)}$$

Uma curva de calibração foi preparada usando uma solução padrão de EDTA (0,312 - 1 mg. mL^{-1}) e os resultados foram expressos em mg equivalente de $EDTA.mL^{-1}$.

2.6. Ensaio de eliminação do radical DPPH

O efeito de eliminação das amostras frente ao radical DPPH foi determinado de acordo com a metodologia previamente descrita por Tang *et al.* (2008). A mistura reacional consistiu em 100 µL da amostra e 100 µL de solução DPPH (0,1 mM em metanol 95%) em microplaca de 96 poços. A reação foi incubada por 30 min em temperatura ambiente protegido da luz e a absorbância mensurada a 517 nm empregando leitora de microplaca. A habilidade de eliminação do radical DPPH foi calculado usando a equação 4.

$$Eliminação\ do\ radical\ DPPH(\%) = \left(\frac{A_{Controle} - A_{Amostra}}{A_{Controle}}\right) * 100 \qquad \textbf{(Equação 4).}$$

Onde, o $A_{Amostra}$ é a absorbância das amostras, $A_{Controle}$ é a absorbância da amostra que contém água. Os resultados foram expressos em equivalência de ácido gálico (0,312 - 1 $mg.mL^{-1}$).

2.7. Ensaio de eliminação do radical ABTS

O ensaio de atividade antioxidante envolveu a eliminação do $ABTS^{+\bullet}$, gerado a partir da oxidação de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina- 6-ácido sulfônico (ABTS) 7 mM, com persulfato de potássio 2,45 mM incubado ao abrigo da luz por 12 horas antes da utilização. A solução do $ABTS^{+\bullet}$ foi ajustada para absorbância de 0,700 ± 0,02 a 734 nm em espectrofotômetro, por diluição em tampão fosfato 5 mM, de acordo com metodologia descrita por Re *et al.* (1999) com modificações. Uma alíquota de 50 µL da amostra foi misturada a 150 µL do radical ABTS+, a mistura reacional foi incubada por 10 min ao abrigo da luz a temperatura ambiente. A absorbância da reação foi mensurada a 734 nm empregando leitora de microplaca e a atividade de eliminação calculada de acordo com a equação 5.

$$Eliminação\ do\ radical\ ABTS\ (\%) = \left(\frac{A_{Controle} - A_{Amostra}}{A_{Controle}}\right) * 100 \quad \textbf{(Equação 5)}$$

Onde, o $A_{Amostra}$ é a absorbância das amostras e $A_{Controle}$ é a absorbância do controle negativo empregando tampão fosfato. Os resultados foram expostos em percentual e equivalência de ácido gálico (0,312 - 1 $mg.mL^{-1}$).

2.8. Simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*

A simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* consistiu de uma fase oral, seguida de uma fase gástrica e uma fase intestinal de acordo com a metodologia descrita por Ma *et al.* (2021). Na etapa de digestão oral, 50 mg de farinha de feijão-fava foi adicionado à 750 µL do tampão de digestão oral (75 $U.mL^{-1}$ α-amilase e 0,75 mM $CaCl_2$ em solução tampão fosfato de sódio 0,01 M), e o pH ajustado para 6,5. A amostra de digestão oral foi coletada após 10 min de incubação a 37 ºC.

Na etapa de digestão gástrica, foi adicionado à mistura das farinhas de fava restantes da última etapa ao tampão de digestão gástrica (2000 $U.mL^{-1}$ de pepsina e 0,075 M de $CaCl_2$ em tampão fosfato de sódio, 750 µL) ajustado para pH 2,0 empregando HCl 0,1 M, e a amostra de digestão gástrica foi coletada após digestão de 1 h. Na etapa de digestão intestinal, foi adicionado à mistura das farinhas restantes

da última etapa o tampão de digestão intestinal (15 $mg.mL^{-1}$ de pancreatina e sais biliares 10 mM contendo $CaCl_2$ a 0,3 mM em tampão fosfato de sódio) ajustado para pH 7,4 empregando NaOH 0,1 M, e a amostra de digestão intestinal foi coletada após digestão por 2 h. Todos os ensaios de simulação de digestão ocorreram sob agitação orbital a 150 rpm (TE-424 Incubadora Refrigerada com Agitação, TECNAL, Piracicaba, Brasil), a temperatura de 37 °C.

A digestão foi interrompida em banho fervente por 5 min, ocasionando a inativação enzimática. As amostras foram centrifugadas a 4000 x *g* por 10 min a 4 ºC (Hettich Zentrifugen, D-78532 Tuttlingen, Alemanha) e o sobrenadante utilizado para determinação dos compostos fenólicos totais e das atividades antioxidantes.

2.9. Análise Estatística

Para análise estatística, os parâmetros foram analisados em triplicata e os dados expressos como média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre os extratos das farinhas de fava submetidos aos tratamentos pré e pós digestão *in vitro* foram obtidas através da avaliação de diferenças entre as médias empregando-se o teste de Scott-Knott por meio do uso do software R Project versão 4.0.5, a nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado de rendimento dos extratos para as seis variedades de feijão-fava utilizando diferentes solventes (hexano, éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila, etanol, acetona e água) foi calculado como componentes extraíveis totais (CET), apresentaos na Tabela 1. A água e clorofórmio apresentaram os maiores rendimentos em relação aos componentes extraíveis totais. Os resultados obtidos mostram que há uma relação entre a polaridade do solvente e o rendimento da fração extraível, observa-se diferença no rendimento dos extratos para a maioria das variedades e extratos.

Tabela 1. Componentes extraíveis totais (CET) de farinhas de *Phaseolus lunatus var*. Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5), Lavandeira (V6).

Solventes	CET (%)					
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Hexano	1,32^{Fc}	2,46^{Bd}	1,46^{Ec}	1,58^{Cd}	1,53^{Dd}	7,28^{Ab}
Éter de Petróleo	0,35^{Cg}	0,54^{Bg}	0,28^{Ff}	0,30^{Eg}	0,33^{Dg}	1,69^{Ad}
Clorofórmio	11,35^{Ba}	8,37^{Da}	6,18^{Ea}	3,67^{Fb}	9,32^{Ca}	16,68^{Aa}
Acetato de Etila	1,01^{Ae}	0,95^{Bf}	0,20^{Fg}	0,62^{De}	0,75^{Cf}	0,61^{Ef}
Etanol	0,68^{Ff}	1,45^{Ce}	0,70^{Ee}	1,94^{Ac}	0,96^{De}	1,46^{Be}
Acetona	1,12^{Cd}	4,35^{Ab}	0,90^{Dd}	0,48^{Ef}	2,32^{Bc}	0,39^{Fg}
Água	5,54^{Cb}	3,15^{Ec}	2,75^{Fb}	4,21^{Da}	7,55^{Ab}	6,70^{Bc}

Os resultados representam os componentes extraíveis totais expressos em percentual (%) de acordo com a eficiência dos solventes utilizados para a extração e das variedades de feijão-fava para cada solvente. Os valores médios que carregam sobrescritos diferentes nas linhas (letras maiúsculas) e nas colunas (letras minúsculas) diferem entre si ao nível de significância de 5%.

As porcentagens máximas de recuperação foram registradas em extratos de clorofórmio seguidos de extratos água. Para as seis variedades de *P. lunatus* estudadas, os maiores rendimentos corresponderam ao extrato de clorofórmio (16,68%) da variedade Lavandeira (V6) e ao extrato de água (7,55%) da cultivar Branquinha (V5), os quais diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Os menores rendimentos corresponderam aos extratos de éter de petróleo (0,30%) e acetato de etila (0,20%), para as variedades Mulatinho e galo de Campina, respectivamente.

Uma resposta positiva de CET em relação à polaridade do solvente foi observada para cada variedade. Verificou-se que o rendimento do extrato era comparativamente alto em água, um solvente polar, e em clorofórmio, com características polares, do que em não polares. A extração com solventes de polaridade crescente envolve a separação de compostos vegetais de acordo com seu grau de solubilidade. O alto valor de CET em relação a polaridade indica a presença de componentes mais polares, dentre os quais compostos fenólicos, e solúveis nas sementes de feijão-fava em comparação com os não polares (NAWAZ *et al.*, 2020).

Nawaz *et al.* (2020) ao avaliarem o efeito da polaridade do solvente para o rendimento de extração e nas propriedades antioxidantes de compostos fitoquímicos em sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) relataram que a extração com

substâncias polares resultou em alto rendimento de extrato, mas menor teor de fenólicos e flavonoides em comparação com os apolares.

A extração com solventes orgânicos é um dos métodos mais utilizados na recuperação de compostos fenólicos de vegetais. Entretanto, é necessário o conhecimento de alguns fatores que podem influenciar as condições de extração, tais como o tipo de substância que será utilizado, a temperatura que as amostras serão submetidas, tempo de extração, dentre outros fatores que podem influenciar significativamente no rendimento dos extratos obtidos (NACZK; SHAHIDI, 2006).

A determinação do conteúdo fenólico total das variedades antes e após o processo de digestão *in vitro* (Tabela 2). Todas as amostras digeridas por enzimas *in vitro* apresentaram conteúdo fenólico total significativamente ($p < 0,05$) maior do que os extratos não digeridos. Assim, a quantidade máxima de compostos fenólicos totais foi liberada durante o processo de digestão *in vitro* como resultado da atividade das enzimas (*α*-amilase, pepsina e pancreatina) do trato gastrointestinal.

No ensaio sem digestão, de um modo geral, observou-se que diferença estatística ($p< 0,05$) entre as variedades, enquanto que para os solventes utilizados na extração, os maiores valores foram registrados para os extratos aquosos, que diferiram estatisticamente dos demais. O maior teor de fenólicos foi registrado para a amostra aquosa da variedade Galo de Campina (154,83 EqAG mg. mL^{-1}), e o menor para a amostra obtida com acetato de etila da variedade Lavandeira (51,18 EqAG mg. mL^{-1}).

No ensaio pós-digestão, observou-se um aumento significante ($p< 0,05$) no teor de compostos de fenólicos. Os melhores resultados foram registrados para os extratos da variedade galo de Campina, que diferiu estatisticamente das demais variedades. Em relação aos extratos, os solventes acetato de etila, clorofórmio e água apresentaram melhor potencial extrator de compostos fenólicos em relação aos demais solventes utilizados.

Em relação à avaliação das variedades dentro de cada nível de tratamento (digerido e não digerido) ndependente dos solventes, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) no teor de compostos fenólicos entre as seis variedades estudadas. Foi possível observar que houve um aumento do teor de fenólicos após o processo de digestão *in vitro* para todas as variedades, destacando-se a cultivar Galo de Campina, que diferiu estatisticamente das demais variedades.

Esses resultados sugerem que a digestão melhora a liberação de compostos fenólicos da matriz do feijão-fava. De acordo com Rodríguez-Roque *et al.* (2013), o pH ácido e a atividade enzimática durante a fase digestiva da digestão gastrointestinal, que podem induzir a hidrólise de alguns compostos fenólicos ligados a outros constituintes dos alimentos. Ademais, as condições gástricas aumentam a capacidade de extração de compostos fenólicos da matriz alimentar. Saura-Calixto, Serrano e Goñi (2007) também relataram que fenóis ligados a compostos de alta massa molecular, como proteínas e carboidratos, pode ser liberada por ação de enzimas digestivas, levando a um aumento significativo de suas concentrações após a digestão gástrica.

Tabela 2. Fenólicos totais em extratos de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* antes e pós digestibilidade *in vitro*. Extrato de hexano (E1), éter de petróleo (E2), clorofórmio (E3), acetato de etila (E4), etanol (E5), acetona (E6) e água (E7). Var. Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).

	Fenólicos totais sem digestão					
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
E1	93,63 ± 2,48Ba^{Bb}	82,60 ± 8,27Bb^{Bb}	113,29 ± 20,42Ab^{Aa}	88,67 ± 8,29Bc^{Bb}	58,90 ± 7,02Ca^{Dc}	66,25 ± 5,21Cb^{Cc}
E2	92,16 ± 4,13Aa^{Bb}	103,37 ± 26,15Aa^{Bb}	102,27 ± 17,51Ac^{Aa}	82,79 ± 16,25Bc^{Bb}	68,08 ± 7,16Ba^{Dc}	70,66 ± 4,45Bb^{Cc}
E3	85,91 ± 11,03Aa^{Bb}	92,16 ± 6,80Aa^{Bb}	90,50 ± 17,01Ac^{Aa}	65,14 ± 1,68Bc^{Bb}	69,19 ± 1,45Ba^{Dc}	68,08 ± 4,77Bb^{Cc}
E4	62,75 ± 4,49Bb^{Bb}	73,78 ± 9,74Bb^{Bb}	115,68 ± 60,01Ab^{Aa}	96,02 ± 2,54Ab^{Bb}	69,74 ± 13,38Ba^{Dc}	51,18 ± 3,58Bb^{Cc}
E5	73,05 ± 3,97Ab^{Bb}	75,25 ± 15,16Ab^{Bb}	71,21 ± 6,66Ad^{Aa}	67,17 ± 8,25Ac^{Bb}	59,26 ± 4,80Ca^{Dc}	63,49 ± 9,49Cb^{Cc}
E6	82,23 ± 3,03Aa^{Bb}	66,06 ± 0,84Bb^{Bb}	79,29 ± 4,97Ad^{Aa}	77,46 ± 20,62Ac^{Bb}	65,33 ± 11,47Ba^{Dc}	54,48 ± 1,93Bb^{Cc}
E7	98,77 ± 9,49Ca^{Bb}	87,01 ± 6,93Ca^{Bb}	154,83 ± 18,86Aa^{Aa}	117,15 ± 26,48Ba^{Bb}	80,40 ± 8,86Ca^{Dc}	93,26 ± 9,71Ca^{Cc}
	Fenólicos totais pós-digestão					
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
E1	275,38 ± 13,17Aa^{Bb}	263,81 ± 7,16Aa^{Bb}	271,34 ±8,03Ab^{Aa}	272,99 ±7,84Aa^{Bb}	179,27 ± 35,05Cc^{Dc}	237,71 ± 5,52Ba^{Cc}
E2	275,57 ±8,12Aa^{Bb}	254,25 ± 9,24Ba^{Bb}	277,59 ±3,06Ab^{Aa}	250,21 ±5,12Ba^{Bb}	242,30 ± 20,42Ba^{Dc}	222,82 ± 7,52Ca^{Cc}
E3	270,24 ± 11,98Aa^{Bb}	279,43 ± 8,98Aa^{Bb}	295,97 ± 8,36Aa^{Aa}	267,30 ±5,09Aa^{Bb}	243,41 ± 28,66Ba^{Dc}	254,62 ± 20,34Ba^{Cc}
E4	270,79 ± 19,03Ca^{Bb}	290,45 ± 5,35Ba^{Bb}	317,10±15,32Aa^{Aa}	271,71 ±6,39Ca^{Bb}	231,64 ± 16,51Da^{Dc}	249,66 ± 49,55Da^{Cc}
E5	262,15 ± 10,50Aa^{Bb}	274,65±15,32Aa^{Bb}	288,98 ± 5,21Aa^{Aa}	271,52 ±5,25Aa^{Bb}	232,01 ±4,13Ba^{Dc}	231,64 ± 8,72Ba^{Cc}
E6	287,15 ±6,19Aa^{Bb}	271,71 ± 5,57Aa^{Bb}	263,99 ±7,34Ab^{Aa}	257,92 ±9,80Aa^{Bb}	218,96 ±1,38Ba^{Dc}	234,59 ± 13,24Ba^{Cc}
E7	278,69 ± 11,86Aa^{Bb}	277,96 ± 5,73Aa^{Bb}	302,03 ± 9,64Aa^{Aa}	280,71 ±7,50Aa^{Bb}	208,31 ± 22,80Cb^{Dc}	250,57 ± 1,90Ba^{Cc}

Os resultados representam a média das triplicatas (em mg equivalentes de ácido gálico.mL^{-1}) e seu respectivos desvios-padrão. As letras maiúsculas nas linhas referem-se à análise da eficiência dos extratos dentro de cada nível de variedade e as letras minúsculas nas colunas referem-se ao potencial das variedades dentro de cada nível de solvente utiliizado na extração antes e após o processo de digestão *in vitro*. As letras maiúsculas e minúsculas em exponencial são referentes à média das variedades dentro de cada nível de tratamento (digerido e não digerido, respectivamente) indepedente dos solventes.

Na tabela 3 observa-se que a capacidade quelante de ferro manteve-se entre 33,20 e 85,34 mg equivalentes de EDTA.mL^{-1}, no ensaio sem digestão, enquanto que no ensaio pós-digestão foram obtidos valores entre 17,72 e 173,05 mg equivalentes de EDTA.mL^{-1}. Antes da digestão gastrointestinal *in vitro*, o maior potencial quelante de íons ferrosos foi registrado para os extratos de água, etanol, acetona e acetato de etila que, de um modo geral, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Já em relação às variedades de feijão-fava, os melhores resultados foram observados para Galo de Campina, seguida das Olho de Ovelha e Rosinha.

No ensaio pós digestão, foi possível observar um aumento na quelação de íons ferrosos. Os melhores resultados foram observados na variedade Olho de Ovelha, com valores entre 20,96 e 173,05 mg equivalentes de EDTA.mL^{-1}, e na cultivar Lavandeira, com valores entre 45,43 e 146,00 mg equivalentes de EDTA.mL^{-1}, seguidas da variedade Mulatinho, a qual apresentou valores entre 19,15 e 154,29 mg equivalentes de EDTA.mL^{-1}. Os extratos de acetato de etila, clorofórmio e água apresentaram valores superiores em relação aos demais.

Já em relação à avaliação das variedades dentro de cada tratamento (com e sem digestão) independente dos solventes, não houve diferença estatística considerável ($p < 0,05$) na atividade quelante de ferro. Foi possível observar que houve um aumento da capacidade quelante de íons ferrosos após o processo digestório *in vitro*, mas que não diferiu de forma significativa do ensaio sem digestão entre as variedades. Sendo que os maiores valores foram registrados para a variedade Olho de Ovelha.

Salawu *et al.* (2016) relataram que compostos fenólicos com poder redutor reduzirá o íon férrico (Fe^{3+}) a íon ferroso (Fe^{2+}), o que indica que os compostos fenólicos obtidos a partir das seis variedades de *P. lunatus* podem atuar como doadores de elétrons e podem reduzir os intermediários oxidados, O_2^- (ânion superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), OH^- (hidroxila radical) dos processos de peroxidação lipídica.

Tabela 3. Atividade quelante de ferro de compostos fenólicos presentes em extratos de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* pré e pós-digestão *in vitro.* Extrato de hexano (E1), éter de petróleo (E2), clorofórmio (E3), acetato de etila (E4), etanol (E5), acetona (E6) e água (E7). *Var*. Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).

Atividade quelante de ferro sem digestão (mg.Eq AG.ml^{-1})						
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
E1	56,34 ± 1,00Bb^{Aa}	65,77 ± 0,42Ab^{Aa}	66,20 ± 4,57Ab^{Aa}	33,20 ± 4,14Cc^{Aa}	32,62 ± 1,28Cc^{Aa}	48,62 ± 0,42Bd^{Aa}
E2	59,34 ± 0,85Bb^{Aa}	75,20 ± 0,14Aa^{Aa}	78,62 ± 1,00Aa^{Aa}	62,34 ± 0,71Bb^{Aa}	60,20 ± 4,00Bb^{Aa}	57,05 ± 2,00Bc^{Aa}
E3	74,48 ± 2,57Aa^{Aa}	74,91 ± 2,42Aa^{Aa}	76,77 ± 0,85Aa^{Aa}	71,48 ± 3,00Aa^{Aa}	56,05 ± 1,28Bb^{Aa}	47,48 ± 7,00Cd^{Aa}
E4	70,05 ± 6,14Ba^{Aa}	64,62 ± 0,71Bb^{Aa}	68,20 ± 0,57Bb^{Aa}	69,34 ± 0,57Ba^{Aa}	85,34 ± 1,74Aa^{Aa}	66,05 ±10,71Bb^{Aa}
E5	78,34 ± 5,28Aa^{Aa}	66,91 ± 3,00Bb^{Aa}	77,34 ± 2,00Aa^{Aa}	73,91 ± 0,57Aa^{Aa}	61,05 ±12,85Bb^{Aa}	73,62 ± 6,85Aa^{Aa}
E6	73,48 ± 3,85Aa^{Aa}	78,20 ± 2,28Aa^{Aa}	70,77 ± 4,57Ab^{Aa}	77,34 ± 0,00Aa^{Aa}	60,34 ± 5,85Bb^{Aa}	64,20 ±16,28Bb^{Aa}
E7	74,34 ± 0,71Aa^{Aa}	72,62 ± 3,28Aa^{Aa}	79,05 ± 5,42Aa^{Aa}	72,77 ± 6,28Aa^{Aa}	57,91 ± 7,42Ab^{Aa}	78,34 ± 1,00Aa^{Aa}
Atividade quelante de ferro pós-digestão (mg.Eq AG.ml^{-1})						
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
E1	21,43 ± 2,16Bd^{Aa}	20,96 ± 3,31Be^{Aa}	27,72 ± 1,46Bd^{Aa}	19,15 ± 1,18Be^{Aa}	17,72 ± 2,59Be^{Aa}	88,29 ± 8,49Ac^{Aa}
E2	75,43 ± 1,08Bc^{Aa}	69,15 ±11,05Bd^{Aa}	67,24 ± 7,23Bc^{Aa}	62,00 ± 2,46Bd^{Aa}	33,53 ± 2,42Cd^{Aa}	99,15 ± 2,97Ab^{Aa}
E3	103,81±8,29Ab^{Aa}	111,72±3,68Ab^{Aa}	89,81±3,62Bb^{Aa}	101,91±4,22Ab^{Aa}	102,96±3,13Ab^{Aa}	100,96±12,38Ab^{Aa}
E4	121,24 ±2,46Ba^{Aa}	108,00±21,95Cb^{Aa}	87,24±13,06Db^{Aa}	154,29±10,90Aa^{Aa}	126,67 ±5,15Ba^{Aa}	146,00±12,15Aa^{Aa}
E5	77,72 ± 3,05Ac^{Aa}	81,72 ± 5,36Ac^{Aa}	81,05 ± 4,87Bb^{Aa}	85,24 ± 3,14Ac^{Aa}	79,53 ± 2,32Ac^{Aa}	63,53 ± 1,74Bd^{Aa}
E6	66,96 ± 2,42Bc^{Aa}	80,77 ± 1,73Ac^{Aa}	73,24 ± 6,91Bc^{Aa}	72,10 ± 9,86Bd^{Aa}	70,00 ± 1,43Bc^{Aa}	81,62 ± 2,44Ac^{Aa}
E7	67,91 ± 1,59Dc^{Aa}	173,05 ±2,72Aa^{Aa}	110,67±4,80Ba^{Aa}	85,34 ± 8,32Cc^{Aa}	119,43 ±3,13Ba^{Aa}	45,43 ± 2,10Ee^{Aa}

Os resultados representam a média das triplicatas (em mg equivalentes de ácido gálico.mL^{-1}) e seu respectivos desvios-padrão. As letras maiúsculas nas linhas referem-se à análise da eficiência dos extratos dentro de cada nível de variedade e as letras minúsculas nas colunas referem-se ao potencial das variedades dentro de cada nível de solvente utiliizado na extração antes e após o processo de digestão *in vitro*. As letras maiúsculas e minúsculas em exponencial são referentes à média das variedades dentro de cada nível de tratamento (digerido e não digerido, respectivamente) indepedente dos solventes

A determinação da atividade quelante de íons cobre dos extratos e variedades antes e após o processo de digestão *in vitro* está presente na tabela 4. Foi possível observar que não se obteve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para as variedades e solventes no ensaio sem digestão.

No ensaio pós-digestão *in vitro*, observou-se um aumento significante ($p < 0,05$) na atividade quelante de cobre. Os melhores resultados foram registrados para a variedade Branquinha, Lavandeira e Mulatinho, respectivamente. Os extratos aquosos obtiveram valores superiores em relação aos demais. O maior potencial quelante de cobre foi observado no extrato aquoso da variedade Olho de Ovelha, e o menor potencial foi registrado para aquele obtido empregando acetato de etila da variedade Galo de Campina, com valores de 120,79 e 7,04 mg equivalentes de $EDTA.mL^{-1}$, respectivamente.

Em relação à avaliação das variedades dentro de cada nível de tratamento, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) da atividade quelante de cobre antes e após a digestão. Foi possível observar que houve um aumento significativo da capacidade quelante de íons cobre após a digestão gastrointestinal *in vitro* para a variedade Branquinha, que diferiu estatisticamente das demais variedades.

Gawlik-Dziki *et al.* (2021) estudaram o potencial fenólico e antioxidante potencialmente bioacessível de brotos de lentilha (*Lens culinaris*) frescos e armazenados e obtiveram valores entre 0,51 e 8,12 mg $EDTA.g^{-1}$. Esses autores relataram que compostos com capacidade de quelar íons metálicos foram liberados com mais eficácia após a digestão gastrointestinal, semelhante ao que foi encontrado no presente estudo.

O potencial antioxidante de compostos fenólicos extraídos no presente estudo, deve-se de acordo com Karás *et al.* (2016), a biodisponibiliade de polifenóis e seus metabólitos após o processo de digestão gastrointestinal, e pode ser determinada por sua estrutura química que apresenta componentes capazes de ligar-se aos íons metálicos, e que a biodisponibilidade de cada classe de polifenóis é influenciada principalmente pela massa molecular, presença de glicosilação e esterificação.

Tabela 4. Atividade quelante de cobre de compostos fenólicos presentes em extratos de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* pré e pós-digestão *in vitro*. Extrato de hexano (E1), éter de petróleo (E2), clorofórmio (E3), acetato de etila (E4), etanol (E5), acetona (E6) e água (E7). Var. Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) eLavandeira (V6).

Atividade quelante de cobre sem digestão (mg.Eq AG.ml^{-1})						
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
E1	26,22 ± 2,34Aa^{Ca}	22,09 ± 4,48Aa^{Ca}	25,88 ± 4,05Aa^{Da}	18,16 ± 3,15Aa^{Ba}	21,37 ± 2,06Aa^{Aa}	17,68 ± 1,31Ab^{Ba}
E2	1,22 ± 0,58Bb^{Ca}	23,02 ± 3,11Aa^{Ca}	25,20 ± 1,35Aa^{Da}	21,03 ± 2,94Aa^{Ba}	18,31 ± 1,77Aa^{Aa}	17,09 ± 0,55Ab^{Ba}
E3	13,89 ± 1,60Aa^{Ca}	19,96 ± 3,71Aa^{Ca}	13,94 ± 2,38Ab^{Da}	12,04 ± 2,67Aa^{Ba}	18,94 ± 1,47Aa^{Aa}	19,42 ± 1,90Ab^{Ba}
E4	21,41 ± 4,46Aa^{Ca}	13,55 ± 4,18Ba^{Ca}	28,31 ± 7,79Aa^{Da}	16,46 ± 4,87Ba^{Ba}	17,87 ± 0,38Ba^{Aa}	15,39 ± 2,56Bb^{Ba}
E5	18,55 ± 6,36Ba^{Ca}	19,57 ± 2,40Ba^{Ca}	14,81 ± 3,58Bb^{Da}	16,03 ± 2,04Ba^{Ba}	16,37 ± 2,92Ba^{Aa}	29,91 ± 19,74Aa^{Ba}
E6	20,49 ± 2,14Aa^{Ca}	14,96 ± 1,76Aa^{Ca}	14,96 ± 2,01Ab^{Da}	20,83 ± 3,75Aa^{Ba}	12,92 ± 2,05Aa^{Aa}	21,95 ± 1,05Ab^{Ba}
E7	16,12 ± 1,33Aa^{Ca}	26,12 ± 20,30Aa^{Ca}	17,92 ± 2,75Ab^{Da}	15,54 ± 2,40Aa^{Ba}	18,55 ± 5,31Aa^{Aa}	19,57 ± 0,30Ab^{Ba}
Atividade quelante de cobre pós-digestão (mg.Eq AG.ml^{-1})						
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
E1	40,25 ± 0,87Db^{Ca}	18,99 ± 2,33Ee^{Ca}	8,74 ± 0,99Fd^{Da}	49,18 ± 9,96Cc^{Ba}	56,76 ± 1,90Bd^{Aa}	70,64 ± 4,74Ac^{Ba}
E2	55,20 ± 7,83Ca^{Ca}	13,58 ± 4,32Fe^{Ca}	19,62 ± 7,44Ec^{Da}	39,33 ± 2,78Dd^{Ba}	75,35 ± 7,19Bc^{Aa}	94,97 ± 2,18Aa^{Ba}
E3	26,61 ± 3,34Ec^{Ca}	75,51 ±11,10Db^{Ca}	17,29 ± 0,63Fc^{Da}	92,97 ± 5,38Ba^{Ba}	104,88 ±7,24Ab^{Aa}	84,19 ± 3,72Cb^{Ba}
E4	45,88 ± 1,82Cb^{Ca}	45,11 ± 3,64Cc^{Ca}	7,04 ± 0,58Dd^{Da}	65,59 ± 5,36Bb^{Ba}	61,08 ± 0,80Bd^{Aa}	74,33 ± 5,93Ac^{Ba}
E5	23,40 ± 4,31Dc^{Ca}	18,99 ± 1,49De^{Ca}	32,58 ± 3,03Cb^{Da}	60,69 ± 2,94Ab^{Ba}	53,21 ± 3,70Bd^{Aa}	33,36 ± 1,11Ce^{Ba}
E6	12,97 ± 1,54Dd^{Ca}	24,91 ± 2,94Cd^{Ca}	15,88 ± 1,70Dc^{Da}	26,32 ± 2,06Ce^{Ba}	54,82 ± 2,33Ad^{Aa}	42,68 ± 1,23Bd^{Ba}
E7	51,42 ± 1,93Ea^{Ca}	120,79 ± 1,13Aa^{Ca}	75,98 ±18,12Ca^{Da}	66,95 ± 1,67Db^{Ba}	113,95 ±5,03Ba^{Aa}	17,53 ± 1,35Ff^{Ba}

Os resultados representam a média das triplicatas (em mg equivalentes de ácido gálico.mL^{-1}) e seu respectivos desvios-padrão. As letras maiúsculas nas linhas referem-se à análise da eficiência dos extratos dentro de cada nível de variedade e as letras minúsculas nas colunas referem-se ao potencial das variedades dentro de cada nível de solvente utiliizado na extração antes e após o processo de digestão *in vitro*. As letras maiúsculas e minúsculas em exponencial são referentes à média das variedades dentro de cada nível de tratamento (digerido e não digerido, respectivamente) indepedente dos solventes.

Na tabela 5 estão apresentados os resultados de eliminação do radical DPPH dos extratos e das variedades. É possível obervar que apesar dos resultados terem sido inferiores no ensaio sem digestão em relação aos resultados obtidos após o processo de digestão *in vitro*, todas as variedades apresentaram capacidade de eliminação do radical DPPH, entretanto, nem todos os extratos apresentaram atividade.

No ensaio de eliminação do radical DPPH sem digestão, os melhores resultados foram observados nas variedades Olho de Ovelha, Rosinha, Mulatinho e Branquinha. Os valores para essa atividade mantiveram-se entre 0,00 e 11,99 EqAG $mg.mL^{-1}$. Para as seis espécies de *P. lunatus* estudadas, as maiores atividades corresponderam ao extrato de éter de petróleo da variedade Olho de Ovelha (11,99 EqAG $mg.mL^{-1}$) e ao extrato de hexano da cultivar Rosinha (11,41 EqAG $mg.mL^{-1}$).

No ensaio pós-digestão, observou-se um aumento gradativo significante ($p < 0,05$) na eliminação do radical DPPH. Dentre os extratos e variedades, os melhores resultados foram obtidos empregando clorofórmio e água da cultivar Branquinha, que diferiu estatisticamente das demais, apresentando maior potenciabilidade para eliminação do radical DPPH.

Já em relação à avaliação das variedades dentro de cada nível de tratamento (digerido e não digerido) independente dos solventes, houve diferença significativa ($p < 0,05$) da atividade de eliminação do radical DPPH antes e após a digestão. Foi possível observar que houve um aumento da capacidade de eliminação após o processo de digestão *in vitro*, e os melhores resultados foram observados para a variedade Branquinha, que diferiu estatisticamente das demais.

Rodríguez-Roque *et al.* (2013) ao avaliarem a atividade antioxidante de compostos fenólicos do leite de soja submetidos à digestão gastrointestinal *in vitro*, relataram um aumento de 30% na eliminação do radical DPPH durante a fase estomacal da digestão, o qual foi atribuído à liberação de compostos fenólicos da matriz alimentar relacionada com o pH ácido do estômago.

De acordo com Marchese *et al.* (2014), as alterações nos conteúdos de fenólicos nas amostras de digestão, como as observadas para todas as variedades estudadas, podem levar a variações correspondentes das atividades funcionais, como efeitos antioxidantes e antibacterianos.

Essa correlação entre teor de fenólicos e atividade antioxidante também foi encontrada em outros materiais vegetais submetidos à digestão *in vitro* (ZHENG *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2019). Sendo assim, é possível afirmar que o teor de fenólicos antes e após o processo de digestão das variedades de feijão-fava é um dos fatores que interfere diretamente na capacidade antioxidante dos extratos.

Tabela 5. Atividade de eliminação do radical DPPH da digestão gastrointestinal *in vitro* de compostos fenólicos presentes em extratos de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* extrato de hexano (E1), éter de petróleo (E2), clorofórmio (E3), acetato de etila (E4), etanol (E5), acetona (E6) e água (E7). *Var*. Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).

Eliminação do radical DPPH sem digestão (mg.Eq AG.ml^{-1})						
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
E1	11,41 ± 1,41Aa^{Ba}	3,13 ± 0,83Cc^{Ba}	5,35 ± 0,53Ba^{Ba}	5,92 ± 0,26Ba^{Ba}	2,94± 0,04Cb^{Aa}	2,18 ± 0,19Ca^{Ba}
E2	8,29 ± 0,57Bb^{Ba}	11,99 ± 3,58Aa^{Ba}	2,25 ± 0,04Db^{Ba}	5,73 ± 1,83Ca^{Ba}	5,04 ± 1,07Ca^{Aa}	2,71 ± 0,26Da^{Ba}
E3	0,54 ± 0,00Bd^{Ba}	0,00 ± 0,00Bd^{Ba}	0,00 ± 0,00Bc^{Ba}	1,38 ± 0,76Ab^{Ba}	2,71 ± 0,57Ab^{Aa}	2,41 ± 0,19Aa^{Ba}
E4	0,00 ± 0,00Bd^{Ba}	0,00 ± 0,00Bd^{Ba}	0,00 ± 0,00Bc^{Ba}	1,83 ± 0,45Ab^{Ba}	1,72 ± 0,57Ab^{Aa}	2,10 ± 0,80Aa^{Ba}
E5	0,00 ± 0,00Cd^{Ba}	8,13 ± 0,87Ab^{Ba}	0,00 ± 0,00Cc^{Ba}	0,84 ± 0,38Cb^{Ba}	1,83 ± 0,07Bb^{Aa}	1,99 ± 0,99Ba^{Ba}
E6	0,00 ± 0,00Cd^{Ba}	0,69 ± 0,00Cd^{Ba}	0,00 ± 0,00Cc^{Ba}	5,27 ± 1,90Aa^{Ba}	2,71 ± 0,95Bb^{Aa}	2,33± 0,11Ba^{Ba}
E7	2,22 ± 0,00Ac^{Ba}	0,23 ± 0,00Bd^{Ba}	0,00 ± 0,00Bc^{Ba}	0,00 ± 0,00Bb^{Ba}	2,25 ± 0,04Ab^{Aa}	1,61 ± 0,00Aa^{Ba}
Eliminação do radical DPPH pós-digestão (mg.Eq AG.ml^{-1})						
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
E1	18,90 ± 2,60Bd^{Ba}	9,36 ± 1,50Bc^{Ba}	10,33 ± 0,46Bc^{Ba}	38,04 ±1,26Ac^{Ba}	45,64 ±24,36Ac^{Aa}	49,79 ±10,09Ab^{Ba}
E2	55,13 ±12,11Ab^{Ba}	5,08 ± 0,37Cc^{Ba}	33,20 ± 1,43Bb^{Ba}	27,63 ±3,70Bc^{Ba}	59,72 ±23,15Ab^{Aa}	65,54 ±10,75Aa^{Ba}
E3	76,36 ± 5,73Aa^{Ba}	75,64 ± 6,83Aa^{Ba}	70,07 ±22,41Aa^{Ba}	61,24 ±3,35Ab^{Ba}	89,16 ±12,19Aa^{Aa}	69,49 ±14,26Aa^{Ba}
E4	38,80 ±11,16Ac^{Ba}	39,00 ± 3,19Ab^{Ba}	3,51 ± 2,39Cc^{Ba}	20,20 ±1,68Bd^{Ba}	40,63 ± 6,67Ac^{Aa}	35,26 ± 7,18Ac^{Ba}
E5	7,53 ± 1,91Bd^{Ba}	11,29 ± 0,95Bc^{Ba}	14,32 ± 3,74Bc^{Ba}	39,36 ±9,14Ac^{Ba}	32,39 ± 1,52Ac^{Aa}	16,56 ±11,14Bd^{Ba}
E6	11,37 ± 8,77Bd^{Ba}	13,33 ± 5,24Bc^{Ba}	3,66 ± 1,43Bc^{Ba}	5,13 ± 2,03Bd^{Ba}	35,72 ± 8,92Ac^{Aa}	24,42 ± 8,08Ac^{Ba}
E7	63,71 ± 7,71Bb^{Ba}	74,12 ± 12,68Ba^{Ba}	72,79 ± 2,15Ba^{Ba}	84,24 ±6,92Aa^{Ba}	93,43 ±17,22Aa^{Aa}	12,03 ± 2,93Cd^{Ba}

Os resultados representam a média das triplicatas (em mg equivalentes de ácido gálico/mL^{-1}) e seu respectivos desvios-padrão. As letras maiúsculas nas linhas referem-se à análise da eficiência dos extratos dentro de cada nível de variedade e as letras minúsculas nas colunas referem-se ao potencial das variedades dentro de cada nível de solvente utiliizado na extração antes e após o processo de digestão *in vitro*. As letras maiúsculas e minúsculas em exponencial são referentes à média das variedades dentro de cada nível de tratamento (digerido e não digerido, respectivamente) indepedente dos solventes.

A determinação da atividade de eliminação do radical ABTS dos extratos de *P. lunatus* está presente na tabela 6. O potencial antioxidante dos extratos antes do processo de digestão *in vitro* variou entre 19,14 e 79,49 EqAG $mg.mL^{-1}$, destacando-se os resultados obtidos para os extratos de hexano. No ensaio sem digestão, o maior potencial foi registrado para o extrato de hexano da variedade Galo de Campina (79,49 EqAG $mg.mL^{-1}$) e o menor para o extrato aquoso da variedade Rosinha (19,14 EqAG $mg.mL^{-1}$). De um modo geral, apesar da variedade Branquinha ter apresentado extratos com valores superiores em relação às demais variedades, é importante ressaltar que não se obteve diferença estatística considerável ($p < 0,05$) entre essa cultivar e as variedades Olho de Ovelha, Galo de Campina, Mulatinho e Lavandeira, com exceção da cultivar Rosinha, que diferiu estatisticamente das demais.

Observou-se um aumento gradativo significante ($p < 0,05$) no sequestro do radical ABTS durante a digestão gastrointestinal *in vitro*, a transição do meio ácido para o alcalino ocasiona maior liberação de compostos fenólicos e flavonóides, o que contribui para o acréscimo da atividade antioxidante (SOLLANO-MEDIETA *et al.,* 2021), de acordo com Dutra *et al.* (2017) e Dantas *et al.* (2019) esse acréscimo deve-se à desprotonificação dos grupos hidroxil presentes nos anéis aromáticos.

Além disso, a maior atividade de eliminação do radical ABTS nas amostras de feijão-fava digeridas pode estar associada à acidificação das amostras a pH 1,5 durante o processo de digestão *in vitro*, isso pode contribuir para a estabilização dos $ABTS^{+\cdot}$, o que implica que a acidez do suco gástrico envolvido na digestão pode aumentar a capacidade das amostras de eliminar o radical (WOOTTON-BEARD *et al.* 2011)

Ademais, outro aspecto que influencia a capacidade antioxidante é a interação dos compostos fenólicos com outros compostos liberados durante a digestão, como minerais ou fibra dietética, que afetam a solubilidade e a disponibilidade de fenóis (SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ *et al.*, 2021). Os resultados do presente trabalho indicam que as seis variedades de *P. lunatus* são uma boa fonte de antioxidantes antes e depois da digestão *in vitro*.

Os resultados encontrados no presente estudo foram semelhantes aos obtidos por Salawu *et al.* (2019) ao avaliarem a atividade antioxidante de compostos fenólicos e fragmentos peptídicos obtidos a partir de feijão lima cru e processado, obtiveram

aumento progressivo do poder de redução do radical DPPH e ABTS durante a simulação de digestão *in vitro*.

Luzardo-Ocampo *et al.* (2017) ao avaliarem a bioacessibilidade e atividade de compostos fenólicos livres e oligossacarídeos de chips de milho (*Zea mays* L.) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) durante a digestão gastrointestinal *in vitro* e fermentação colônica simulada, obtiveram potencial de eliminação do radical ABTS entre 0,60 e 1,89 µmol eq. Trolox e relacionaram capacidade antioxidante das amostras ao conteúdo de compostos fenólicos presentes nas matrizes alimentares.

Tabela 6. Atividade de eliminação do radical ABTS da digestão gastrointestinal *in vitro* de compostos fenólicos presentes em extratos de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* extrato de hexano (E1), éter de petróleo (E2), clorofórmio (E3), acetato de etila (E4), etanol (E5), acetona (E6) e água (E7). Var. Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), Galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), Branquinha (V5) e Lavandeira (V6).

Eliminação do radical ABTS sem digestão (mg.Eq AG.ml^{-1})						
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
E1	62,98 ± 7,55Ba^{Ba}	54,81 ± 0,72Ba^{Aa}	79,49 ± 9,61Aa^{Aa}	57,96 ± 2,26Ba^{Aa}	61,73 ± 3,83Ba^{Aa}	57,96 ± 1,42Ba^{Aa}
E2	47,98 ± 1,96Bb^{Ba}	53,95 ± 2,13Ba^{Aa}	53,32 ± 3,55Bc^{Aa}	52,69 ± 1,89Ba^{Aa}	66,36 ± 1,56Aa^{Aa}	56,85 ± 0,23Ba^{Aa}
E3	51,04 ± 3,13Ab^{Ba}	53,00 ± 0,95Aa^{Aa}	50,96 ± 4,47Ac^{Aa}	56,78 ± 4,89Aa^{Aa}	53,87 ± 0,27Ab^{Aa}	57,96 ± 1,29Aa^{Aa}
E4	51,20 ± 4,40Cb^{Ba}	58,66 ± 1,44Ba^{Aa}	68,41 ±13,69Ab^{Aa}	58,51± 2,24Ba^{Aa}	59,21 ± 2,54Ba^{Aa}	61,26 ± 1,44Ba^{Aa}
E5	57,17 ± 3,07Aa^{Ba}	55,13 ± 2,31Aa^{Aa}	53,40 ± 1,91Ac^{Aa}	56,15 ± 1,54Aa^{Aa}	60,08 ± 3,07Aa^{Aa}	60,94 ± 2,58Aa^{Aa}
E6	47,66 ± 2,85Cb^{Ba}	54,26 ± 1,08Ba^{Aa}	43,50 ± 1,29Cd^{Aa}	53,87 ± 0,72Ba^{Aa}	52,53 ± 1,91Bb^{Aa}	60,94 ± 4,24Aa^{Aa}
E7	19,14 ± 8,58Bc^{Ba}	44,28 ± 6,20Ab^{Aa}	43,03 ± 2,47Ad^{Aa}	47,50 ± 5,77Ab^{Aa}	52,61 ± 1,69Ab^{Aa}	48,29 ± 2,96Ab^{Aa}
Eliminação do radical ABTS pós-digestão (mg.Eq AG.ml^{-1})						
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
E1	117,09 ± 11,46Ba^{Ba}	101,90 ± 1,09 Ba^{Aa}	147,77 ± 14,59Aa^{Aa}	107,74 ± 3,43 Ba^{Aa}	114,75 ± 5,81 Ba^{Aa}	107,74 ± 2,15 Ba^{Aa}
E2	89,19 ± 2,97Bb^{Ba}	100,29 ± 3,24 Ba^{Aa}	99,12 ± 5,40Bc^{Aa}	97,96 ± 2,86 Ba^{Aa}	123,37 ± 2,38 Aa^{Aa}	105,70 ± 0,35 Ba^{Aa}
E3	94,89 ± 4,76Ab^{Ba}	98,54 ± 1,44 Aa^{Aa}	94,74 ± 6,79Ac^{Aa}	105,55 ± 7,42 Aa^{Aa}	100,15 ± 0,41 Ab^{Aa}	107,74 ± 1,97 Aa^{Aa}
E4	95,18 ± 6,68Cb^{Ba}	109,06 ± 2,18 Ba^{Aa}	127,17 ± 20,79Ab^{Aa}	108,77 ± 3,41 Ba^{Aa}	110,08 ± 3,87 Ba^{Aa}	113,88 ± 2,18 Ba^{Aa}
E5	106,28 ± 4,66 Aa^{Ba}	102,48 ± 3,51 Aa^{Aa}	99,27 ± 2,91Ac^{Aa}	104,38 ± 2,34 Aa^{Aa}	111,69 ± 4,66 Aa^{Aa}	113,29 ± 3,92 Aa^{Aa}
E6	88,61 ± 4,33Cb^{Ba}	100,88 ± 1,63 Ba^{Aa}	80,86 ± 1,97Cd^{Aa}	100,15 ± 1,09 Ba^{Aa}	97,66 ± 2,91 Bb^{Aa}	113,29 ± 6,44 Aa^{Aa}
E7	35,58 ± 13,03Bc^{Ba}	82,33 ± 9,41 Ab^{Aa}	79,99 ± 3,75 Ad^{Aa}	88,31 ± 8,76 Ab^{Aa}	97,81 ± 2,58 Ab^{Aa}	89,78 ± 4,50 Ab^{Aa}

Os resultados representam a média das triplicatas (em mg equivalentes de ácido gálico.mL^{-1}) e seu respectivos desvios-padrão. As letras maiúsculas nas linhas referem-se à análise da eficiência dos extratos dentro de cada nível de variedade e as letras minúsculas nas colunas referem-se ao potencial das variedades dentro de cada nível de solvente utiliizado na extração antes e após o processo de digestão *in vitro*. As letras maiúsculas e minúsculas em exponencial são referentes à média das variedades dentro de cada nível de tratamento (digerido e não digerido, respectivamente) indepedente dos solventes.

4. CONCLUSÃO

Esta pesquisa relatou pela primeira vez o efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* em compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de seis variedades de feijão-fava (*P. lunatus*). Os solventes polares demonstram maior eficácia na extração de compostos bioativos que os apolares. Cada variedade apresentou um comportamento característico durante o processo de digestão *in vitro* com aumento gradual tanto na quantidade de compostos fenólicos totais, quanto no potencial antioxidante. Embora estes resultados *in vitro* não possam ser extrapolados para condições *in vivo*, estes dados fornecem evidências de que as diferentes variedades de *P. lunatus* estudadas constituem fontes ricas de compostos antioxidantes. Os resultados deste estudo poderiam ajudar a selecionar variedades de feijão-fava com a maior quantidade de compostos antioxidantes com efeitos benéficos à saúde, assim, os compostos fenólicos podem ser empregados na indústria alimentar e cosmética.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI-COSTA, Tânia da Silveira *et al.* Total phenolics, flavonoids, tannins and antioxidant activity of lima beans conserved in a Brazilian Genebank. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 335-341, 2015.

ALBUQUERQUE, Bianca R. *et al*. Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. **Food & Function**, v. 12, n. 1, p. 14-29, 2021.

ALCÁZAR-VALLE, Montserrat et al. Bioactive compounds, antioxidant activity, and antinutritional content of legumes: a comparison between four phaseolus species. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3528, 2020.

BARCHAN, A. *et al.* The effects of solvents polaritiy on the phenolic contents and antioxidant activity of three Mentha species extracts. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 11, p. 399-412, 2014.

BROOKS, Marianne Su-Ling; CELLI, Giovana B. (Ed.). Anthocyanins from natural sources: Exploiting targeted delivery for improved health. **Royal Society of Chemistry**, 2019.

CARTER, Paul. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). **Analytical Biochemistry**, v.**Analytical Biochemistry** 40, n. 2, p. 450-459, 1971.

DANTAS, Aline Macedo *et al*. Bioaccessibility of phenolic compounds in native and exotic frozen pulps explored in Brazil using a digestion model coupled with a simulated intestinal barrier. **Food Chemistry**, v. 274, p. 202-214, 2019.

DUTRA, Rodrigo Luiz Targino *et al*. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 100, p. 650-657, 2017.

GAWLIK-DZIK, Urszula *et al.* Potentially bioaccessible phenolic and antioxidant potential of fresh and stored lentil sprouts - effect of lactobacillus plantarum 299v enrichment. **Molecules**, v. 26, n. 8, p. 2109, 2021.

GONÇALVES, Sandra *et al.* Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the total phenolic contents and antioxidant activity of wild Mediterranean edible plant extracts. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 3, p. 753–762, 2019.

KARÁS, Monika *et al.* Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 2, 2016.

LUZARDO-OCAMPO, R. *et al.* Bioaccessibility and antioxidant activity of free phenolic compounds and oligosaccharides from corn (*Zea mays* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) chips during *in vitro* gastrointestinal digestion and simulated colonic fermentation. **Food Research International**, v. 100, p. 304-311, 2017.

MA, Yilong *et al.* Effect of *in vitro* digestion on phenolics and antioxidant activity of red and yellow colored pea hulls. **Food Chemistry**, v. 337, n. 11, p. 127606, 2021.

MARCHESE, Anna *et al.* Influence of *in vitro* simulated gastroduodenal digestion on the antibacterial activity, metabolic profiling and polyphenols content of green tea (*Camellia sinensis*). **Food Research International**, v. 63, p. 182-191, 2014.

MOREIRA-ARAÚJO, Regilda Saraiva dos Reis *et al*. Bioactive compounds and antioxidant activity three fruit species from the Brazilian Cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v. 41, 2019.

NACZK, Marian; SHAHIDI, Fereidoon. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 41, n. 5, p. 1523-1542, 2006.

NAWAZ, Haq *et al.* Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Pakistan, v. 56, p. 1-9, 2020.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RODRIGO, Ramón; GONZÁLEZ, Jaime; PAOLETTO, Fabio. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. **Hypertension Research**, v. 34, n. 4, p. 431-440, 2011.

RODRIGUEZ MADRERA, Roberto *et al*. Phenolic content and antioxidant activity in seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Foods**, v. 10, n. 4, p. 864, 2021.

RODRÍGUEZ-ROQUE, María Janeth *et al.*María Janeth Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 206–212, 2013.

SAIGA, Ai.; TABANE, Soichi.; NISHIMURA, Toshihide. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3661-3667, 2003.

SALAWU, S. O. Antioxidant potential of phenolic-rich two varieties of Nigerian local rice and their anti-cholinesterase activities after *in vitro* digestion. **Nutrition & Food Science**, v. 46, n. 2, 2016.

SALAWU, Sule O. *et al*. Antioxidant indices and amino acid composition of phenolic containing Lima beans (P*haseolus lunatus*) after simulated human gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Studies**, v. 8, n. 1, 2019.

SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ, Oscar Abel *et al*. *In vitro* gastrointestinal digestion impact on stability, bioaccessibility and antioxidant activity of polyphenols from wild and commercial blackberries (*Rubus* spp.). **Food & Function**, v. 12, n. 16, p. 7358-7378, 2021.

SAURA-CALIXTO, Fulgencio; SERRANO, José.; GOÑI, Isabel. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 492–501, 2007.

SINGLETON, Vernon L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOLLANO-MENDIETA, Xochitl Cruz *et al*. Effect of *in vitro* digestion on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of 12 plum (*Spondias purpurea* L.) ecotypes. **Foods**, v. 10, n. 9, p. 1995, 2021.

TANG, Dan et al. Rapid and simple method for screening of natural antioxidants from Chinese herb Flos Lonicerae Japonicae by DPPH-HPLC-DAD-TOF/MS. **Journal of separation science**, v. 31, n. 20, p. 3519-3526, 2008.

VERHOECKX, Kitty *et al*. **The impact of food bioactives on health: *in vitro* and ex vivo models**. Springer, 1 ed., Zeist, 2015.

WOOTTON-BEARD, Peter C.; MORAN, Aisling; RYAN, Lisa. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 217-224, 2011.

ZHENG, Guiqing. *et al.* Release of phenolic compounds and antioxidant capacity of Chinese hawthorn "*Crataegus pinnatifida*" during *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, p. 40, p. 76-85, 2018.

CAPÍTULO 4

MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE ISOLADOS PROTEICOS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES VARIEDADES DE *Phaseolus lunatus* L. EMPREGANDO CAVITAÇÃO ACÚSTICA

Patente a ser depositada no (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual)

“MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE ISOLADOS PROTEICOS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES VARIEDADES DE *Phaseolus lunatus* L. EMPREGANDO CAVITAÇÃO ACÚSTICA”

REIVINDICAÇÕES

1. “MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE ISOLADOS PROTEICOS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES VARIEDADES DE *P. lunatus* EMPREGANDO CAVITAÇÃO ACÚSTICA” **caracterizado por** um processo de obtenção do isolados proteicos, a partir de farinhas de sementes de variedades de feijão-fava (*P. lunatus*).

2. “MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE ISOLADOS PROTEICOS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES VARIEDADES DE *P. lunatus* EMPREGANDO CAVITAÇÃO ACÚSTICA” de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato** de consistir na obtenção da farinha das variedades de feijão-fava, utilizando as sementes secas em estufas por uma temperatura não superior a 65 ºC e por um tempo de até 24 h, posteriormente, as sementes secas foram moídas em moinho com peneira de 18 mesh (1 mm).

3. “MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE ISOLADOS PROTEICOS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES VARIEDADES DE *P. lunatus* L. EMPREGANDO CAVITAÇÃO ACÚSTICA”, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** processo de obtenção dos isolados proteicos a partir de farinhas de sementes de variedades de feijão-fava (*P. lunatus*), utilizando uma proporção de 1:10 (m/v) em meio básico e incubação com agitação por um período de até 45 min, seguida de sonicação a 40 KHz por um período inferior a 60 min e posterior centrifugação e precipitação.

4. “MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE ISOLADOS PROTEICOS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES VARIEDADES DE *P. lunatus* L. EMPREGANDO CAVITAÇÃO ACÚSTICA”, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado**

pelo processo de obtenção dos isolados proteicos a partir de farinhas de sementes de variedades de feijão-fava (*P. lunatus*) que apresentam elevado potencial antioxidante.

Campo da invenção

[001] Esta invenção se insere no campo da Biotecnologia, mais especificamente, a tecnologia refere-se ao método de obtenção de isolados proteicos obtidos a partir de diferentes variedades de *P. lunatus*, liberados da farinha de *P. lunatus* previamente solubilizada em meio básico e submetida a tratamento físico de cavitação acústica, e posterior, precipitação ácida. A semente de *P. lunatus* tem alto teor proteico fazendo desta planta uma excelente fonte de proteínas para aplicações na indústria de alimentos podendo ser estudadas como potencial substituto aos antioxidantes sintéticos, como ingrediente para melhorar as propriedades dos alimentos e como alimento funcional ou nutracêutico na mitigação de fisiopatologias associadas ao estresse oxidativo.

Antecedentes da invenção

[002] As proteínas de origem animal, dentre as quais, carne, leite, peixe e ovos, são normalmente caras e relativamente difíceis de adquirir, o que levou a um aumento mundial de pesquisas sobre fontes de proteínas vegetais, sobretudo, com o aumento da população vegana e vegetariana. Dessa forma, as leguminosas, em virtude do seu alto teor proteico, tem sido um importante objeto de estudo das pesquisas que objetivam a obtenção de uma fonte proteica alternativa, mais barata e que traz benefícios ao meio ambiente.

[003] As leguminosas, pertencentes ao gênero *Phaseolus* são uma excelente fonte proteica, sobretudo, nos países em desenvolvimento, essas sementes apresentam teor de proteína elevado, cerca de 26%, fazendo com que os isolados apresentem teores acima de 70% o que faz do gênero uma excelente fonte de proteína para aplicações na indústria de alimentos.

[004] *Phaseolus lunatus* é a segunda espécie do gênero *Phaseolus* mais cultivada e consumida no mundo, destacando-se países do continente americano como Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela e Peru. No Brasil, apesar das oscilações na produção, o cultivo e consumo são maiores na região Nordeste e em parte do estado de Minas Gerais, totalizando cerca de 10 mil toneladas/ano.

[005] Estudos realizados avaliando o potencial biológico de isolados proteicos do gênero *Phaseolus* demonstram alto potencial antioxidante e propriedades funcionais

excelentes, dessa forma, proteínas obtidas de espécies pertencentes ao gênero podem ter uso potencial na formulação e desenvolvimento de novos ingredientes de alimentos funcionais.

[006] Os documentos do estado da técnica no âmbito patentário fazem referência a *P. vulgaris* e outras espécies de Phaseolus, além de outras espécies vegetais com potencial para obtenção de isolados proteicos com potencial biológico e de aplicação na indústria de alimentos, no entanto, apresentam diferenças quanto a forma de obtenção, utilização e aplicação da tecnologia descrita na presente invenção.

[007] No documento US4111927A, grãos secos de *P. vulgaris*, *P. aureus* ou *P. lunatus* em estado finamente dividido são misturados em solução aquosa de cloreto de sódio em concentração inferior a 0,6% (m/v) por cerca de 30 min a temperatura ambiente, com posterior centrifugação e/ou centrifugação, acidificação e aquecimento aplicado ao líquido durante a precipitação ácida. Diferentemente, a presente invenção utiliza hidróxido de sódio com concentrações não superiores a 0,06% (m/v) por um período de 45 min e tratamento físico com sonicação ultrassônica por períodos não superiores a 60 min e precipitação empregando preferencialmente ácido clorídrico concentrado.

[008] No documento AU2006328982 *Phaseolus* sp. foram empregadas para extração do conteúdo proteico solução aquosa, caracterizado por um conteúdo de inibidor de amilase. A extração deu-se com tampões aquosos com pH entre 3 e 6,5, e separação posterior do extrato da biomassa. O extrato proteico foi preparado com sucessivas filtrações, centrifugações e precipitação empregando etanol entre 40% e 70% (v/v) e água desmineralizada com etanol 60%.

[009] O documento GB1445544 diferentes sementes de leguminosas e plantas oleaginosas foram empregadas para extração proteica empregando o ácido fosfórico a temperatura ambiente sob agitação e pH entre 1 e 5. O extrato centrifugado e esterilizado e filtrado em gel a um pH entre 1 e 5, o material obtido foi empregado para o desenvolvimento de bebidas fermentadas.

[0010] Diante do apresentado no estado da técnica, não foram encontrados documentos revelando elementos da presente invenção e, portanto, a mesma apresenta novidade.

Descrição da Invenção

[0011] O presente documento patentário descreve o método para obtenção de isolados proteicos obtidos a partir de diferentes variedades de *P. lunatus* submetida ao tratamento físico de cavitação acústica em frequência sonora não superior a 40 kHz.

[0012] Os grãos das variedades Lavandeira, Rosinha, galo de Campina, branquinha, Olho de Ovelha e Mulatinho de feijão-fava (*P. lunatus*) cultivadas no Nordeste brasileiro podendo ser usadas qualquer outra variedade e outras espécies de leguminosas ou oleaginosas. Para preparo da farinha os grãos foram triturados, tamisados e a farinha resultante foi seca em estufa de circulação forçada a uma temperatura não superior a 65 ºC. A farinha foi submetida a extração acido-básica na proporção de 1:10 (m/v) para obtenção dos isolados proteicos.

[0013] A extração das proteínas das variedades de *P. lunatus* empregou-se um planejamento fatorial completo com a finalidade de avaliar a influência de diferentes variáveis concentração de NaOH (entre 0,02% e 0,06%), pH (entre 4,5 e 6,5) e tempo de cavitação acústica (entre 0 e 60 min) em frequência sonora até 40 kHz em função da variável resposta quantidade de proteína extraída. A partir da determinação das melhores condições de extração proteica das diferentes variedades de *P. lunatus* predito através da análise estatística os ensaios com as melhores condições foram utilizados como referência para o processo deste documento.

[0014] As farinhas das variedades Lavandeira, Rosinha, galo de Campina, branquinha, Olho de Ovelha e Mulatinho de feijão-fava (*P. lunatus*) solubilizada em NaOH, na proporção 1:10 (m/v), em concentração não superior a 0,06% sob agitação por tempo não superior a 60 min, posteriormente foram submetidas ao tratamento físico por ação da cavitação acústica por tempo menor que 60 min. Em seguida, o material foi centrifugado por um tempo não superior a 30 min a 12.000 x *g*. Por conseguinte, o pH do sobrenadante de cada ensaio foi ajustado, numa faixa não superior a 5,5 com um ácido forte, preferencialmente HCl, e uma nova centrifugação foi realizada a 12.000 x *g*, então o precipitado foi coletado, congelado, liofilizado e acondicionado a -20 °C.

Exemplo 1: Determinação da solubilidade proteica (SP)

[0015] Para realizar a solubilidade proteica empregou-se a metodologia descrita por Morr *et al.* (1985) com modificações. Uma amostra de 500 mg foi homogeneizada com 2 mL de solução de NaCl 0,1 M. Posteriormente, adicionou-se cerca de 40 mL de tampão fosfato com pH 7,0, a suspensão foi mantida sob agitação orbital a 150 rpm por 45 min, o volume completado em balão volumétrico. A suspensão foi centrifugada a 1.000 x *g* por 30 min e no sobrenadante foi determinada a concentração de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). A porcentagem de proteína solúvel foi calculada de acordo com a Equação (1).

[0016] $SP\% = \frac{[Ax50]}{\left[Mx\frac{C}{100}\right]}x100$ **Eq. (1)**

[0017] Onde PS = teor de proteínas solúveis presentes na amostra [%]; A= concentração proteica do sobrenadante [mg.mL^{-1}]; M = peso da amostra [mg]; C = concentração de proteína na amostra [%].

<u>Exemplo 2: Determinação do índice de absorção de água</u>

[0018] Para determinação do índice de absorção de água empregou-se a metodologia descrita por Wilding *et al.* (1984), dispersões proteicas a 1% (m/v) foram homogeneizadas com 2 mL de solução de NaCl 0,1 M e 38 mL de tampão fosfato pH 7. A dispersão proteica foi submetida à agitação por 15 min e centrifugada a 960 x *g* por 25 min e o líquido sobrenadante foi retirado cuidadosamente, o material remanescente (farinha úmida) foi pesado e a diferença entre o peso da amostra antes e após a absorção de água representou a quantidade de água absorvida. A medida do índice de absorção de água foi calculada de acordo com a Equação 2.

[0019] $IAA = \frac{\text{águaabsorvidapelaamostra}(g)}{massaproteica(g)}\frac{\text{água absorvida pela amostra }(g)}{\text{massa proteica }(g)}$

Eq. (2)

<u>Exemplo 3. Capacidade de retenção de óleo (CRO)</u>

[0020] Para determinação da capacidade de retenção de óleo (CRO) utilizou-se a metodologia descrita por Okenzie e Bello (1988). Foi homogeneizado um grama de proteína com 20 g de óleo vegetal de soja e submeteu-se a agitação por 10 min em agitador magnético, a suspensão foi centrifugada a 2272 x *g* por 15 min. O resultado

foi expresso em grama de óleo retido pela quantidade de proteína total presente na amostra de acordo com a Equação 3.

[0021] $CRO = \frac{óleoabsorvidopelaamostra(g)}{massaproteica(g)} \frac{óleo\ absorvido\ pela\ amostra\ (g)}{massa\ proteica\ (g)}$

Eq. (3)

Exemplo 4: Determinação da capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão

[0022] A capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão foram determinadas segundo a metodologia descrita por Okezie e Bello (1988). Um grama de proteína foi homogeneizado com 34 mL de solução de NaCl 3% (v/v) e agitada mecanicamente, posteriormente, iniciou-se a adição de óleo vegetal através de uma bureta até formar a emulsão. Já a estabilidade da emulsão foi determinada pelo método de aquecimento da emulsão formada em banho maria a 80 °C por 30 min, resfriada em água corrente por 15 min e centrifugada a 240 x *g* por 15 min. A capacidade de emulsão (CE) e a estabilidade da emulsão (EE) foi expressa em porcentagem utilizando as Equações 4 e 5, respectivamente.

[0023] $CE = \frac{volumedacamadaemulsificada}{volumetotaldotubo} x100$ **Eq. (4)**

[0024] $EE = \frac{volume\ da\ camada\ emulsificada\ remanescente}{volume\ total\ da\ camada\ emulsificada\ no\ tubo}\ x\ 100$ **Eq. (5)**

Exemplo 5: Determinação da capacidade de formação e estabilidade da espuma

[0025] A capacidade de formação de espuma foi determinada pelo método descrito por Coffmann e Garcia (1977). Uma suspensão de 2 g de amostra com 100 mL de água destilada foi preparada em um copo béquer de capacidade de 250 mL, agitada com agitador de haste por 5 min a 800 rpm. A dispersão foi transferida para uma proveta graduada de 250 mL. A capacidade de formação de espuma foi expressa como a % de aumento de volume baseando-se no volume inicial e após a formação de espuma. A proveta contendo a espuma foi mantida à temperatura ambiente e, então, mensurada a estabilidade da espuma por meio da redução percentual do volume em intervalos de tempo em 0, 15, 30 e 60 min.

Exemplo 6: Ensaio de simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal

[0026] O ensaio de simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal foi realizado por meio da digestão do líquido hidrolisado com peptídeos de massa molecular menor que 30 kDa com concentração inicial padronizada frente à simulação digestão gástrica e pancreática de acordo a metodologia proposta por Quan *et al.* (2017). A etapa de simulação da digestão gástrica foi realizada a partir da mistura reacional de 20 mL dos isolados proteicos das diferentes variedades (20 $mg.mL^{-1}$) com 3 mL de solução de pepsina (40 $mg.mL^{-1}$) seguido do ajuste do volume para 30 mL pela adição de NaCl a 0,9%. O pH dos ensaios foram ajustados para 2,0 usando solução de HCl (0,1 M) e incubados por 1 h em banho-maria a 37 ºC. Na digestão pancreática, a solução de $NaHCO_3$ (0,09 M) foi usada para alterar o pH dos ensaios para 5,0. Por conseguinte, foram adicionados 5 mL de solução biliar (5$mg.mL^{-1}$) e pancreatina (4$mg.mL^{-1}$). O pH das amostras foi reajustado para 7,5 por meio da adição da solução de NaOH (0,1 M), e incubado por 2 h em banho-maria a 37 ºC. Os controles das amostras foram executados em paralelo foi processada usando o mesmo protocolo de simulação da digestão acima mencionada. Após a digestão, alíquotas de 5 mL da digesta gástrica e digesta de intestinal foram submetidas ao banho fervente por 5 min, resfriadas em banho de gelo e acondicionadas para as análises subsequentes.

Exemplo 7: Caracterização do potencial antioxidante antes e após a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* dos isolados proteicos das diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* L.

[0027] Os ensaios de determinação de eliminação do $ABTS^{+\bullet}$, gerado a partir da oxidação de 2,2'- azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) a 7 mM com persulfato de potássio a 2,45 mM, incubado ao abrigo de luz por 16 horas a 30 ºC antes da utilização, foi baseado na metodologia descrita por Re *et al.* (1999). Usando espectrofotômetro, a solução do $ABTS^{+\bullet}$ foi ajustada para uma absorbância de 0,70 ± 0,02 a 734 nm, por diluição com tampão fosfato-salino, 100 mM, pH 7,4. Para a reação, 50 µL dos isolados proteicos das diferentes variedades foram misturados com 950 µL da solução de radical ABTS. Os ensaios foram incubados a 30 ºC por seis min e lidos a 734 nm em espectrofotômetro. A atividade antioxidante (%) foi calculada em relação à atividade de eliminação do radical, de acordo com a seguinte equação 6.

[0028] $Sequestrodoradical ABTS(\%)\left(\frac{A_{controle}-A_{amostra}}{A_{controle}}\right)*100$ **Eq. (6)**

[0029] Onde $A_{controle}$ representa a absorbância inicial da solução do radical ABTS e $A_{amostra}$ representa a absorbância do ensaio com as amostras de isolados.

[0030] Os ensaios de determinação de eliminação do radical DPPH, foram mensurados de acordo com o método descrito por Li *et al.* (2008), onde 50 µL da amostra proteica foi adicionada à 500 µL de solução de DPPH a 0,16 mM (solubilizada em metanol a 95%). A mistura foi homogeneizada e incubada durante 30 min à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. A absorbância da solução resultante foi lida a 517 nm em espectrofotômetro, em que uma menor absorbância representou uma maior atividade de eliminação do radical $DPPH^{\bullet}$. O efeito de eliminação (%) foi calculado de acordo com a equação 7.

[0031] $Eliminação do radical DPPH(\%) = \left(\frac{A_{controle}-A_{amostra}}{A_{controle}}\right)*100$ **Eq. (7)**

[0032] Onde $A_{controle}$ representa a absorbância inicial da solução do radical DPPH e $A_{amostra}$ representa a absorbância do ensaio com as amostras de hidrolisados.

[0033] Os ensaios de determinação de eliminação do radical superóxido *in vitro* foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Pownall *et al.* (2010). Em placas de 96 poços de fundo plano de poliestireno, 80 µL do isolado proteico foram adicionados a 80 µL de tampão Tris-HCl (50 mM e pH 8,2) contendo 1 mM de EDTA, sob proteção da luz. Imediatamente 40 µL de pirogalol a 1,5 mM dissolvido em HCl a 10 mM foram adicionados aos ensaios. A absorbância dos ensaios foi mensurada no início e ao final da reação durante 4 min em leitora de microplaca a 420 nm. Um controle foi realizado, utilizando tampão no lugar das amostras. A atividade antioxidante foi expressa em porcentagem de eliminação do radical de acordo com a equação 8.

[0034] $Eliminação do radical superóxido(\%) = \left[\frac{(\Delta A_{controle/min})-(\Delta A_{amostra/min})}{\Delta A_{controle/min}}\right]$ **Eq. (8)**

[0035] Onde, $\Delta A_{amostra}$ representa a absorbância do ensaio completo com o isolado proteico contento os peptídeos e $\Delta A_{controle}$ representa a absorbância do ensaio contendo tampão no lugar das amostras.

[0036] Os ensaios de determinação da atividade de eliminação do radical hidroxila foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Pownall, Udenigwe e Aluko (2010). Em placas de 96 poços de fundo plano de poliestireno, 50 µL do isolado proteico contendo os peptídeos foram misturados com 50 µL de 1,10-fenantrolina a 3 mM solubilizado em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,4 e 50 µL de $FeSO_4$ a 3 mM solubilizado em água destilada. Para início da reação, 50 µL de solução aquosa de H_2O_2 a 0,01% (v/v) foram adicionados aos ensaios. Para efeito do cálculo, mais dois ensaios foram realizados: um controle negativo, sem amostra peptídica; e um branco, sem amostra peptídica e sem peróxido de hidrogênio. A mistura reacional foi protegida da luz e incubada a 37 ºC por uma hora. A absorbância dos ensaios foi mensurada a 536 nm em leitora de microplacas e a atividade antioxidante foi expressa em porcentagem de eliminação do radical hidroxila de acordo com a equação 9.

[0037] $Eliminaçãodoradicalhidroxila(\%) = \left(\frac{A_{amostra} - A_{controle}}{A_{amostra} - A_{controle}}\right) * 100$ **Eq. (9)**

[0038] A atividade quelante do íon cobre (Cu^{2+}) do isolado foi determinada com a utilização do reagente violeta de pirocatecol (VP), de acordo com a metodologia proposta por Saiga *et al.* (2003). As misturas reacionais compostas por 500 µL de tampão acetato de sódio (50 mM e pH 6,0), 125 µL de $CuSO_4$ (5 mM) e 12,5 µL da amostra peptídica foram solubilizadas e incubadas ao abrigo da luz a 25 ºC por 30 min. Em seguida, adicionou-se 12,5 µL de violeta de pirocatecol a 4 mM. Após 30 min, a absorbância foi mensurada a 632 nm em espectrofotômetro. Água destilada foi utilizada como controle. O percentual de inibição da formação do complexo VP-Cu^{2+} foi calculado de acordo com a equação 10.

[0039] $AtividadequelantedeCu^{2+(\%)=\left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}}\right)*100}$ **Eq. (10)**

[0040] Onde, $A_{controle}$ representa a absorbância controle, ensaio em que a amostra foi substituída por água destilada, e $A_{amostra}$ representa a absorbância do ensaio com a amostra do hidrolisado

[0041] A atividade quelante do íon ferro (Fe^{2+}) do isolado foi determinada pela inibição da formação do complexo ferrozina-Fe^{3+}, de acordo com a metodologia proposta por Carter (1971). As misturas reacionais compostas por 500 µL de tampão acetato de sódio (100 mM e pH 4,9), 12,5 µL de cloreto de ferro (5 mM) e 125 µL da amostra

peptídica foram solubilizadas e incubadas ao abrigo da luz a 25 ºC por 30 min. Em seguida, adicionou-se 50 µL de ferrozina a 5 mM. Após 30 min, a absorbância foi mensurada a 562 nm em espectrofotômetro, água destilada foi utilizada como controle. O percentual de inibição da formação do complexo ferrozina-Fe^{2+} foi calculado de acordo com a equação (11).

[0042] $$Atividadequelantede Fe^{2+}(\%) = \left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}}\right) * 100$$ **Eq. (11)**

[0043] Onde, $A_{controle}$ representa a absorbância controle (ensaio em que a amostra foi substituída por água destilada) e $A_{amostra}$ representa a absorbância do ensaio com a amostra do hidrolisado.

Exemplos de concretizações da invenção

[0044] Os resultados apresentados após a extração proteica demonstraram que para a variedade Rosinha (V1) a quantidade de proteína extraída manteve-se entre 1,02 e 1,75g, para Olho de Ovelha (V2) entre 0,13 e 1,82g, para galo de Campina (V3) entre 0,35 e 2,12g, para Mulatinho (V4) entre 0,2 e 1,78g, para branquinha (V5) entre 0,02 e 1,64 e para Lavandeira (V6) entre 0,05 e 1,34g, conforme observado na matriz do delineamento fatorial 2^3 (tabela 1).

[0045] **Tabela 1**. Matriz de planejamento fatorial 2^3 para extração proteica das farinhas de diferentes variedades de *P. lunatus*.

	Variáveis decodificadas											
	Níveis			Valores reais			Proteína extraída					
	X1	**X2**	**X3**	**X1**	**X2**	**X3**	V1	V2	V3	V4	V5	V6
1	-1	-1	-1	0,02	4,5	0	1,46	1,38	0,97	1,39	1,64	1,34
2	+1	-1	-1	0,06	4,5	0	1,75	1,69	1,33	1,59	1,28	0,93
3	-1	+1	-1	0,02	6,5	0	1,54	0,76	0,63	0,2	0,02	0,31
4	+1	+1	-1	0,06	6,5	0	1,64	0,18	1,69	0,37	0,37	0,12
5	-1	-1	+1	0,02	4,5	60	1,38	1,74	1,25	1,78	1,31	1,23
6	+1	-1	+1	0,06	4,5	60	1,75	1,82	1,54	1,68	1,29	1,1
7	-1	+1	+1	0,02	6,5	60	1,33	1,36	0,35	0,57	0,22	0,2
8	+1	+1	+1	0,06	6,5	60	1,02	0,13	0,93	0,14	0,09	0,05

9	0	0	0	0,04	5,5	30	1,65	1,02	2,01	1,02	0,72	0,53
10	0	0	0	0,04	5,5	30	1,53	0,77	2,12	0,87	0,47	0,99
11	0	0	0	0,04	5,5	30	1,52	0,88	1,38	0,78	0,86	0,89
12	0	0	0	0,04	5,5	30	1,48	0,97	1,22	1,12	0,71	0,80

[0046] X1: concentração de hidróxido de sódio (m/v); X2: pH inicial da extração; X3: tempo de sonicação: V1: Rosinha, V2: Olho de Ovelha, V3: galo de Campina, V4: Mulatinho, V5: branquinha e V6: Lavandeira

[0047] Os estudos empregando o planejamento 2^3 com 4 repetições no ponto central totalizando 12 ensaios para cada variedade analisando a influência das variáveis concentração de hidróxido de sódio (m/v), pH inicial da extração e tempo de sonicação (min) em função da variável resposta a proteína extraída (g) demonstraram que a quantidade de proteína extraída depende diretamente da variedade bem como das suas combinações (Tabela 2).

[0048] **Tabela 2**. Combinação de variáveis do melhor ensaio para as diferentes variedades de *P. lunatus*.

	[ ] NaOH	pH	Tempo de cavitação acústica (min)
Rosinha	0,06%	4,5	0
Olho de Ovelha	0,06%	4,5	60
Galo de Campina	0,04%	5,5	30
Mulatinho	0,02%	6,5	60
Branquinha	0,02%	4,5	0
Lavandeira	0,02%	4,5	0

[ ] - concentração

[0049] A solubilidade proteica relaciona-se positivamente com o pH, ou seja, acréscimos na faixa de pH acarreta em aumento da solubilidade. Na faixa de pH 4-11 observa-se aumento na solubilidade proteica. Houve diferença significativa entre as diferentes faixas de pH excetuando-se a faixa 7-11 que se manteve estatisticamente iguais ($p < 0,05$), não houve diferença entre as variedades.

[0050] Observou-se diferença significativa na capacidade de absorção de água, como apresentado na Tabela 3, dos isolados proteicos das diferentes variedades de *P. lunatus.* Em relação a capacidade de retenção de óleo observou-se que a variedade

Mulatinho apresentou o maior potencial de absorver lipídeos diferindo significativamente das demais. A capacidade de emulsificação e estabilidade da emulsificação foram maiores nas variedades branquinha e Mulatinho, respectivamente.

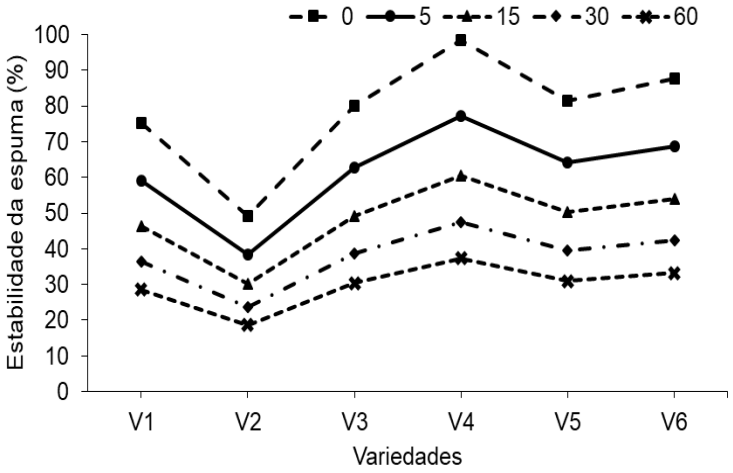
[0051] **Tabela 3**. Capacidade de retenção de água (CRA) e óleo (CRO), capacidade de emulsificação (CE), estabilidade da emulsão (EE) e capacidade de formação de espuma (CFE) dos concentrados proteicos de *P. lunatus* variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), branquinha (V5) e Lavandeira (V6).

	CRA ($g.g^{-1}$)	CRO ($g.g^{-1}$)	CE (%)	EE (%)	CFE (%)
V1	$1,84±0,02^{d}$	$1,13±0,07^{c}$	$62,79±2,20^{c}$	$31,87±1,18^{e}$	$75,24±0,63^{e}$
V2	$1,68±0,03^{e}$	$1,34±0,01^{b}$	$60,47±2,49^{c}$	$53,99±2,22^{c}$	$49,05±0,41^{f}$
V3	$1,94±0,01^{c}$	$1,33±0,02^{b}$	$59,40±0,90^{d}$	$45,68±0,69^{d}$	$79,96±0,67^{d}$
V4	$2,05±0,02^{b}$	$1,37±0,02^{a}$	$75,00±0,48^{b}$	$70,09±0,44^{a}$	$98,35±0,83^{a}$
V5	$1,95±0,02^{c}$	$1,11±0,03^{c}$	$81,89±1,23^{a}$	$58,49±0,87^{b}$	$81,56±0,69^{c}$
V6	$2,66±0,52^{a}$	$1,19±0,05^{c}$	$64,68±1,02^{c}$	$57,49±0,90^{b}$	$87,53±0,74^{b}$

[0052] Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as variedades ($p < 0,05$).

[0053] A capacidade de formação de espuma, tabela 3, manteve-se entre 49,05% e 98,35% diferindo significativamente entre as variedades ($p < 0,05$). Na figura 2 observou-se uma diminuição significativa na formação de espuma, mantendo-se entre 20% e 90%, ao longo do tempo com valores maiores observados para a variedade Mulatinho, diferindo estatisticamente entre as demais variedades.

[0054] **Figura 1**. Estabilidade da espuma dos concentrados proteicos de *P. lunatus* variedades Rosinha (V1), Olho de Ovelha (V2), galo de Campina (V3), Mulatinho (V4), branquinha (V5) e Lavandeira (V6).



[0055] As atividades antioxidantes avaliadas mantiveram-se após a simulação da digestão *in vitro*, incluindo melhorias nos percentuais de eliminação (tabela 4) de todos os radicais oxidativos testados, ou seja, tanto as enzimas digestivas estomacais quanto as intestinais não promovem a destruição das sequencias peptídicas capazes de doar elétrons ou prótons fazendo com que ocorra a manutenção da capacidade antioxidante.

[0056] **Tabela 4.** Potencial de sequestro dos radicais ABTS, DPPH, superóxido, hidroxila, quelante de cobre e quelante de ferro das variedades galo de Campina (V3) e branquinha (V5).

		Potencial antioxidante (%)					
		ABTS	DPPH	SUPEROXIDO	HIDROXILA	Quelante Cu^{2+}	Quelante Fe^{2+}
V3	Gástrica	63,79± 2,01	89,56± 1,27	79,71± 0,8	70,94± 1,58	30,31± 1,00	42,70± 0,63
	Intestinal	84,68± 0,71	52,39± 0,45	46,63± 0,28	41,50± 0,56	17,43± 0,35	16,65± 0,22
	Controle	64,85± 1,1	42,86± 0,70	38,15± 0,44	33,95± 0,86	19,93± 0,55	28,50± 0,34
V5	Gástrica	97,39± 0,23	35,50± 0,14	31,60± 0,09	28,12± 0,18	46,59± 0,11	28,50± 0,07
	Intestinal	99,55± 1,79	99,33± 1,13	88,41± 0,71	78,68± 1,41	58,78± 0,89	31,17± 0,56
	Controle	85,24± 0,63	25,77± 0,40	22,94± 0,25	20,42± 0,49	42,90± 0,31	13,08± 0,19

[0057] Diante desses resultados é possível inferir que os isolados proteicos obtidos a partir da farinha de diferentes variedades de *P. lunatus* apresentam um grande potencial de aplicação em estudos direcionados para a conservação de alimentos e/ou como produto nutracêutico e alimento funcional (ingrediente) destinado a mitigação

de processos oxidativos celulares, especialmente por manter as atividades biológicas após ação das enzimas digestivas.

Bibliografia

[0058] Adler-Niessen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 1979. Doi: 10.1021/jf60226a042.

[0059] Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicro-gram level with a new reagent (ferrozine). **Analytical Biochemistry**. 1971. Doi: 10.1016/0003-2697(71)90405-2.

[0060] Li Y, Jiang B, Zhang T, Um W, Liu J. Antioxidant and free radical scavening activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). **Food Chemistry**. 2008. Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.067.

[0061] Morr, C. V. *et al.* A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, 1985. Doi: 10.1111/j.1365-2621.1985.tb10572.x.

[0062] Okezie, B. Onuma; BELLO, A. B. Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 2, p. 450-454, 1988. Doi:10.1111/j.1365-2621.1988.tb07728.x.

[0063] Pownall T. L., Udenigwe C C, Aluko R E. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. **Journal of Agricultural and Food Research International**. 2010. Doi:10.1021/jf904456r.

[0064] Quan W, Tao Y, Lu M, Yuan B, Chen J. Stability of the phenolic compounds and antioxidant capacity of five fruit (apple, orange, grape, pomelo and kiwi) juices during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. **Food Science Commons**. 2017. Doi:10.1111/ijfs.13682.

[0065] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans E C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**. 1999. Doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

[0066] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrilar proteis by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2003. Doi: 10.1021/jf021156g.

[0067] Wilding, Peter; Lillford, Peter J.; Regenstein, Joe M. Functional properties of proteins in foods. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 182-189, 1984. Doi:10.1002/jctb.280340307.

CAPÍTULO 5

DESENVOLVIMENTO DE MAIONESE COM SUBSTITUIÇÃO PARCIAL E TOTAL DA GEMA DE OVO POR FARINHA DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)

Patente a ser depositada no *INPI (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual)*

REIVINDICAÇÕES

1. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MAIONESE COM SUBSTITUIÇÃO PARCIAL E TOTAL DE GEMA DE OVO POR FARINHA DE FEIJÃO-FAVA (*P. lunatus*)” **caracterizado por** conter os seguintes ingredientes: 60% de óleo vegetal, 19,8% de água, 7,6% vinagre, 1,5% de açúcar, 1,1% de sal, gema de ovo pasteurizada inferior a 7,5% e farinha de feijão-fava inferior a 10%.

2. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MAIONESE COM SUBSTITUIÇÃO PARCIAL E TOTAL DE GEMA DE OVO POR FARINHA DE FEIJÃO-FAVA (*P. lunatus*)”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** conter farinha de feijão-fava em substituição parcial e total a gema de ovo.

3. ““PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MAIONESE COM SUBSTITUIÇÃO PARCIAL E TOTAL DE GEMA DE OVO POR FARINHA DE FEIJÃO-FAVA (*P. lunatus*)” de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** processo de obtenção de maionese com substituição total de gema de ovo por farinha de feijão-fava tratar-se de um produto vegano.

Campo da invenção

[001] A presente invenção se insere no campo da Ciencia e Tecnologia de Alimentos e refere-se ao desenvolvimento de maionese com aproveitamento tecnológico de farinha de diferentes variedades de *P. lunatus* com substituição parcial e total de gema de ovo. Alem disso, a maionese obtida empregando esse processo não utiliza aditivos quimicos, corantes, aromatizantes e essencias, sendo empregados apenas ingredientes ditos naturais. Ressalta-se que a produção é relativamente simples e apresenta noanoa reprodutividade, ademais, a maionese apresenta bom potencial antioxidante o que indica boa vida de prateleira. Dessa forma, trata-se de uma alterativa em potencial para a industria alimenticia, sobretudo por ser um produto vegano.

Antecedentes da invenção

[002] A demanda por fontes vegetais promissoras de ingredientes funcionais para melhorar a qualidade nutricional dos alimentos e diminuir custos de produção tem aumentado, dentre essas fontes, as leguminosas tem destacado-se por ser uma excelente fonte de proteinas e outros nutrientes, tais como carboidratos, lipideos, minerais e vitaminas.

[003] Dentre as leguminosas, o Feijão-fava (*P. lunatus* L.), que é uma das cinco espécies domesticadas do gênero *Phaseolus*, e a segunda espécie mais consumida do globo, apresenta uma serie de adaptações ecológicas que favorecem a sua distribuição desde o mexico até a argentina. Essas adaptações tornam essa cultura promissora, sobretudo, para melhorar a segurança alimentar em cenários de escassez alimentícia em deconrencia das mudanças climáticas, não apenas na américa latina como em outros lugares do mundo.

[001] Além disso, essa espécie apresenta elevado teor proteico quando comparada a outras espécies, tais como o *Phaseolus vulgaris* L, ademais, suas proteínas quando submetidas a precipitação isoelétrica produzem hidrolisados com mais de 70% de proteína, tornando a espécie uma fonte proteica promissora para a indústria de alimentos. Tanto a presença de proteínas como a presença de outros compostos, tais como compostos fenólicos e lipídeos, o feijão-fava apresentaapresenta potencial biológico frente ao sequetro de radicais livres e inibição bacteriana, além de

propriedades funcionais, tais como, capacidade de formação de espuma e emulsificação, que potencializam como ingredientes funcionais em sistemas ou matrizes alimentares.

[002] No corrente estado da técnica, é possível observar que diversos produtos e processos industriais patenteados apresentam características que se assemelham a invenção em questão, no entanto, não possuem características idênticas ao proposto nesse documento.

[003] A seguir, estão listados patentes e alguns trabalhos que apresentam produtos similares ao proposto nesse documento, bem como a principal diferença entre eles.

[004] A patente BR 102012028700-5 A2 refere-se ao processo de preparação de maionese vegetal que utiliza abacate, água, limão, azeite de oliva sal e alho. Tal invenção difere da proposta por esse documento por utilizar farinha de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* L. em substituição parcial e total da gema de ovo, o que resulta em um produto final com características nutricionais e sensoriais bem diferentes daquelas do documento citado.

[005] A patente BR 102015025258-7 A2 faz alusão a criação de uma maionese caseira cuja base é contituida por mostarda e pimenta, além disso, à inserção de ovo, sal, suco de limão, mostarda, salsa, pimenta, alho e óleo de soja que foram misturados até completa homogeneização. Diferentemente deste documento, não há menção ao uso de farinhas produzidas a partir de grãos de *Phaseolus lunatus* L.

[006] A patente BR 102018015890-2 A2 refere-se ao processo para elaboração de maionese à base de óleo de abacate que dispensa a utilização de aditivos químicos, tais como corantes, aromatizantes ou essências, sendo utilizados apenas ingredientes naturais. Diferente do presente documento, nessa invenção não utilizado a farinha de *Phaseolus lunatus* e o principal componente lipídico é o óleo de abacate e não o óleo de soja.

[007] No documento BR 102019017774-8 A2 formulação de maionese compreendendo lactossoro A presente invenção refere-se à fabricação de maionese (particularmente caseira) com a utilização do co-produto lactossoro (soro de queijo) e com redução do teor de óleo de soja utilizado, além desses ingredientes empregou-se gema de ovo desidratada, sal, açúcar, alho, ácido cítrico, goma xantana e goma guar. Este documento difere da presente invenção por usar goma xantana e goma

guar como estabilizantes da emulsão, ao utilizar a farinha de *Phaseolus lunatus* L. diminui-se a necessidade da sua utilização.

Descrição da Invenção

[008] A fim de suprir as necessidades de um publico cada vez mais exigente, desenvolveu-se a maionese com substituição parcial e total da gema de ovo, dessa forma quando ocorre a substituição total o produto será caracterizado como vegano.

[009] Primeiramente, os grãos das variedades Lavandeira, Rosinha, Galo de Campina, Branquinha, Olho de Ovelha e Mulatinho de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) obtidas comercialmente no agreste pernambucano foram farinha os grãos foram triturados, tamisados em peneira com mesh não superior a 18 mesh e a farinha resultante foi seca em estufa de circulação forçada com temperarura não superior a 60 ºC.

[0010] Para a produção da maionese empregou-se óleo de soja, água, gema de ovo, vinagre, sal e as farinhas de feijão-fava, conforme a tabela 1, cuja massa está relacionada a produção de 100 g de maionese.

[0011] Tabela 1. Formulações das maioneses com substituição parcial da gema de ovo por farinha de feijão-fava (FFF) em percentual.

Ingrediente	F1	F2	F3	F4
Óleo (%)	60	60	60	60
Água (%)	2,5	5	7,5	10
Gema de ovo (%)	7,5	5	2,5	0
Vinagre (%)	1,5	1,5	1,5	1,5
Sal (%)	18,5	18,5	18,5	18,5
Farinha de feijão-fava (%)	7,5	5	2,5	10%
TOTAL (%)	100	100	100	100

[0012] O vinagre foi utilizado com a função de acificação da maionese que impede a proliferação microbiana, além disso, a lesgilação nacional diz que as maioneses devem ser acidificadas

[0013] Para produção da maionese realizou-se uma pré-mistura da farinha, água, gema de ovo, vinagre e sal em aparelho liquidificador aumentando a velocidade aos poucos até completa homogeneização.

[0014] Após a homogeneização a velocidade foi diminuída para a mínima e o óleo de soja foi adicionado aos poucos, decorrida a adição, aumentou-se a velocidade do liquidificador até que a mistura ficasse totalmente homogênea.

[0015] Em seguida, o produto deve ser diretamente embalado e levado á refigeração entre 4 e 8 ºC.

[0016] Em relação a estabilidade de emulsão a variedade 1 formulação 1 no dia zero apresentou 82,34% e no dia trinta 76,17%; variedade 1 formulação 2 no dia zero apresentou 85,78% e no dia trinta 79,34%; a variedade 1 formulação 3 apresentou no dia zero 89,35% e no dia trinta 82,65%; a variedade 1 formulação 4 no dia zero apresentou 93,07% e no dia trinta 86,09%.

[0017] Variedade 2 formulação 1 apresentou 85,49% no dia zero e no dia trinta apresentou 79,08%; variedade 2 formulação 2 apresentou 89,05% no dia zero e 82,37% no dia trinta; variedade 2 formulação 3 apresentou no dia zero 92,76% no dia trinta 85,81%; variedade 2 formulação 4 apresentou 96,63% no dia zero e no dia trinta 89,38%.

[0018] Variedade 3 formulação 1 apresentou 77,52% no dia zero e 71,70% no dia trinta; variedade 3 formulação 2 apresentou 80,75% no dia zero e no dia trinta 74,69%; variedade 3 formulação 3 apresentou no dia zero 84,11% e no dia trinta 77,80%; variedade 3 formulação 4 apresentou 87,62% no dia zero e no dia trinta 81,05%.

[0019] Variedade 4 formulação 1 apresentou 86,30% no dia zero e no dia trinta 79,82%; variedade 4 formulação 2 apresentou 89,89% no dia zero e no dia trinta 83,15%; variedade 4 formulação 3 apresentou 93,64% no dia zero e no dia trinta 86,61%; variedade 4 formulação 4 no dia zero 97,54% e no dia trinta 90,22%.

[0020] Variedade 5 formulação 1 no dia zero apresentou 83,49% e no dia trinta 77,23%; variedade 5 formulação 2 no dia zero apresentou 86,97% no dia trinta 80,45%; variedade 5 formulação 3 apresentou no dia zero 90,60% e no dia trinta apresentou 83,80%; variedade 5 formulação 4 apresentou no dia zero 94,37% e no dia trinta 87,29%.

[0021] Variedade 6 formulação 1 apresentou no dia zero 72,43% e no dia trinta 66,99%; variedade 6 formulação 2 apresentou no dia zero 75,44% e no dia trinta

69,78%; variedade 6 formulação 3 apresentou 78,59% no dia zero e no dia trinta 72,69%; variedade 6 formulação 4 apresentou 81,86% no dia zero e no dia trinta 75,72%. Portanto, a interação variedade x tempo e a interação tratamento x tempo não obteve interação significativa a 5%. Isto significa que a maionese permanece estável ao longo do tempo independente do tratamento e da variedade.

[0022] Em relação ao pH no dia zero observou-se variação entre 3,82 à 4,43; no dia sete variou de 3,74 à 4,34; dia quartose variou de 3,71 à 4,30; dia vinte e um variou de 3,63 à 4,21; dia trinta variou de 3,56 à 4,13. Isto significa que a interação tratamento x tempo e a interação variedade *versus* tempo não obteve interação significativa a 5%. Dessa forma, afirma-se que o pH da maionese ao longo do tempo apresenta variação independente do tratamento e da variedade.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MAIONESE COM SUBSTITUIÇÃO PARCIAL E TOTAL DA GEMA DE OVO POR FARINHA DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)

Trata-se do processo de desenvolvimento de maionese com substituição parcial e total da gema de ovo por farinha de feijão-fava que apresenta boa estabilidade e bom eixo mercadológico por se caracterizar como produto vegano. O ingrediente principal é a farinha de feijão-fava que apresenta diversas características funcionais e biológicas, além disso, em virtude das características das farinhas de *P. lunatus* a maionese produzida dispensa o uso de aditivos químicos. Alem disso, ressalta-se que para obtenção do molho tipo maionese descrito neste documento é um processo simples e facilmente reproduzível. Dessa forma, a presente invenção é uma alternativa potencial para a indústria de alimentos, sobretudo para o publico vegano.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação atual mostra que as variedades de *Phaseolus lunatus* apresentam características nutricionais e funcionais que podem ser aproveitados pela indústria, principalmente, formular os novos produtos com melhorias especiais para a saúde. A espectroscopia de infravermelho de transferência de Fourier mostrou a presença de grupos funcionais idênticos (C-H, C=C, OH, amida Ie amida II), com diferença apenas de intensidade de absorção o que demostra que independente da variedade utilizada o perfil de carboidratos, proteínas e gorduras será similar. Portanto, os resultados do presente estudo mostraram que farinhas das variedades de Phaseolus lunatus podem ser usadas na formulação de produtos alimentícios com alto valor nutricional e tecnológicas funcionais.

O presente estudo relata a influência da digestão gastrointestinal in vitro de isolados proteicos de quatro variedades, Mulatinho, Olho de Ovelha, Rosinha e Lavandeira, de *P. lunatus* frente às atividades antioxidantes, anti-desnaturação proteica, inibição da peroxidação lipídica e sobrevivência das células de S cerevisiae. Enquanto, a variedade Olho de Ovelha destacou-se na atividade anti-inflamatória e do poder redutor férrico. A sobrevivência das células de levedura foi maior frente a variedade Olho de Ovelha. A inibição da peroxidação lipídica foi maior frente aos isolados de *P. lunatus* var Mulatinho, Lavandeira e Rosinha. Os resultados obtidos no presente estudo apontam que os concentrados proteicos var Mulatinho, Olho de Ovelha, Rosinha e Lavandeira são fontes promissoras de ingredientes ou suplementos bioativos e/ou funcionais que podem agir como antioxidante potencialmente disponíveis e acessíveis ao mercado. Além disso, o componente proteico presente nessas variedades pode ser empregado no desenvolvimento de novos produtos pela indústria alimentícia, tais como, hidrolisados proteicos, nutracêuticos, nanoencapsulados para indústria cosmética ou como aditivo para aumentar tempo de vida em prateleira.

Esta pesquisa relatou pela primeira vez o efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* em compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de seis variedades de feijão-fava (*P. lunatus*). Os solventes polares demonstram maior eficácia na extração de compostos bioativos que os não-polares. Cada variedade apresentou um comportamento característico durante o processo de digestão in vitro com aumento

gradual tanto na quantidade de compostos fenólicos totais, quanto no potencial antioxidante. Embora estes resultados *in vitro* não possam ser extrapolados para condições no organismo vivo, estes dados fornecem evidências de que as diferentes variedades de *P. lunatus* estudados constituem fontes ricas de compostos antioxidantes. Os resultados deste estudo poderiam ajudar a selecionar variedades de feijão-fava com a maior quantidade de compostos antioxidantes com efeitos benéficos à saúde, ademais, os compostos fenólicos podem ser empregados na indústria alimentar e cosmética.