

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

**Avaliação das propriedades tecnológicas de ingredientes proteicos de diferentes
leguminosas para o mercado *plant-based***

LUCAS DE PAIVA GOUVÊA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE INGREDIENTES
PROTEICOS DE DIFERENTES LEGUMINOSAS PARA O MERCADO *PLANT-
BASED***

Elaborado por
LUCAS DE PAIVA GOUVÊA

Sob a orientação da Professora
Dr^a. Caroline Mellinger Silva

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de concentração em Ciência de Alimentos.

SEROPÉDICA

Julho, 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G719a Gouvêa, Lucas de Paiva , 1995-
Avaliação das propriedades tecnológicas de
ingredientes proteicos de diferentes leguminosas para
o mercado plant-based / Lucas de Paiva Gouvêa. -
Nova Iguaçu, 2022.
91 f.: il.

Orientadora: CAROLINE GRASSI MELLINGER.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em ciência
e tecnologia de alimentos, 2022.

1. Ciência de alimentos. 2. Funcionalidades de
proteínas. 3. Plant-based. I. MELLINGER, CAROLINE
GRASSI, 1976-, orient. II Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Programa de pós-graduação em ciência
e tecnologia de alimentos III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



TERMO Nº 855/2022 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.045721/2022-95

Seropédica-RJ, 27 de julho de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LUCAS DE PAIVA GOUVÊA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/07/2022

CAROLINE MELLINGER DA SILVA (Dra) Embrapa (orientadora)
MARIA IVONE MARTINS JACINTHO BARBOSA (Dra.) UFRRJ
LUÍSA OZORIO LOPES DA ROSA (Dra)

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 27/07/2022 10:33)
MARIA IVONE MARTINS JACINTHO BARBOSA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DTA (12.28.01.00.00.00.46)
Matrícula: 1524368

(Assinado digitalmente em 27/07/2022 12:00)
LUÍSA OZORIO LOPES DA ROSA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 131.714.717-01

(Assinado digitalmente em 17/08/2022 11:02)
CAROLINE MELLINGER SILVA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 026.909.329-03

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número:

855, ano: 2022, tipo: TERMO, data de emissão: 27/07/2022 e o código de verificação: 10e0c75698

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cátia e Alísio, que sempre me incentivaram e apoiaram em todas as escolhas.

Agradeço pelo amor e carinho incondicional de vocês.

Ao Estevão e ao Alex que sempre estiveram ao meu lado me dando suporte.

À minha orientadora Dra. Caroline Mellinger e a co-orientadora Melicia Galdeano, que sempre foram muito solícitas e exemplos de profissionalismo e dedicação. Agradeço por terem me acompanhado nessa jornada, por terem me orientado e por todos os momentos de ensinamento.

À Janice, Tatiana e Rodrigo, pelo companheirismo, pela força e a ajuda que vocês me deram no Laboratório de Bioquímica, contribuindo fortemente para a realização dessa tese.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela oportunidade de realização do Curso de Pós-Graduação.

À Embrapa Agroindústria de Alimentos pela oportunidade de realização do projeto em suas instalações.

À minha psicóloga Juliane, por todo o auxílio durante esse período. Foi um importante ponto de equilíbrio.

À todas as pessoas que eu convivi na RURAL que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento pessoal e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Concluir esse trabalho durante a pandemia foi um processo difícil. Inúmeros desafios que exigiram muita resiliência e determinação de todos os envolvidos para concluí-lo. Por fim, queria agradecer as pessoas próximas de mim, que sempre me ajudaram e apoiaram mas que infelizmente faleceram durante esse período de pandemia. Amo todos vocês e nunca vou esquecê-los.

RESUMO GERAL

O mercado mundial observa um crescente aumento pela demanda de produtos vegetarianos e veganos, ao mesmo tempo em que observa um aumento da população que deseja reduzir o consumo de produtos de origem animal sem, contudo, excluí-los da dieta. Esse novo consumidor, denominado de flexitariano, busca a preservação da sensorialidade dos produtos de origem animal, em produtos feitos de plantas, e atualmente representa, aproximadamente 50% dos consumidores brasileiros. Tendo em vista a crescente demanda por ingredientes e produtos proteicos de origem vegetal, é importante conhecer suas propriedades tecnológicas, uma vez que o processo de obtenção desses ingredientes pode modificar as estruturas das proteínas, afetando suas propriedades. O objetivo deste estudo é avaliar as propriedades tecnológicas de ingredientes proteicos provenientes de diferentes leguminosas (soja, ervilha, feijão carioca e feijão fava) para o mercado *plant-based*. Foram avaliadas a composição centesimal, as propriedades tecnológicas e as características morfológicas dos ingredientes, na forma de farinhas, concentrados e isolados proteicos. O isolado proteico de soja apresentou maior capacidade de retenção de água (4,52 g/g de ingrediente), enquanto o concentrado proteico de feijão fava maior capacidade de retenção de óleo (2,84 g/g de ingrediente), além da menor concentração necessária para formação de gel (12%). As farinhas de feijão carioca e de feijão fava se destacaram na capacidade de formação de espuma (aproximadamente 111% e 93%, respectivamente). O concentrado proteico de feijão carioca obteve atividade emulsificante de 18,87 m²/g, igualando-se aos isolados comerciais, além de excelente estabilidade da espuma (aproximadamente 95% após 60 min). O concentrado proteico de soja e os isolados proteicos de soja e ervilha apresentaram baixa solubilidade em água comparados aos demais ingredientes. Todos os ingredientes estudados, apesar de terem apresentado algumas diferenças quanto às propriedades estudadas, se mostraram tecnologicamente viáveis de serem incorporados em produtos *plant-based*, possibilitando a ampliação da oferta de matérias-primas para a produção dos mesmos. Este estudo traz resultados que podem ser utilizados para otimizar a aplicação desses ingredientes pelas indústrias de alimentos no Brasil.

ABSTRACT

The world market observes a major increase in the demand for vegetarian and vegan products while observing an increase in the population that wants to reduce the consumption of products of animal origin, however, without excluding them from the diet. This new consumer is called flexitarian and they seek to preserve the sensoriality of products from animal origin, in products made from plants. They currently represent approximately 50% of Brazilian consumers. In view of the growing demand for ingredients and protein products of plant origin, it is important to know their technological properties, since the process of obtaining these ingredients can modify the structures of proteins, affecting their properties. The objective of this study is to evaluate the technological properties of protein ingredients from different legumes (soybeans, peas, carioca beans, and fava beans) for the plant-based market. The proximate composition, technological properties, and morphological characteristics of the ingredients were evaluated, in the form of flours, concentrates and protein isolates. The soy protein isolate presented the highest water holding capacity (4,52 g/g of ingredient), while the fava bean protein concentrate showed the highest oil holding capacity (2,84 g/g of ingredient) and the lowest concentration required for gel formation (12%). The carioca bean and fava bean flours stood out in terms of foaming capacity (approximately 111% and 93%, respectively). The carioca bean protein concentrate presented an emulsifying activity of 18.87 m²/g, similar to the commercial isolates, in addition to the excellent foam stability (approximately 95% after 60 min). The soy protein concentrate and the soy and pea protein isolates showed low solubility compared to the other ingredients. All the ingredients studied, despite having presented some differences in terms of the properties, proved to be technologically viable to be incorporated into plant-based products, expanding the supply of different raw materials for their production. This study rendered results that can be used to optimize the application of these ingredients by the food industries in Brazil.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estratégias e beneficiamento de grãos para o desenvolvimento de diferentes ingredientes e produtos alimentícios.....	07
Figura 2. Exemplificação de uma curva de solubilidade.....	13
Figura 3. Exemplo de representação gráfica das análises de capacidade de retenção de água (WHC) e de óleo (OHC)	14
Figura 4. Processo simplificado da emulsificação.....	15
Figura 5. Etapas da análise de capacidade emulsificante.....	16
Figura 6. Modelo de representação gráfica de capacidade emulsificante (A) e estabilidade de emulsão (B).....	16
Figura 7. Exemplificação da análise de formação de espuma.....	18
Figura 8. Modelo de gráfico para representação da estabilidade de espuma de ingredientes proteicos.....	18
Figura 9. Teste de formação de gel.....	19
Figura 10. Exemplificação teórica da curva do DSC.....	21
Figura 11. Micrografias de farinhas e isolados proteicos.....	24

CAPÍTULO II – EVALUATION OF TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF PROTEIN INGREDIENTS FROM DIFFERENT LEGUMES FOR THE PLANT-BASED MARKET

Figure 1. Solubility curve of the protein from the ingredients.....	41
Figure 2. SEM micrographs of the ingredients. (A) SPI; (B) SPC; (C) PPI; (D) PPC; (E) CBPC; (F) CBF; (G) FBBC; (H) FBF. Arrows indicate typical spray-dry particles. SG – starch granulate; CM-cellular material.....	44
Figure 3. Water holding capacity and oil holding capacity of the protein ingredients. Different letters mean significant difference between samples ($p < 0.05$).....	47
Figure 4. (A) Emulsion activity index and (B) Emulsion stability of the protein ingredients. Different letters mean significant difference between samples ($p < 0.05$).....	48
Figure 5. (A) Foaming Capacity and (B) Foaming stability of the protein ingredients. Different letters mean significant difference between samples ($p < 0.05$).....	49

APÊNDICE A

Figura 1. Etapas da análise de capacidade emulsificante. (A) posição do dispersor para fazer a emulsão, (B) solução emulsionada.....	70
Figura 2. Modelo de representação gráfica de capacidade emulsificante (A) e estabilidade de emulsão (B).....	70
Figura 3. Formação de espuma.....	72
Figura 4. Modelo de gráfico para representação da estabilidade de espuma de ingredientes proteicos.....	72

Figura 5. Tubos com amostra proteica solubilizada em diferentes valores de pH (da esquerda para a direita, pHs 3, 4, 5 e 6).....	74
Figura 6. Modelo de gráfico para representação da solubilidade de ingredientes proteicos.....	74
Figura 7. Análise de absorção de água (ou de óleo). (A) Microtubos, (B) Retirada de sobrenadante residual do microtubo em papel absorvente. Foto: (A) Lucas Paiva, (B) Foto: Sidney Pacheco.....	76
Figura 8. Exemplo de representação gráfica das análises de absorção de água (WHC) e de óleo (OHC).....	77
Figura 9. Teste de formação de gel com tubos em ordem decrescente de concentração.....	78

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPITULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Maiores produtores mundiais de leguminosas e produção entre 2019 e 2020.....	06
Tabela 2. Composição química das leguminosas.....	08
Tabela 3. Ingestão mínima de aminoácidos essenciais padronizada pela WHO/FAO/UNU Expert Consultation (2007) (mg/g de proteína requerida).....	09
Tabela 4. Propriedades funcionais e mecanismos simplificados para aplicações em alimentos.....	11
Quadro 1. Modelo usado na determinação de concentração mínima de gelificação ou LGC (Least Gelling Concentration) de um ingrediente proteico.....	20

CAPÍTULO II – EVALUATION OF TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF PROTEIN INGREDIENTS FROM DIFFERENT LEGUMES FOR THE PLANT-BASED MARKET

Table 1. Proximate composition of the ingredients.....	39
Table 2. Particle size, apparent density and thermal properties of protein ingredients.....	42
Table 3. Least gelling concentration for the protein ingredients.....	51

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

Quadro 1. Comparação dos resultados das propriedades tecnológicas dos ingredientes com relação ao concentrado proteico de soja.....	58
--	----

APÊNDICE A

Quadro 1. Modelo usado na determinação de concentração mínima de gelificação ou LGC (Least Gelling Concentration) de um ingrediente proteico.....	79
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	3
2.1 CAPÍTULO I	3
2.2 CAPÍTULO II	3
APÊNDICE A	3
CAPÍTULO I	
REVISÃO DA LITERATURA	4
1. REVISÃO DA LITERATURA	5
1.1 Leguminosas como fontes alternativas de proteínas	5
1.2 Proteínas de leguminosas	8
1.3 Propriedades tecnológicas e físicas de proteínas	9
1.3.1 Solubilidade	11
1.3.2 Capacidade de retenção de água e óleo	13
1.3.3 Emulsificação	15
1.3.4 Formação de espuma	17
1.3.5 Geleificação	18
1.3.6 Característica térmica, DSC	20
1.3.7 Característica morfológica, MEV	22
1.3.8 Tamanho de partícula	24
2. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	25
 CAPÍTULO 2	
 PHYSICAL AND TECHNO-FUNCTIONAL PROPERTIES OF A COMMON BEAN PROTEIN CONCENTRATE COMPARED TO COMMERCIAL LEGUME INGREDIENTS FOR THE PLANT BASED MARKET	32
 ABSTRACT	33

1. INTRODUCTION.....	34
2. MATERIAL AND METHODS.....	35
2.1 MATERIAL.....	35
2.2 METHODS.....	35
2.2.1 Centesimal composition.....	35
2.2.2 Solubility.....	36
2.2.3 Particle size and apparent density.....	36
2.2.4 Morphology.....	36
2.2.5 Thermal properties.....	37
2.2.6 Technological properties.....	37
2.2.6.1 Water holding capacity and oil holding capacity.....	37
2.2.6.2 Emulsion activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI).....	37
2.2.6.3 Foaming capacity (FC) and stability (FS).....	38
2.2.6.4 Least gelling concentration.....	38
2.2.7 Statistical Analysis.....	39
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	39
3.1 Physicochemical composition of ingredients.....	39
3.2 Solubility.....	40
3.3 Particle size and apparent density.....	41
3.4 Morphology.....	43
3.5 Thermal properties.....	45
3.6 Technological properties.....	46
3.6.1 Water and oil holding capacity.....	46
3.6.2 Emulsion activity index and emulsion stability index	47
3.6.3 Foaming capacity and foaming stability.....	48
3.6.4 Least gelling concentration.....	50
4. CONCLUSION.....	52
5. REFERENCE.....	52
3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS.....	58
APÊNDICE A.....	60

1. INTRODUÇÃO GERAL.

O consumo de fontes proteicas vegetais, em substituição aos alimentos de origem animal, não é novidade e é amplamente difundido entre vegetarianos e veganos no mundo todo, motivados especialmente pela proteção à vida animal (SVB, 2018). Além do mercado crescente de vegetarianismo e veganismo, surge, desde a década de 90, um novo consumidor, chamado de flexitariano, que, só no Brasil, cresceu de 29% dos consumidores em 2018 para 50% em 2020 (GFI, 2020). A dieta flexitariana baseia-se na redução do consumo de carne ou produtos de origem animal, sem deixar de consumi-los totalmente. Conceitua-se como flexitariano o indivíduo que não consome carne ou produtos de origem animal, pelo menos um dia da semana em suas refeições. Acredita-se que entre 14% e 60% da população mundial seja flexitariana. No entanto, essa ampla faixa de valores é explicada pela variação alimentar dos diferentes países do mundo e também por muitos não terem o conhecimento dessa classificação e, com isso, não se identificarem nesse grupo populacional (ANZANI et al., 2020; KEMPER, 2020; ROSENFELD; ROTHGERBER; JANET TOMIYAMA, 2020).

Além da motivação pela proteção à vida animal, o aumento de mudanças na dieta também é dado pela conscientização da população acerca do consumo de proteína de origem animal e o impacto que os sistemas convencionais de criação geram ao meio ambiente (GONZÁLEZ et al., 2020). Ademais, estudos realizados pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2006) mostram a necessidade de diversificação na produção de alimentos proteicos, uma vez que a proteína animal não será suficiente para alimentar toda a população mundial. Esses dados, juntamente com o surgimento de novas demandas do consumidor, vêm incentivando as empresas a investirem e desenvolverem produtos à base de proteínas alternativas de fontes vegetais (*plant-based*) buscando satisfazer as necessidades nutricionais individuais e o desejo por produtos similares aos de origem animal, como carnes e lácteos.

Dentre as proteínas vegetais comercializadas no Brasil, a proteína da soja, uma leguminosa, foi a que ocupou, e ainda ocupa, o maior espaço no mercado devido ao seu alto teor proteico e ampla produção mundial, gerando alta oferta de grãos a preços competitivos. Com a rejeição dos consumidores aos produtos à base de soja, surge a necessidade e a oportunidade de beneficiamento e comercialização de outros grãos, conhecidos como *pulses*. *Pulse* é o termo em inglês destinado a “grãos secos, não verdes, de leguminosas com baixo teor

lipídico”, portanto, *pulses* são leguminosas não oleaginosas (FAO, 2007). Feijões, ervilhas, lentilhas e grão-de-bico são *pulses* consumidos em todo o mundo e apresentam-se como fontes de proteínas alternativas para o abastecimento do crescente mercado de alimentos *plant-based* (SÁ; MORENO; CARCIOFI, 2020).

Nesse contexto, o mercado internacional, já mais amadurecido quanto à procura e oferta de ingredientes e alimentos para o mercado *plant-based*, desenvolveu concentrados e isolados proteicos à base de ervilha, um pulse amplamente produzido no Canadá, Índia e Europa (ROBINSON; DOMONEY, 2020) e de grão-de-bico para aplicações alimentares diversas. O Brasil ainda tem sido um importador desses insumos, no entanto, este é momento propício para o desenvolvimento de ingredientes provenientes de *pulses* nacionais, como o feijão.

A seleção da fonte proteica a ser usada para a produção de ingredientes para o mercado *plant-based* depende das propriedades tecnológicas do ingrediente. As propriedades tecnológicas das proteínas vegetais podem ser alteradas durante o processamento para sua obtenção (concentrados e isolados proteicos) e durante o processo de formulação do produto que conterá o ingrediente proteico. O uso de solventes, calor, pressão ou cisalhamento, dentre outras tecnologias, pode gerar alterações conformacionais nas estruturas quaternárias, terciárias e secundárias das proteínas, melhorando ou não suas propriedades e alterando características tecnológicas importantes como solubilidade em água, retenção de água e óleo, capacidade de formação de espuma e emulsificação (BESSADA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2019), que são essenciais para o desenvolvimento de produtos que sejam aceitos pelo consumidor.

Tendo em vista a crescente demanda por ingredientes proteicos de origem vegetal, surge a necessidade de se estudar outras fontes de *pulses* e conhecer as propriedades tecnológicas desses ingredientes. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar as propriedades tecnológicas e morfológicas relevantes de farinhas, concentrados e isolados proteicos de soja, ervilha, feijão fava e feijão carioca.

2. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

2.1 CAPÍTULO I

O capítulo I apresenta uma revisão da literatura sobre as principais propriedades tecnológicas para o uso de proteínas como ingredientes alimentares e como a interpretação desses resultados ajudam no direcionamento para diferentes aplicações em alimentos. Na revisão também consta uma breve contextualização sobre o momento em que se encontra o Brasil, perante os produtos *plant based*.

2.2 CAPÍTULO II

O capítulo II, intitulado de “Propriedades físicas e tecno-funcionais de um concentrado proteico de feijão comum em comparação com ingredientes comerciais de leguminosas para o mercado *plant based*”, teve como objetivo avaliar o desempenho da farinha e concentrado proteico de feijão carioca produzidos pela equipe técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, comparando-os com isolados, concentrados e farinhas proteicas de outras fontes comerciais disponíveis no Brasil. Foram avaliadas as propriedades tecnológicas, térmicas e morfológicas dos ingredientes. Este capítulo foi submetido para publicação na revista *Food Hydrocoloids*, na forma de “Research paper”.

APÊNDICE A

O anexo apresenta a publicação de um guia (Guia para caracterização tecnológica-funcional de ingredientes proteicos para o mercado de produtos de origem vegetal) para avaliação das propriedades tecnológicas de ingredientes proteicos para o mercado *plant-based*. Esse estudo foi realizado em decorrência da necessidade de padronização das técnicas para que resultados produzidos para diferentes materiais e por diferentes instituições possam ser comparados de maneira mais robusta. Os métodos adaptados e/ou melhorados apresentados no guia foram utilizados para as avaliações desse estudo.

CAPÍTULO I

REVISÃO DA LITERATURA

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Leguminosas como fontes alternativas de proteínas

Dentre as fontes proteicas exploradas atualmente, pode-se citar as proteínas de insetos comestíveis, que possui um espaço considerável na alimentação de pessoas no continente asiático e africano (BAIANO, 2020; GRAVEL; DOYEN, 2020); as proteínas de fungos comestíveis ou micoproteínas, que possuem uma quantidade de aminoácidos essenciais similar à proteína de origem animal (HASHEMPOUR-BALTORK et al., 2020); as proteínas de algas comestíveis ou proteínas azuis, que já vêm sendo estudadas como substitutos cárneos para redução de sal (GULLÓN et al., 2021; VAN DER WEELE et al., 2019) e as proteínas vegetais provenientes das leguminosas, que vêm se destacando entre as proteínas alternativas para utilização em produtos *plant-based*.

O Brasil encontra-se em um momento muito propício para o desenvolvimento de ingredientes provenientes de *pulses*, principalmente *pulses* nacionais. Aliado à esse contexto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) junto à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e outros setores de produção criaram o Plano Nacional de Desenvolvimento da Cadeia do Feijão e *Pulses* (PNDCFP), incentivando o aumento da produção de *pulses* nacionais para atender a demanda crescente dos mercados nacional e internacional (BRASIL, 2018). Segundo o IBGE, a produção nacional de ervilha em 2019 foi de 2715 toneladas, não apresentando uma alteração significativa com relação ao colhido em 2018, no entanto, o rendimento médio (kg/ha) apresentou um aumento de aproximadamente 14%. Já para o feijão, a produção nacional da safra 2021/2022 será de aproximadamente 3,1 milhões de toneladas, representando um aumento de 6,6% em comparação à safra de 2020/2021 (CONAB, 2022). A soja apresentou uma produção recorde de aproximadamente 138 milhões de toneladas na safra 2020/2021, colocando o Brasil como o maior produtor mundial da oleaginosa (CONAB, 2022). Infelizmente é estimado que esse valor decaia em aproximadamente 10% na safra de 2021/2022, devido a condições edafo-climáticas (CONAB, 2022). Ainda assim, isso já demonstra o incentivo para atender a demanda nacional e internacional dessas matérias agrícolas.

Na Tabela 1, estão apresentados os grandes produtores mundiais de leguminosas. O Canadá é o maior produtor de ervilha e é o país que mais investe em estudos e na produção de ingredientes provenientes dessa leguminosa (ROBINSON; DOMONEY, 2020). A Índia é o

maior produtor de feijão e de grão-de bico. No entanto, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão e o maior produtor mundial de feijão comum, ou seja, do gênero *Phaseolus*, que compreende os feijões carioca e preto, além de outros. Dentre os feijões, a principal variedade cultivada no Brasil é o feijão carioca, que representa cerca de 66% da produção total de feijões no país (IBRAFE, 2022).

Tabela 1. Maiores produtores mundiais de leguminosas e produção nas safras 2019 e 2020.

Leguminosas	Ranking		
	1°	2°	3°
Ervilha	Canadá (4,4 Mt)	Rússia (2,5 Mt)	China (1,4 Mt)
Feijão	Índia (5,4 Mt)	Myanmar (3,0 Mt)	Brasil (2,9 Mt)
Feijão fava	China (2,0 Mt)	Ethiopia (1,0 Mt)	Reino Unido (0,3 Mt)
Soja	Brasil (118,0 Mt)	EUA (104,0 Mt)	Argentina (52,0 Mt)
Grão-de-bico	Índia (10,0 Mt)	Turquia (0,6 Mt)	Myanmar (0,5 Mt)

Fonte: FAOSTAT (2022). Mt = milhões de toneladas.

A grande variedade comercial de produtos à base de soja serve como vitrine para a produção de produtos já disponibilizados no mercado, mas que possam agora ser desenvolvidos à base de outras leguminosas ou *pulses*, por meio de diferentes estratégias de beneficiamento e processamento desses grãos. Bebidas à base de leguminosas, massas alimentícias isentas de gluten, *snacks*, análogos cárneos *plant-based*, proteínas texturizadas são excelentes exemplos da variedade de produtos disponíveis atualmente que possuem como base as proteínas, fibras e amidos presentes nos grãos (KUMAR; PANDEY, 2020) (Figura 1).

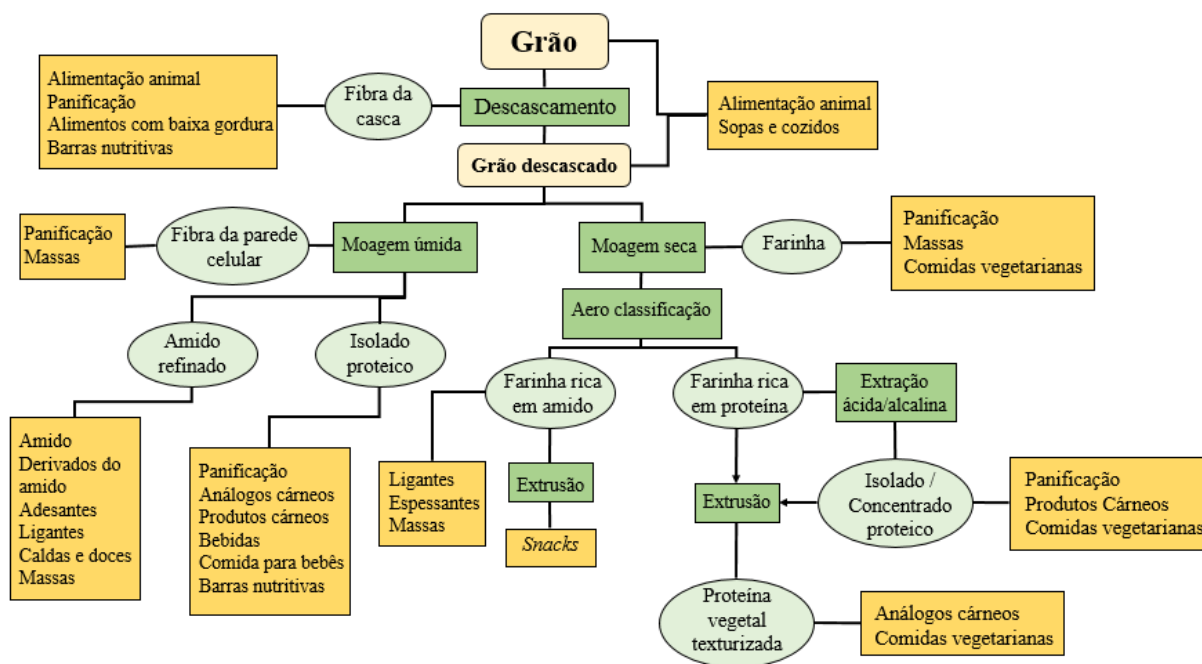


Figura 1. Estratégias e beneficiamento de grãos para o desenvolvimento de diferentes ingredientes e produtos alimentícios. Fonte com adaptações: DAHL (2019)

Os ingredientes proteicos podem ser encontrados sob a forma de farinhas, concentrados e isolados proteicos. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2020), “farinhas são os produtos obtidos de partes comestíveis de uma ou mais espécies de cereais, leguminosas, frutos, sementes, tubérculos e rizomas por moagem e ou outros processos tecnológicos considerados seguros para produção de alimentos”. Já produtos proteicos de origem vegetal são “os alimentos obtidos a partir de partes proteicas de espécie(s) vegetal(is), podendo ser apresentados em grânulo, pó, líquido, ou outras formas com exceção daquelas não convencionais para alimentos. Podem ser adicionados de outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto” (BRASIL, 2005a ; BRASIL, 2005b). No Brasil há uma regulamentação específica para ingredientes proteicos à base de soja. Segundo a RDC nº 268 de Setembro de 2005 (BRASIL, 2005b), a farinha de soja desengordurada deve possuir no mínimo 45% de proteína, os concentrados e isolados no mínimo 68% e 88%, respectivamente e outros produtos proteicos no mínimo de 40%. O fator de correção para cálculo de quantidade de nitrogênio, ou base nitrogenada, é de 6,25 para soja e 5,75 para demais proteínas vegetais (BRASIL, 2020). Embora o uso de farinhas apresente custo relativamente baixo no desenvolvimento de alimentos e o diferencial de conter fibras e carboidratos complexos, conferindo baixo índice glicêmico ao ingrediente, o uso de concentrados e isolados proteicos é

mais comum para o desenvolvimento de produtos *plant-based*, devido ao maior teor proteico dos mesmos (ASIF et al., 2013).

1.2 Proteínas de leguminosas

As leguminosas estão se tornando cada vez mais protagonistas na alimentação humana. Possuem uma variedade de vitaminas e minerais, carboidratos complexos e fibras. O teor proteico dos grãos pode variar entre 20% e 40%, dependendo da espécie, condições de plantio e de colheita (Tabela 2). As proteínas mais abundantes presentes nos grãos não possuem papel metabólico no vegetal, ficam armazenadas nos vacúolos e fornecem energia para a planta jovem no estágio de germinação e, por isso, são denominadas de proteínas de reserva (OHANENYE et al., 2020). As proteínas de reserva são classificadas de acordo com sua característica de solubilidade em proteína solúvel em água, solúvel em solução salina, solúvel em álcool e solúvel em soluções ácidas ou básicas. As albuminas são solúveis em água e compreendem entre 12% e 15% da proteína de reserva total. As globulinas estão presentes em maior concentração, entre 60% e 90%, e são solúveis em soluções salinas. As prolaminas são solúveis em soluções hidroalcoólicas e as glutelinas em soluções básicas ou ácidas, e são pouco comuns nas leguminosas, estando majoritariamente presente em cereais (OHANENYE et al., 2020; TONTUL et al., 2018).

Tabela 2. Composição química das leguminosas

Leguminosa	Proteína (%)	Amido (%)	Fibra (%)	Óleo (%)
Feijão comum	20,9-27,8	41,5	10,0	0,9-2,4
Feijão fava	26,1-38,0	37,0-45,6	7,5-13,1	1,1-2,5
Soja	35,1-42,0	1,5	20,0	17,7-21,0
Ervilha	18,3-31,0	45,0	12,0	0,6-5,5
Grão-de-bico	15,2-28,2	44,4	9,0	3,1-7,0

Fonte: KUMAR; PANDEY(2020)

Apesar de abundantes, as proteínas contidas em leguminosas apresentam uma deficiência na quantidade de alguns aminoácidos, principalmente os sulfurados, o que torna um limitante, do ponto de vista nutricional. Ao todo, existem 20 aminoácidos primários, dentre os quais, o corpo humano não é capaz de sintetizar nove, que são chamados de essenciais (triptofano, valina, fenilalanina, treonina, lisina, histidina, isoleucina, leucina e metionina) (OMOSEBI; OSUNDAHUNSI; FAGBEMI, 2018). A obtenção desses aminoácidos dá-se através da dieta e a quantidade mínima de ingestão diária de cada aminoácido varia em relação ao estágio de vida,

saúde e condições biológicas (PAYNE, 1965). No entanto, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (ONU) estipularam quantidades mínimas de ingestão diária desses aminoácidos para suprir a demanda do ser humano (Tabela 3). As proteínas de origem animal (leite, ovo e carnes) contêm todos os aminoácidos essenciais. Já dietas exclusivas à base proteínas vegetais necessitam ser oriundas de diferentes fontes para se obter todos os aminoácidos essenciais necessários para a saúde humana uma vez que possuem uma deficiência de alguns aminoácidos não tendo uma concentração o suficiente para a manutenção da saúde humana (WHO/ FAO/ UNU Expert Consultation, 2007). No Brasil, a Instrução normativa “IN75” (nº 75 de 09/10/2020) define o perfil mínimo de aminoácidos essenciais para alegação nutricional da proteína utilizada em alimentos, demonstrando um importante avanço na legislação brasileira em relação a produtos proteicos (BRASIL, 2020).

Tabela 3. Ingestão mínima de aminoácidos essenciais padronizada pela WHO/FAO/UNU Expert Consultation (2007) (mg/g de proteína requerida).

Aminoácido essencial	Idade (anos)					
	0,5	1-2	3-10	11-14	15-18	Adultos >18
Lisina	57	52	48	48	47	45
Valina	43	41	40	40	40	39
Leucina	66	63	61	61	60	59
Triptofano	8,5	7	6,6	6,6	6,3	6
Treonina	31	27	25	25	24	23
Histidina	20	18	16	16	16	15
Isoleucina	32	31	30	30	30	30
Aminoácidos sulfurados	27	25	23	23	23	22
Aminoácidos aromáticos	52	46	41	41	40	38

1.3 Propriedades tecnológicas e físicas de proteínas

As proteínas podem ser descritas como uma sequência linear de aminoácidos (estrutura primária), repetindo regularmente estruturas locais (estrutura secundária), dobramentos complexos e irregulares da cadeia do peptídeo em três dimensões (estrutura terciária) e um aglomerado de moléculas da proteína ou da cadeia polipeptídica (estrutura quaternária) (ARYEE; AGYEI; UDENIGWE, 2018). As características químicas de uma determinada proteína são influenciadas pela sequência de aminoácidos juntamente com as interações químicas internas de sua estrutura (ligações de hidrogênio, interações iônicas, forças de Van der Waals, empacotamento hidrofóbico, pontes salinas e ligações dissulfeto) que determinam

as regiões hidrofílicas, hidrofóbicas e cargas na cadeia polipeptídica. Fatores intrínsecos e extrínsecos como concentração da proteína, carga do meio e da proteína, composição do solvente junto com a interface de contato, dentre outros resultam nas propriedades funcionais que as proteínas irão desempenhar no meio onde se encontram (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010; MA et al., 2011).

As propriedades tecnológicas mais desejadas das proteínas, em se tratando de alimentos, são a capacidade de emulsificação, formação de espuma, retenção de água e óleo, capacidade de formar gel e solubilidade (BOYE et al., 2010b). Como mencionado anteriormente, a estrutura da proteína é fundamental para o seu desempenho funcional e, durante o processamento, as estruturas proteicas, especialmente as secundárias e terciárias, podem sofrer modificações consideráveis, alterando diferentes funcionalidade, seja positivamente e negativamente em uma determinada aplicação desejada (BESSADA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2019; DAY, 2013; GARCÍA ARTEAGA et al., 2020).

Entender melhor essas funcionalidades otimiza o tempo das indústrias na escolha da estratégia ideal para entregar produtos com melhor qualidade, aproveitando o máximo das propriedades que os ingredientes proteicos podem oferecer. Na Tabela 4, estão apresentadas as principais propriedades tecnológicas das proteínas e seus respectivos mecanismos simplificados, juntamente com algumas aplicações em alimentos.

Tabela 4. Propriedades tecno-funcionais e mecanismos simplificados para aplicações em alimentos.

Funcionalidade	Descrição Mecanismo principal	Aplicações
Solubilidade	Habilidade de se dissolver em um solvente	Bebidas
Retenção de água	Interação da proteína com a água, ligações de hidrogênio com a água e intumescimento	Análogos cárneos, bolos e pães
Retenção de óleo	Interação da proteína com gordura e ligações hidrofóbicas	Análogos cárneos, iogurtes, panificação
Gelatinização	Formação de gel e formação da rede tridimensional	Análogos cárneos, massas, panificação
Espuma	Adsorção das proteínas na interface e formação de filme aprisionando as bolhas de ar	Confeitaria (coberturas batidas, bolos, mousse e merengues)
Emulsificação	Adsorção das proteínas na interface. Formação de filme visco-elástico revestindo as gotículas de gordura	Molhos e sopas

Fonte com adaptações: (ARYEE; AGYEI; UDENIGWE, 2018)

1.3.1 Solubilidade

A solubilidade de uma proteína está relacionada com a interação eletrostática entre as proteínas e o meio e com as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas expostas no meio. A primeira interação se dá por meio das cargas do meio (pH e forças iônicas) com a carga da proteína (positiva ou negativa dependendo dos grupos R da cadeia), além da temperatura e tamanho das moléculas. Proteínas, em geral, são menos solúveis quando estão próximas do seu ponto isoelétrico e tendem a aumentar a solubilidade quando se afastam desse ponto (ARYEE; AGYEI; UDENIGWE, 2018; BARBANA; BOYE, 2013). No ponto isoelétrico, a carga da proteína se torna nula, diminuindo a interação iônica com o meio e aumentando as interações internas nas moléculas, gerando, como consequência, a aglomeração molecular e precipitação (ARYEE; BOYE, 2017). A solubilidade da proteína interfere diretamente nas propriedades de emulsão e formação de espuma. De certa forma, a baixa solubilidade de proteínas proveniente

de leguminosas próximas ao seu ponto isoelétrico é um dos principais fatores que dificultam a sua utilização em alimentos e bebidas (RUI et al., 2011).

A segunda interação entre proteína e meio que impacta na solubilidade está relacionada com a conformação da proteína. Quando uma proteína globular, como no caso das proteínas de reserva de leguminosas, está em sua conformação nativa, as regiões hidrofóbicas estão mais voltadas para o interior das moléculas e as regiões hidrofílicas para o exterior, interagindo via ligações de hidrogênio com o meio (ARYEE; AGYEI; UDENIGWE, 2018). Porém, quando as proteínas são submetidas a diferentes tipos de estresse, como os causados por processos de extração e secagem, por exemplo, as interações quaternárias e terciárias acabam se rompendo, podendo resultar na desnaturação proteica. A desnaturação acaba expondo os grupos hidrofóbicos, diminuindo a solubilidade da proteína em meios aquosos (KISELLA et. al., 1982). TANGER; ENGEL; KULOZIK (2020) e JIANG et al. (2017) verificaram que alguns isolados proteicos de ervilha comerciais tinham baixa solubilidade devido à esse tipo de desnaturação. Os autores também observaram que diferentes métodos de extração da proteína de ervilha afetaram a solubilidade do isolado proteico obtido. Por sua vez, SHEN; TANG; LI, (2021) aplicaram diferentes métodos de secagem na obtenção de isolado proteico de quinoa e concluíram que a solubilidade era maior (acima do pH 6) para as amostras secas por spray dryer e liofilização em comparação com secagem a vácuo.

Uma vez que o ponto isoelétrico das proteínas de leguminosas varia entre pHs 4 e 6, as maiores solubilidades são observadas em pHs ácidos e alcalinos, em curvas em modelo em “V”, como observado na Figura 2. Nessa figura, a curva da esquerda (isolado proteico de ervilha comercial) mostra que a proteína do isolado comercial está desnaturada enquanto a da direita (isolados proteicos de ervilhas obtidos por diferentes métodos) mostra uma curva em modelo “V” típico de proteína globular não desnaturada.

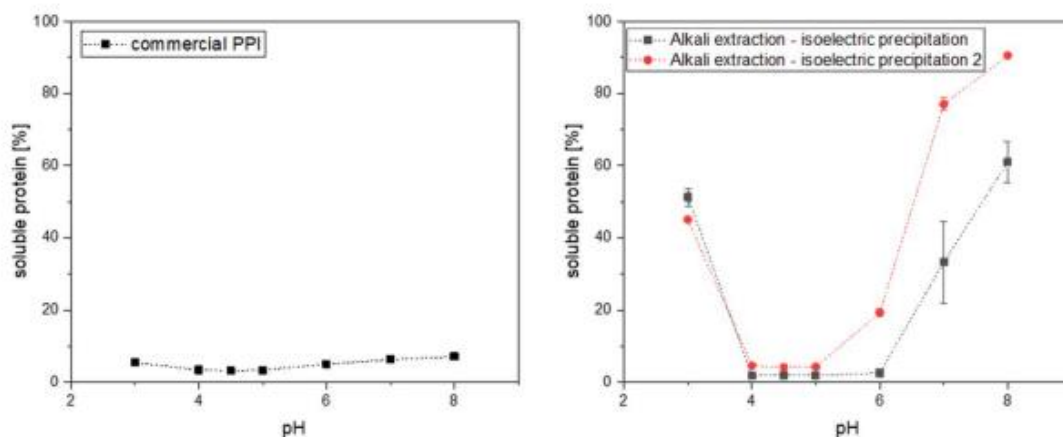


Figura 2. Exemplificação de uma curva de solubilidade. Legenda: À esquerda, uma curva de solubilidade para um isolado proteico de ervilha comercial desnaturado. À direita, curvas de isolados proteicos de ervilha obtidos por diferentes condições de extração. Fonte: TANGER; ENGEL; KULOZIK (2020).

1.3.2 Capacidade de retenção de água e óleo

A capacidade de retenção de água (*Water Holding Capacity*, WHC) é indicada pela quantidade de água absorvida ou retida por 1 grama de ingrediente, assim como a capacidade de retenção de óleo (*Oil Holding Capacity*, OHC) é indicada pela quantidade de óleo absorvido ou retido por 1 grama de ingrediente. O termo ingrediente é usado para se referir aos ingredientes proteicos em geral e não apenas a proteína, pois as farinhas e concentrados, mesmo tendo quantidade menor de proteína, possuem carboidratos e fibras que acabam desempenhando funções similares às proteínas, como formação de espuma, emulsificação, absorção de água e óleo (HOJILLA-EVANGELISTA et al., 2018; MA et al., 2011). Nas proteínas, as regiões hidrofílicas reagem com a água aderindo às moléculas em sua estrutura. De forma similar, as regiões hidrofóbicas interagem com as moléculas de gordura aderindo-as à sua estrutura. As capacidades de retenção de água e de óleo podem ser representadas na forma gráfica ou em tabelas. Um exemplo de representação gráfica está mostrado na Figura 3.

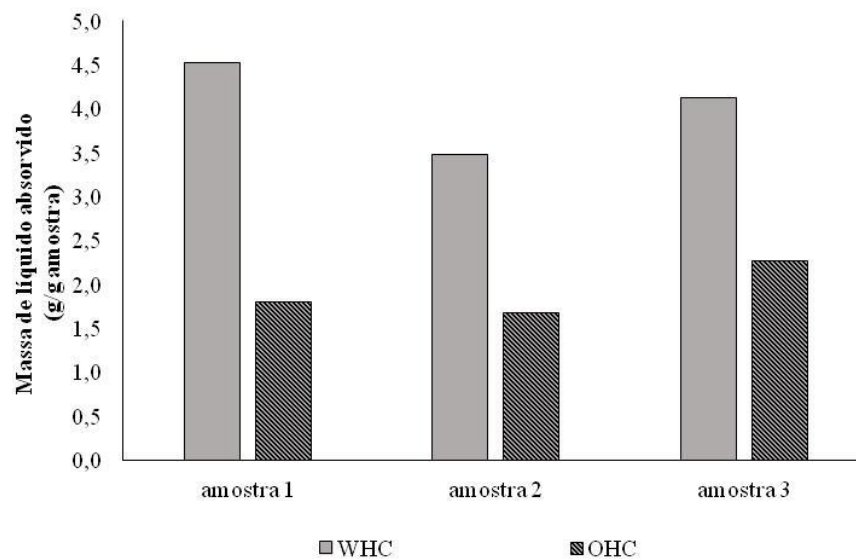


Figura 3. Exemplo de representação gráfica das análises de retenção de água (WHC) e de óleo (OHC). Fonte: SILVA et al. (2022).

A desnaturação total ou parcial da proteína é um efeito positivo para o incremento dessas propriedades, uma vez que a desnaturação aumenta a superfície de contato com o meio, expondo mais grupos hidrofílicos e hidrofóbicos resultando em um aumento da WHC e OHC, respectivamente (BÜHLER et al., 2020). A combinação dessas características são essenciais para produção de análogos cárneos, visto que a água absorvida se relaciona com a textura do produto e a gordura, além de intensificar o sabor, com a sensação de prazer no paladar, sendo um atrativo para o consumidor (BARAC' et al., 2015). BÜHLER et al. (2020) mostraram que o uso de calor seco (aproximadamente 175 °C) em concentrado proteico de feijão fava aumentou a retenção de água do ingrediente em comparação ao concentrado cru. GUNDOGAN e CAN KARACA (2020) compararam os isolados proteicos de diferentes feijões da Turquia e observaram que, mesmo a espécie *Simav* tendo a menor capacidade de retenção de água ($1,8 \pm 0,1$ g/g), apresentou a maior capacidade de retenção de óleo ($5,4 \pm 0,3$ g/g). BRISHTI et al. (2020) testaram diferentes métodos de secagem em isolado proteico de feijões, da espécie *Vigna radiata* e constataram que a WHC e a OHC do isolado seco por liofilização eram maiores quando comparados ao isolado seco por spray dryer.

1.3.3 Emulsificação

Uma emulsão é a mistura homogênea de dois líquidos imiscíveis, em que um líquido se apresenta em pequenas gotículas dispersas no outro. Em alimentos, o mais comum é a emulsão de água em óleo (A/O) e, como essa mistura é muito instável, necessita de agentes surfactantes para manter a emulsão ao longo da vida útil do produto. As proteínas entram como agentes emulsificantes pela sua característica anfifílica (possuir regiões hidrofílicas e hidrofóbicas), reagindo nas superfícies das gotículas de óleo e mantendo a emulsão estável (Figura 4) (BOYE; ZARE; PLETCH, 2010; HALL; MORARU, 2021). As proteínas também auxiliam na estabilidade, aumentando a viscosidade da fase contínua e dificultando o movimento das gotículas de óleo pela solução (SHEVKANI et al., 2019). Farinhas também possuem capacidade emulsificante, pois a fibra e os carboidratos presentes atuam como barreiras nas gotas de gordura, diminuindo a sua coalescência (MA et al., 2011).

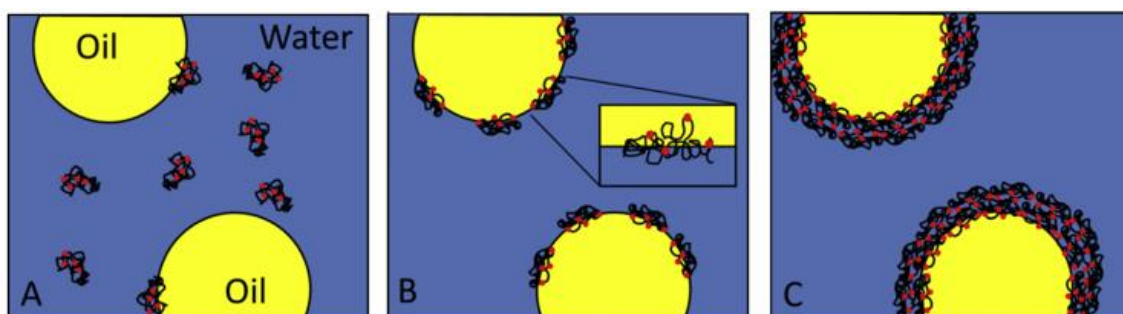


Figura 4. Processo simplificado da emulsificação. (A) proteínas globulares migrando para a interface água-óleo, (B) reorientação e (C) formação de filmes viscoelásticos. Os pontos vermelhos representam regiões hidrofóbicas encontrados em proteínas. Fonte: LAM e NICKERSON (2013).

Existem dois índices que auxiliam na medição da capacidade emulsificante das proteínas: índice de atividade emulsificante (*Emulsifying Activity Index*, EAI) que mede a superfície, em metros quadrados (m^2), em que um grama de proteína ou ingrediente consegue emulsificar o sistema e o índice de estabilidade da emulsão (*Emulsifying Stability Index*, ESI) que mede a estabilidade dessa emulsão em relação ao tempo (LIU et al., 2008). Esse método baseia-se na turbidimetria proposta por PEARCE e KINSELLA (1978) e é amplamente utilizado (BOYE et al., 2010; BRISHTI et al., 2020; BURGER; ZHANG, 2019; GUNDOGAN; KARACA, 2020; HALL; MORARU, 2021; TONTUL et al., 2018). Na Figura 5, tem-se uma exemplificação da análise proposta por PEARCE e KINSELLA (1978). Na imagem 5A tem-se

uma solução aquosa contendo proteína e óleo, na imagem B tem-se a mesma solução após homogeneização. Na Figura 6, tem-se um exemplo de apresentação gráfica dos resultados gerados por essa análise.



Figura 5. Etapas da análise de capacidade emulsificante. Fonte: SILVA et al. (2022).

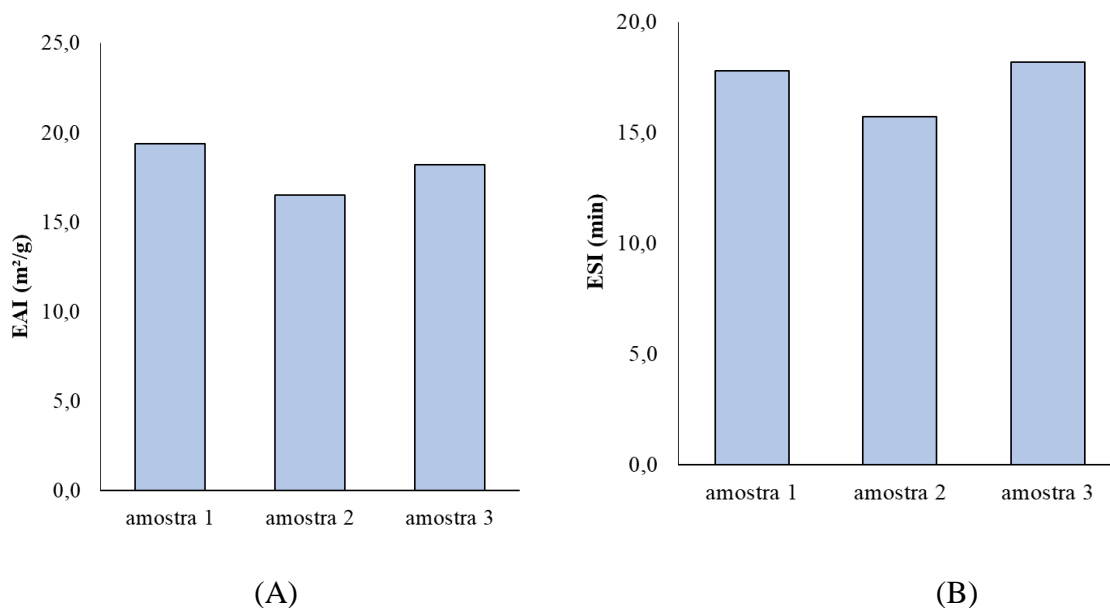


Figura 6. Modelo de representação gráfica de capacidade emulsificante (A) e estabilidade de emulsão (B). Fonte: SILVA et al. (2022).

WANG et al. (2020) estudaram a diferença entre a extração alcalina e a extração alcalina assistida por ultrassom nas propriedades tecnológicas de isolado proteico de ervilha e observaram que a EAI com ultrassom era maior (21,39 m²/g) em comparação à extração convencional (19,30 m²/g), evidenciando uma alteração maior na estrutura da proteína,

favorecendo a emulsificação. MA et al. (2011) avaliaram o efeito de diferentes tipos de aquecimento nas propriedades tecnológicas de diferentes farinhas de *pulses* e relataram que o cozimento úmido e seco influenciou positivamente na EAI das farinhas de diferentes tipos de grão-de-bico e lentilhas.

1.3.4 Formação de espuma

O processo de formação de espuma tem um mecanismo similar ao da emulsificação. Na emulsão, a proteína é o agente que interage entre a água e o óleo, já na espuma, a proteína é o agente entre a água e o ar. KUMAR et al. (2022) descreveram o processo da formação de espuma em três etapas: Primeiro, proteínas globulares com alta solubilidade se difundem na interface do ar e da água, onde se concentram e diminuem a tensão superficial do ambiente. Então, os polipeptídeos da proteína se desdobram na interface com uma reorientação síncrona onde as porções polares migram para a água. Em seguida, os polipeptídeos interagem uns com os outros para a formação de uma rede constante e contínua armazenando o ar.

O potencial de formação de espuma (*Foam Capacity*, FC) é medido pela quantidade de espuma produzida por uma solução, após agitação mecânica intensa, em um determinado tempo (Figura 7). A estabilidade de espuma (*Foam Stability*, FS) é medida pela quantidade de espuma mantida após um determinado tempo (Figura 8) (SHEVKANI et al., 2019). CUI et al. (2020) avaliaram o efeito de diferentes pHs para a extração de proteína de diferentes cultivares de ervilha amarela e constataram que a extração em pH 10,0 afetou significativamente, de forma positiva, a capacidade de formação de espuma em comparação com extração em pH 8,5, para todas as cultivares. TANG et al. (2021) produziram isolados proteicos provenientes de nove *pulses* diferentes e os compararam com isolado de soja comercial. O produto comercial apresentou o pior desempenho, tanto para a formação quanto para estabilidade de espuma. Os autores relacionaram os resultados à possível desnaturação da proteína durante o seu processamento industrial.



Figura 7. Exemplificação da análise de formação de espuma. Fonte: SILVA et al. (2022).

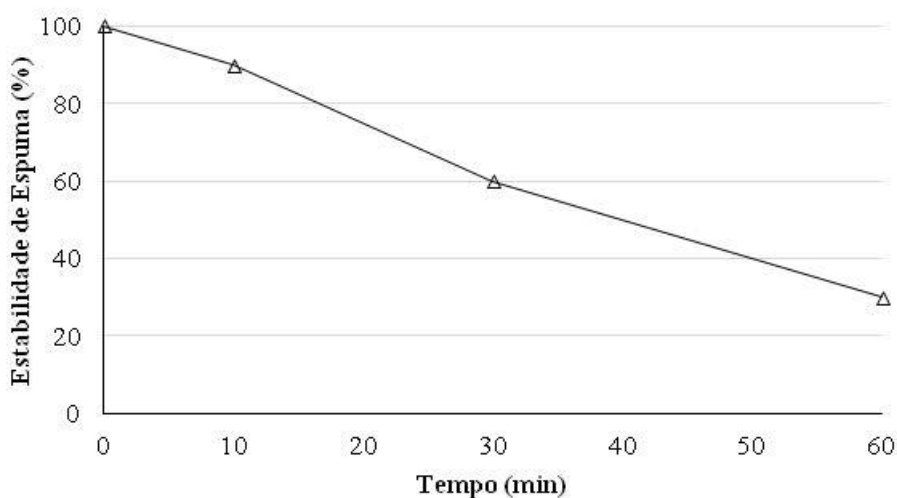


Figura 8. Modelo de gráfico para representação da estabilidade de espuma de ingredientes proteicos. Fonte: SILVA et al. (2022).

1.3.5 Geleificação

Proteínas globulares em solução aquosa podem formar gel quando são desnaturadas através do aquecimento do sistema. Gel é um sistema disperso de, pelo menos, dois componentes, no qual o dispersante forma uma rede coesa e caracteriza-se pela falta de fluidez e deformabilidade elástica (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). Após serem desnaturadas pelo calor, as proteínas interagem entre si durante o resfriamento, de forma irreversível, através de pontes dissulfeto, ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals,

podendo criar uma rede semi-sólida ou coágulos dependendo da concentração da proteína, soluto, forças iônicas, tamanho das moléculas e temperatura de aquecimento (ARYEE; AGYEI; UDENIGWE, 2018; BARACĆ et al., 2015). A capacidade de formação de gel é medida pela menor concentração necessária para produzir um gel firme (*Least Gelling Concentration*, LGC) (BOYE et al., 2010). Para essa avaliação, diferentes concentrações de proteínas ou de ingredientes (2% a 20%) são adicionados de água e aquecidos, seguido de resfriamento. O fluido resfriado é avaliado de acordo com o seu escoamento e classificado em: (i) gel firme, quando o fluido não escoar; (ii) gel fraco, quando o fluido escoar lentamente pelo recipiente e (iii) sem formação de gel, quando o fluido se apresenta completamente líquido. LGC é definido com a menor concentração necessária para formação do gel firme.

A Figura 9 apresenta um exemplo do teste de formação de gel com tubos em ordem decrescente de concentração. Tubos da esquerda para a direita são referentes às concentrações de 0,20; 0,18; 0,16; 0,14; 0,12; 0,10; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 g/mL.

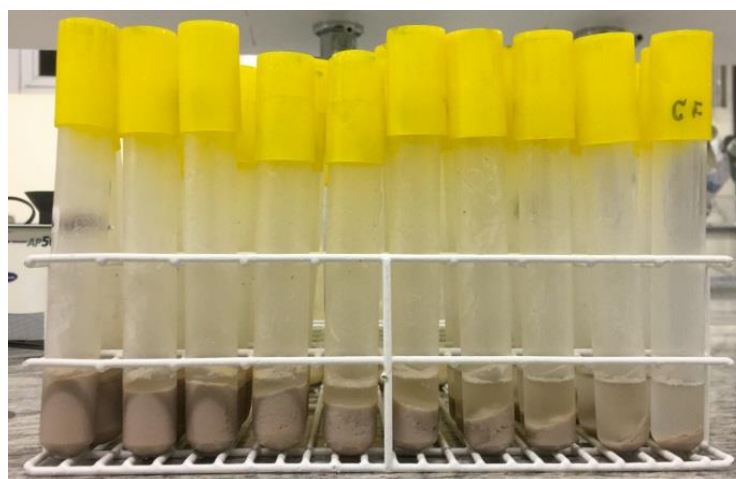


Figura 9. Teste de formação de gel. Fonte: SILVA et al. (2022).

Assim como as demais propriedades tecnológicas, a representação gráfica dos resultados é uma boa opção para comparação de diferentes matérias, como apresentado no Quadro 1, a seguir.

Quadro 1. Modelo usado na determinação de concentração mínima de gelificação ou LGC (*Least Gelling Concentration*) de um ingrediente proteico.

Repetições	Concentração (g/mL)									
	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
1	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

(-) não formou gel, (±) gel fraco, (+) formou gel. No exemplo considera-se como LGC a concentração em que as três repetições formaram gel, ou seja 0,10 g/mL. Fonte: SILVA et al. (2022).

WANG et al. (2020) observaram que o uso de ultrassom na obtenção de isolado proteico de ervilha melhora a capacidade de formação de gel em comparação ao produto obtido sem o uso do ultrassom. TAN; YING-YUAN e GAN (2014) compararam um isolado proteico de feijão produzido na Malásia com isolado proteico de soja comercial local. O isolado de soja apresentou um desempenho melhor na formação de gel porém, os autores relacionaram o resultado ao fato da estabilidade térmica do isolado de feijão obtido, ser de, aproximadamente, 110 °C, enquanto a estabilidade da soja era de 92,5 °C. Como a análise de formação de gel aquece as amostras à 100 °C, essa temperatura pode não ter sido o suficiente para desnaturar totalmente a proteína e, com isso, não seria capaz de formar um bom gel em baixas concentrações.

1.3.6 Propriedades térmicas

A caracterização térmica de um ingrediente inclui um grupo de técnicas em que o objeto de estudo é avaliado em função da temperatura, mediante à uma programação controlada da mesma. Em relação às proteínas, entender sua resistência ao calor é fundamental para entender a estabilidade térmica durante um processamento. Em razão de estrutura singular de cada proteína e de padrão dobrável, as proteínas respondem de forma diferente ao processo de aquecimento, ou seja, cada proteína sofre deformações estruturais com o efeito da barreira termodinâmica de transição. A temperatura altera a conformação do polipeptídeo nos níveis de estrutura quaternária, terciária e secundária, causando uma deformação da proteína. As alterações nas proteínas com o uso da temperatura incluem mudanças físico-químicas, como fusão, evaporação, cristalização e degradação (KUMAR et al., 2022; ZHOU et al., 2015).

Dentre as análises de caracterização térmica, a calorimetria diferencial de varredura (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) é uma análise eficiente para determinar o efeito do

processamento térmico na desnaturação da proteína (RUI et al., 2011), bem como as interações com outras macromoléculas, como lipídeos e carboidratos (TIMILSENA et al., 2015). O DSC mede as mudanças de energia que ocorrem no material em relação a um material de referência, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura, captando os sinais emitidos ou absorvidos pela amostra. A área contida sob o pico (Figura 10) é representativa da variação de entalpia (ΔH) sofrida pela amostra. As variações de entalpia são chamadas transições de primeira ordem (fusão, cristalização, vaporização, solidificação e adsorção), como, por exemplo, a desnaturação proteica. As transições térmicas de segunda ordem não geram picos nas curvas de DSC e sim, alterações na linha de base (COUPLAND et al., 2000). A temperatura *onset* (T_{onset}) marca o início do evento ou da mudança que ocorre na amostra. A temperatura do pico (T_{peak}), marca a temperatura de desnaturação da proteína, quanto maior a T_{peak} maior a resistência térmica. Em alguns casos, a curva de DSC de uma amostra proteica pode apresentar mais de um pico de desnaturação. Isso significa que as subunidades da proteína possuem transições térmicas diferentes. AHMED et al. (2018) verificou que um isolado proteico de feijão vermelho possuía três picos próximos, porém distintos, e relacionou os picos com as frações de vicilina (7S) e legumina (11S).

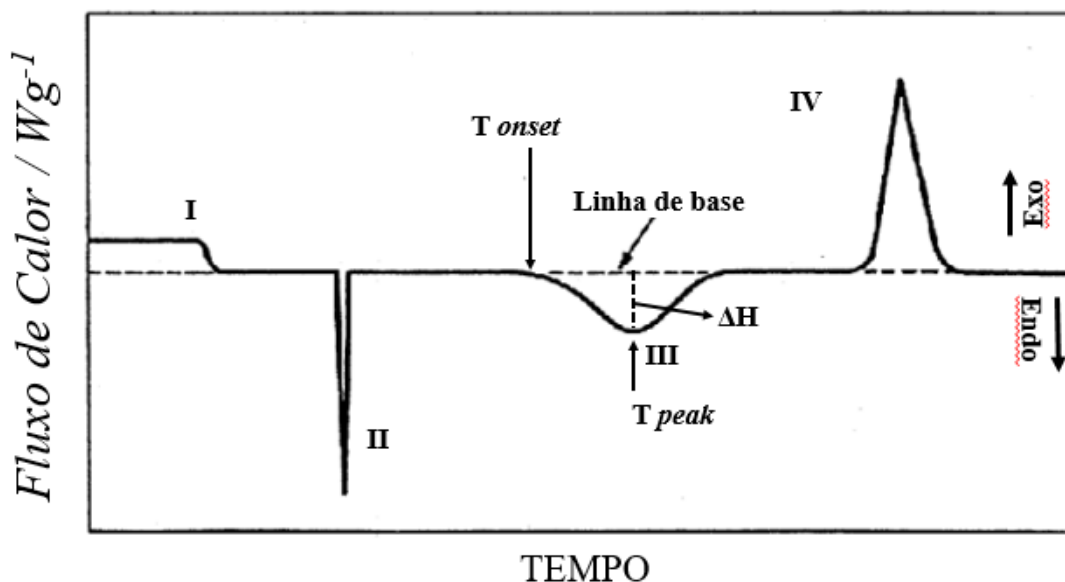


Figura 10: Exemplificação teórica da curva do DSC. Legenda: I - Mudança de linha de base sem pico, II e III – picos endotérmicos (normalmente gelatinização do amido e desnaturação da proteína), IV – pico exotérmico (cristalização). Fonte com adaptações: BERNAL et al. (2002).

Para a análise, podem ser usadas tanto amostras secas quanto líquidas, porém, o uso de água aumenta a reatividade dentro da amostra e diminui a temperatura de ocorrência de todos os eventos. Um exemplo é a gelatinização do amido em farinhas proteicas onde o uso de água na amostra faz com que esse evento ocorra antes da desnaturação da proteína e, a não hidratação da amostra, pode acarretar que ambos os eventos ocorram ao mesmo tempo em temperaturas muito elevadas, impossibilitando a leitura (ARYEE; BOYE, 2017; BARBANA; BOYE, 2013; RUI et al., 2011).

HALL e MORARU (2021) avaliaram o efeito da alta pressão e do tratamento térmico na estrutura e funcionalidade da proteína de concentrados proteicos de feijão fava, lentilha e ervilha comerciais. O estudo mostrou que os concentrados que não passaram pelos tratamentos de alta pressão ou térmico apresentaram uma curva de desnaturação típica de uma proteína, enquanto as amostras que passaram pelos processamentos apresentaram uma linha reta, indicando a desnaturação proteica. BARBANA e BOYE (2013) estudaram as propriedades tecnológicas das farinhas e concentrados proteicos de duas variedades de lentilha. As farinhas apresentaram dois picos, sendo que o primeiro foi relacionado à gelatinização do amido e teve uma temperatura de pico entre 68 °C e 69 °C com valor de ΔH entre 9 e 11 J.g⁻¹, já o segundo pico foi relacionado à desnaturação da proteína com o pico entre 84 °C e 86 °C com ΔH de aproximadamente 1 J.g⁻¹. Esse valor baixo reflete a baixa concentração de proteína na farinha. Para os concentrados, foram achados também dois picos porém, o primeiro foi de menos de 0,25 J.g⁻¹ podendo ser algum amido residual pois ocorreu na mesma faixa das farinha (próximo a 65 °C). O segundo pico, por ter uma concentração maior de proteína, teve um ΔH de aproximadamente 13 J.g⁻¹.

1.3.7 Característica morfológica

A análise da morfologia dos ingredientes é uma ferramenta importante para entender as propriedades dos mesmos e vem sendo usada com sucesso para avaliar a microestrutura dos alimentos. A microscopia permite investigar as proteínas dos alimentos, além de seus demais componentes, visto que os alimentos são um grupo heterogêneo de diferentes componentes com macro, meso e microestruturas que regem as propriedades tecnológicas, mecânicas e biológicas desempenhadas pelos alimentos (CHEN et al., 2018; JUNEJO et al., 2021).

Entre os métodos eletrônicos, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma das ferramentas de obtenção de imagens de alta resolução. Esta técnica está sendo amplamente utilizada para gerar informações relacionadas à estrutura, forma, tamanho, morfologia da superfície e modificações em proteínas vegetais, indicando também o aspecto de

homogeneidade das amostras proteicas (MA et al., 2011; PELGROM; BOOM; SCHUTYSER, 2015). A técnica também é útil para estudar o efeito dos parâmetros de processamentos sobre a integridade da estrutura da proteína, como exemplificado na Figura 11.

O microscópio eletrônico de varredura gera imagens digitalizando a superfície da amostra por meio de um feixe de elétrons focalizado. O princípio de operação baseia-se, fundamentalmente, na quantificação de elétrons secundários emitidos por uma amostra, como resposta a uma excitação eletrônica incidente. A interação entre o feixe de elétrons e os átomos na superfície do material gera uma série de sinais, dando informações sobre a composição e topologia da superfície da amostra. A preparação das amostras é relativamente simples, não necessitando ser coradas, fixando-as em filmes revestidos de carbono, o que justifica ser hoje um dos equipamentos mais utilizados na pesquisa de materiais (KUMAR et al., 2022).

Os métodos de secagem dos ingredientes podem afetar as estruturas proteicas e, conseqüentemente, suas propriedades. O uso de *spray dryer* retira a umidade intrínseca das partículas, fazendo com que tenham a aparência enrugada, quando visualizadas no microscópio eletrônico de varredura, criando cavidades no interior das partículas. Já o uso de liofilização mantém uma estrutura porosa não colapsada das partículas e a secagem em secador convencional dá o formato de cristais amorfos (Figura 11) (BRISHTI et al., 2020).

REMPEL; GENG e ZHANG (2019) estudaram a preparação de diferentes frações de farinha por aeroclassificação em escala industrial. No estudo, a fração fina foi caracterizada pela presença majoritária de material celular, proteína e poucos grânulos de amido e a fração grossa pela concentração de grânulos de amido com poucos corpos proteicos aderidos ao amido. DE ANGELIS et al. (2021) também avaliaram a preparação de diferentes frações de farinha de pulses usando aeroclassificação. Para o grão de bico (*Cicer arietinum L.*), não se obteve uma boa concentração de proteína na fração fina em comparação com as outras pulses e, analisando as imagens fornecidas pelo MEV, observaram que o grânulo do amido do grão de bico era muito pequeno o que dificultou a separação por aeroclassificação.

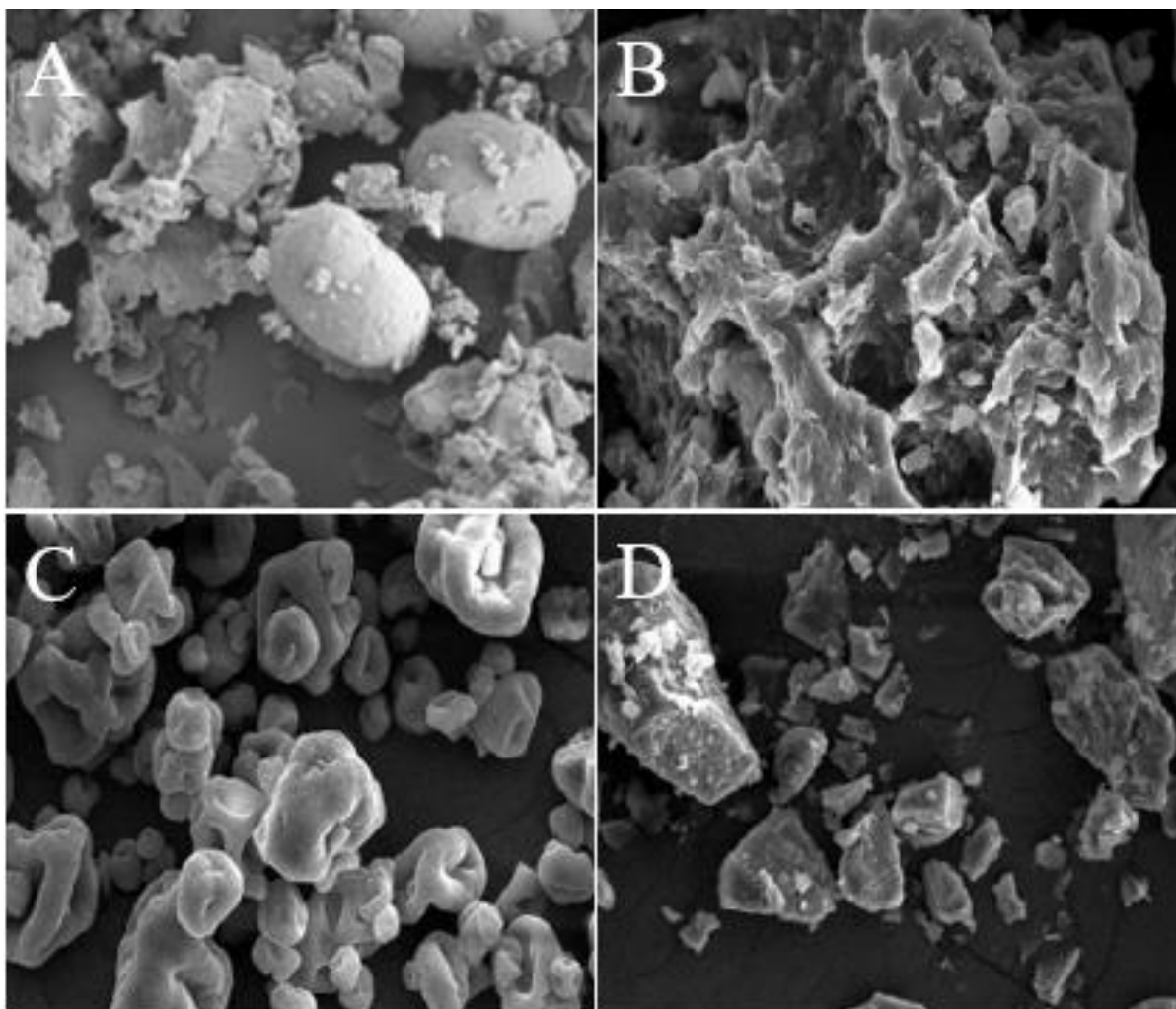


Figura 11. Micrografias eletrônicas de farinhas e isolados proteicos. Legenda: A- farinha crua de ervilha verde descascada, mostrando o grânulo de amido, material de parede celular e cristais de proteína aderidos ao amido ($\pm 4 \mu\text{m}$); B – liofilização de isolado proteico de feijão (*Vigna radiata*); C – spray dryer de isolado proteico de feijão (*Vigna radiata*); D – secagem em forno de isolado proteico de feijão (*Vigna radiata*). Fonte com adaptações: BRISHTI et al. (2020); MA et al. (2011).

1.3.8 Tamanho de partícula

O tamanho de partícula é um parâmetro importante pois afeta a funcionalidade tecnológica do ingrediente e na qualidade final do produto. A redução do tamanho de partícula aumenta a área total da superfície e o número de partículas, o que possibilita uma maior interação do ingrediente com o meio (AHMED et al., 2022). O tamanho da partícula também está relacionado com a cor do ingrediente, o aumento da área superficial permite uma refração maior da luz deixando o produto visualmente mais claro (BRISHTI et al., 2020).

LAPČÍKOVÁ et al. (2021) avaliaram o efeito da redução do tamanho de partícula em farinha de arroz e observaram que a absorção de água aumentava com a diminuição do tamanho. DRAKOS et al. (2017) estudaram também avaliaram a redução do tamanho de partícula em farinhas de cevada e centeio. A redução do tamanho foi positiva para absorção de água porém negativa com relação a absorção de óleo.

Para ingredientes proteicos, o método de secagem utilizado na obtenção tem impacto direto no tamanho da partícula do concentrado ou isolado proteico. O uso de spray dryer tende a obter partículas menores em comparação a liofilização. Durante a liofilização, a formação de cristais de gelo pode causar uma agregação do material resultando em partículas maiores (BRISHTI et al., 2020; GHRIBI et al., 2015; SHEN; TANG; LI, 2021).

LIU et al. (2019) estudaram o efeito da secagem em spray dryer e liofilização em um concentrado proteico de amendoim obtido por extração aquosa. O concentrado seco por spray dryer apresentou uma maior capacidade emulsificante que o seco por liofilização e os autores correlacionaram isso as partículas menores obtidas pela secagem por spray dryer. ZHAO et al. (2013) obtiveram resultados similares estudando diferentes métodos de secagem em isolado proteico de arroz.

2. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AHMED, J. et al. Effect of high pressure treatment on functional, rheological and structural properties of kidney bean protein isolate. **Lwt**, v. 91, n. January, p. 191–197, 2018.

AHMED, J. et al. Micromeritic, thermal, dielectric, and microstructural properties of legume ingredients: A review. **Legume Science**, v. 4, n. 1, p. 1–17, 2022.

ANZANI, C. et al. Optimising the use of proteins from rich meat co-products and non-meat alternatives: Nutritional, technological and allergenicity challenges. **Food Research International**, v. 137, n. July, p. 109575, 2020.

ASIF, M. et al. Application and Opportunities of Pulses in Food System: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 11, p. 1168–1179, 2013.

ARYEE, A. N. A.; AGYEI, D.; UDENIGWE, C. C. **Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins**. Second Edition. [s.l.] Elsevier Ltd., 2018.

ARYEE, A. N. A.; BOYE, J. I. Comparative Study of the Effects of Processing on the Nutritional, Physicochemical and Functional Properties of Lentil. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, p. 24–30, 2017.

BAIANO, A. Edible insects: An overview on nutritional characteristics, safety, farming,

production technologies, regulatory framework, and socio-economic and ethical implications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 100, n. March, p. 35–50, 2020.

BARACĆ, M. B. et al. Techno-functional properties of pea (*Pisum sativum*) protein isolates-a review. **Acta Periodica Technologica**, v. 46, p. 1–18, 2015.

BARBANA, C.; BOYE, J. I. In vitro protein digestibility and physico-chemical properties of flours and protein concentrates from two varieties of lentil (*Lens culinaris*). **Food and Function**, v. 4, n. 2, p. 310–321, 2013.

BELITZ, H.D.;GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**, Springer-Verlag, Berlin, 2009; pp 65- 95.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de Análises Calorimétricas Diferenciais – DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.

BESSADA, S. M. F.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. **Trends in Food Science and Technology**, v. 93, n. 228, p. 53–68, 2019.

BOYE, J. I. et al. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 537–546, 2010a.

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

BRISHTI, F. H. et al. Effects of drying techniques on the physicochemical, functional, thermal, structural and rheological properties of mung bean (*Vigna radiata*) protein isolate powder. **Food Research International**, v. 138, n. PB, p. 109783, 2020.

BÜHLER, J. M. et al. Modifying faba bean protein concentrate using dry heat to increase water holding capacity. **Foods**, v. 9, n. 8, p. 1–16, 2020.

BURGER, T. G.; ZHANG, Y. Trends in Food Science & Technology Recent progress in the utilization of pea protein as an emulsifier for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 86, n. July 2018, p. 25–33, 2019.

BRASIL. Instrução Normativa-IN N° 75, de 09 de Outubro de 2020. Diário oficial da União. Brasília, ed 195, seção 1, 2020. 113p. Disponível em < <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-75-de-8-de-outubro-de-2020-282071143>.> acesso em 23 nov 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano nacional de

desenvolvimento da cadeia do feijão e pulses. Brasília, 2018. 44p. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/plano-para-aumentar-producao-defeijao-e-pulses-e-lancado-no-mapa/cartilhafeijaoabaixa.pdf>> acesso em 15 out 2020.

BRASIL. RDC 263 de 22 de Setembro de 2005. Diário oficial da União. Brasília, n184, 2005a. Disponível em <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_263_2005_.pdf/2b494d48-0d39-4c8d-84d1-e20ec6e9190f> acesso em 23 nov 2020.

BRASIL. RDC 268 de 22 de Setembro de 2005. Diário oficial da União. Brasília, n184, 2005b. Disponível em <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC_268_2005_.pdf/db5416e0-e965-474e-9446-8f13c195397e> acesso em 23 nov 2020.

CHEN, J. et al. Structure, physicochemical, and functional properties of protein isolates and major fractions from cumin (*Cuminum cyminum*) seeds. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 685–701, 2018.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Boletim da Safra de Grãos. 2022. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>> acesso em 15 jun 2022.

COUPLAND, J.N.; SHAW, N.B.; MONAHAN, F.J.; O'RIORDAN, D.; O'SULLIVAN, M. Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. **Journal of Food Engineering**, 43, 1, 25-30, 2000.

CUI, L. et al. Functionality and structure of yellow pea protein isolate as affected by cultivars and extraction pH. **Food Hydrocolloids**, v. 108, n. May, p. 106008, 2020.

DAY, L. Proteins from land plants - Potential resources for human nutrition and food security. **Trends in Food Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 25–42, 2013.

DE ANGELIS, D. et al. Antinutritional factors, mineral composition and functional properties of dry fractionated flours as influenced by the type of pulse. *Heliyon*, v. 7, n. 2, 2021.

DRAKOS, A. et al. Influence of jet milling and particle size on the composition, physicochemical and mechanical properties of barley and rye flours. **Food Chemistry**, v. 215, p. 326–332, 2017.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Livestock's Long Shadow, environmental issues and options*. Rome, 2006. Disponível em: < [a0701e.pdf \(fao.org\)](#)> acesso em 20 dez 2020.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Cereals, pulses,*

legumes and vegetable proteins. Rome, 2007 . Disponível em < <http://www.fao.org/3/a-a1392e.pdf>> acesso em 19 out 2020.

GFI. Good Food Institute Brazil. *O consumidor brasileiro e o mercado plant-based*. 2021. Disponível:< <https://gfi.org.br/wp-content/uploads/2021/02/O-consumidor-brasileiro-e-o-mercado-plant-based.pdf>> acesso em 19 out 2021

GONZÁLEZ, N. et al. Meat consumption: Which are the current global risks? A review of recent (2010–2020) evidences. **Food Research International**, v. 137, n. May, p. 109341, 2020.

GARCÍA ARTEAGA, V. et al. Effect of enzymatic hydrolysis on molecular weight distribution, techno-functional properties and sensory perception of pea protein isolates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 65, n. February, p. 102449, 2020.

GHRIBI, A. M. et al. Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 165, p. 179–188, 2015.

GUNDOGAN, R.; CAN KARACA, A. Physicochemical and functional properties of proteins isolated from local beans of Turkey. **Lwt**, v. 130, n. February, p. 109609, 2020.

HALL, A. E.; MORARU, C. I. Structure and function of pea , lentil and faba bean proteins treated by high pressure processing and heat treatment. **LWT**, v. 152, n. April, p. 112349, 2021.

HOJILLA-EVANGELISTA, M. P. et al. Composition and Functional Properties of Saline-Soluble Protein Concentrates Prepared from Four Common Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, n. 8, p. 1001–1012, 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola-Lavoura temporária. Disponível em <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/14/0?tipo=grafico&indicador=10287>> acesso em 15 out 2020.

IBRAFE. Instituto Brasileiro de Feijões e Pulses. **Revista IBRAFE**. Revista IBRAFE. 4º edição. 2022. Disponível em: < https://www.ibrafe.org/wp-content/uploads/2018/09/FF_revista_ibrafe_22_DIGITAL.pdf> acesso em: 20 jun 2022.

JIANG, S. et al. Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, n. January, p. 835–842, 2017.

JUNEJO, S. A. et al. Pea cell wall integrity controls the starch and protein digestion properties in the INFOGEST in vitro simulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 1200–1207, 2021.

KEMPER, J. A. Motivations, barriers, and strategies for meat reduction at different family lifecycle stages. **Appetite**, v. 150, n. August 2019, p. 104644, 2020.

KISELLHA J E. 1982. Relation between structure and functional properties of food proteins. In: **Food Proteins**. Proceedings of the Kellogg Foundation International Symposium on Food Proteins Held at University College. Cork, 21–24 September, 1981. Applied Science Publishers, Republic of Ireland. pp. 52–103

KUMAR, M. et al. Functional characterization of plant-based protein to determine its quality for food applications. **Food Hydrocolloids**, v. 123, n. December 2020, p. 106986, 2022.

KUMAR, S.; PANDEY, G. Biofortification of pulses and legumes to enhance nutrition. **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. 4–9, 2020.

LAM, R. S. H.; NICKERSON, M. T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 975–984, 2013.

LAPČÍKOVÁ, B. et al. Effect of the rice flour particle size and variety type on water holding capacity and water diffusivity in aqueous dispersions. **Lwt**, v. 142, n. August 2020, 2021

LIU, C. et al. Funcnal properties of protein isolates from soybeans stored under various conditions. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 29–37, 2008.

LIU, J. et al. Characterisation of peanut protein concentrates from industrial aqueous extraction processing prepared by spray and freeze drying methods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1597–1608, 2019.

MA, M. et al. Physicochemical and functional properties of protein isolate obtained from cottonseed meal. **Food Chemistry**, v. 240, n. March 2017, p. 856–862, 2018.

MA, Z. et al. Thermal processing effects on the functional properties and microstructure of lentil, chickpea, and pea flours. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2534–2544, 2011.

MOHAMED, A. et al. Barley protein isolate: Thermal, functional, rheological, and surface properties. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, n. 3, p. 281–288, 2007.

PAYNE, P. R. Reference Protein Patterns. 1965. Disponível em: < [Microsoft Word - ae906e25.htm \(fao.org\)](https://www.fao.org/docrep/010/ae906e25.htm)> acesso em 18 Nov 2020.

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

PELGROM, P. J. M.; BOOM, R. M.; SCHUTYSER, M. A. I. Method Development to Increase Protein Enrichment During Dry Fractionation of Starch-Rich Legumes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 7, p. 1495–1502, 2015.

REMPEL, C.; GENG, X.; ZHANG, Y. Industrial scale preparation of pea flour fractions with enhanced nutritive composition by dry fractionation. **Food Chemistry**, v. 276, n. October 2018, p. 119–128, 2019.

ROBINSON, G. H. J.; DOMONEY, C. Perspectives on the genetic improvement of health- and nutrition-related traits in pea. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 158, n. August 2020, p. 353–362, 2020.

ROSENFELD, D. L.; ROTHGERBER, H.; JANET TOMIYAMA, A. From mostly vegetarian to fully vegetarian: Meat avoidance and the expression of social identity. **Food Quality and Preference**, v. 85, n. August 2019, p. 103963, 2020.

RUI, X. et al. Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2497–2504, 2011.

SÁ, A. G. A.; MORENO, Y. M. F.; CARCIOFI, B. A. M. Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. **Trends in Food Science and Technology**, v. 97, n. January, p. 170–184, 2020.

SILVA, C. M.; FELBERG, I.; LIMA, J. R.; GOUVÊA, L. DE P.; GALDEANO, M. C.; CALDEIRA, R. F.; AZEVEDO, T. de L. Guia para caracterização tecnológica-funcional de ingredientes proteicos para o mercado de produtos de origem vegetal. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2022. 27 p. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Documentos, 145.

SHEN, Y.; TANG, X.; LI, Y. Drying methods affect physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. **Food Chemistry**, v. 339, n. June 2020, p. 127823, 2021.

SHEVKANI, K. et al. Pulse proteins: secondary structure, functionality and applications. **Journal of Food Science and Technology**, 2019.

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

2014.

TANG, X. et al. Parallel comparison of functional and physicochemical properties of common pulse proteins. **Lwt**, v. 146, n. May, p. 111594, 2021.

TANGER, C.; ENGEL, J.; KULOZIK, U. Influence of extraction conditions on the conformational alteration of pea protein extracted from pea flour. **Food Hydrocolloids**, v. 107, n. April, p. 105949, 2020.

TIMILSENA, Y. P. et al. Preparation and characterization of chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 554–563, 2015.

VAN DER WEELE, C. et al. Meat alternatives: an integrative comparison. **Trends in Food Science and Technology**, v. 88, n. April, p. 505–512, 2019.

WANG, F. et al. An efficient ultrasound-assisted extraction method of pea protein and its effect on protein functional properties and biological activities. **Lwt**, v. 127, n. September 2019, p. 109348, 2020.

WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition. World Health Organization Technical Report Series, 935. 2007. Disponível em <WHO_TRS_935_eng.pdf> acesso em 20/11/2020.

ZHAO, Q. et al. Effects of Spray Drying and Freeze Drying on the Properties of Protein Isolate from Rice Dreg Protein. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 7, p. 1759–1769, 2013.

ZHOU, C. et al. Concomitant Raman spectroscopy and dynamic light scattering for characterization of therapeutic proteins at high concentrations. **Analytical Biochemistry**, v. 472, p. 7–20, 2015.

CAPÍTULO II

**PHYSICAL AND TECHNO-FUNCTIONAL PROPERTIES OF A CARIOCA
BEAN PROTEIN CONCENTRATE AND FLOUR COMPARED TO COMMERCIAL
LEGUME INGREDIENTS FOR THE PLANT BASED MARKET**

**PROPRIEDADES FÍSICAS E TECHNO-FUNCIONAIS DA FARINHA E DO
CONCENTRADO PROTEICO DE FEIJÃO CARIOCA COMPARADA A
INGREDIENTES DE LEGUMINOSAS COMERCIAIS PARA O MERCADO PLANT
BASED**

**Physical and techno-functional properties of a common bean protein concentrate
compared to commercial legume ingredients for the plant based market**

Lucas de Paiva Gouvêa^a, Rodrigo Caldeira^a, Tatiana Lima de Azevedo^b; Melicia Galdeano^b;
Ilana Felberg^b; Janice Lima^b; Caroline Mellinger-Silva^{b*}

^a Departamento de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro, 23890-000, Brasil

^b Embrapa Agroindústria de Alimentos, Avenida das Américas, 29501 - Rio de Janeiro - RJ, 23020-470, Brasil.

* Corresponding author.

Avenida das Américas, 29.501 Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Tel.: +55 21 3622 9622; Fax: +55 21 3622 9713.

e-mail: caroline.mellinger@embrapa.br

ABSTRACT

The development of alternative sources of protein ingredients are in the hotspot as the plant-based food market has enormously grown worldwide in the last decade. The aim of the present study is to evaluate the physical and techno-functional properties of commercial protein ingredients from soybeans, peas and fava beans and compare them to an in-house developed flour and protein concentrate from carioca beans, the main bean variety produced in Brazil. Proximate composition, thermal, physical, morphological and technological properties were performed. All ingredients presented a V-type of curve for solubility with higher values above pH 7.0. Pea protein concentrate was the most thermal-stable ingredient (152.96 °C), while soy protein isolate presented the highest water holding capacity (4.52 g/g) and emulsifying capacity (19.39 m²/g), although the carioca bean concentrate was able to keep the emulsion stable for the longest period (21.26 min). Carioca bean concentrate had the smallest particle size, with more than 90% of them being smaller than 9.82 µm and it also stood up in terms of foaming capacity (111%), together with the fava bean concentrate (93%). All ingredients presented good foam stability up to 60 min. Fava bean concentrate presented the least gelling concentration (12%) and the highest oil holding capacity (2.84 g/g). Both carioca bean concentrate and flour presented good physical and techno-functional properties when compared to other commercial

ingredients and can be considered alternative sources of ingredients for the plant-based food market.

Keywords: : Carioca bean protein, legume protein; plant-based ingredients; technological properties.

1. INTRODUCTION

Over the last decade, a significant increase on the demand for alternative sources of proteins has been seen worldwide, mainly to be used on the formulation of the new plant-based food products. Soybean has long appeared as the main plant protein for vegan and vegetarian food products, as the grains naturally contain a high protein content and perform well in terms of techno-functional properties, together with a less prominent beanny flavor, common to legume species. However, despite the possibility of a high supply of soy protein, consumers from many countries have been currently restricting the use of soybeans and their ingredients on food products due to health concerns regarding to frequently discussed issues such as the presence of antinutritional factors, soy allergy, isoflavones, lecithins, GMO and so on (ANZANI et al., 2020; NOGUEIRA-DE-ALMEIDA et al. 2020; COOPER, 2019; HERMAN, 2003).

As a way of replacing soybeans, other grains gain visibility for protein production, and pulses are among the most explored ones. As a concept, pulse refers to “dry, non-green, low-lipid legume grains” (FAO, 2007) . Beans, peas, lentils and chickpeas are examples of pulses produced and consumed around the world and are becoming real sources of alternative protein to be supplied to the growing plant-based food market (SÁ et al. , 2020) .

Currently, pea is the most commercially worldwide-explored pulse source to produce flours, protein concentrates and isolates as food ingredients. Most of the plant-based ingredients used in Brazil are imported. Actions aimed at processing the beans in different food ingredients can promote an increase in consumption of beans in addition to increasing the profitability of the productive sector, generating value products to supply the intern market and also as a more lucrative option in exports. In addition, ingredients from fava beans and chickpeas are already being produced in a much smaller scale to in order to supply a growing demand that the pea can no longer accommodate by itself (CUI et al. , 2020; HALL AND MORARU, 2021; TANG et al. , 202 a).

The research for new pulses varieties for protein ingredients are highly on demand and Brazil may play an important role in cultivating them as well as producing new ingredients to

be incorporated into plant-based food products. Among the main cultivars, common beans are on the spot as Brazil is the largest common bean producer in the world and the third total bean producer (IBRAFE, 2022).

The suitability of protein ingredients to compose plant-based products depends directly on their techno-functional properties, such as water solubility, water and oil holding capacities, emulsifying and foaming capacities and gelling properties. Physical and morphological analysis can also inform the protein heat stability required for some food applications and how preserved the proteins were during their processing. In this sense, the aim of this study was to investigate these properties of an in-house common bean (carioca bean) flour and protein concentrate comparing them to commercial ingredients from soybeans, peas and fava bean. . In this study, we decided to compare carioca bean flour with protein ingredients as well because the international market sells pulses flour as an ingredient for plant-based products.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 MATERIAL

All the commercial proteins are from large world producers that have their ingredients available in Brazil. Six commercial protein ingredients were used from soybeans, peas and fava beans: (1) soy protein isolate (SPI), (2) soy protein concentrate (SPC); (3) pea protein isolate (PPI); (4) pea protein concentrate (PPC), (5) clean taste fava bean protein concentrate (FBPC), and (6) fava bean flour (FBF). Carioca bean flour (CBF) and carioca bean protein concentrate (CBPC) were produced in-house for the purpose of this study.

We bring a suggestion of the possible processing route to obtaining these ingredients based on industry reports, on the practical information on processing that the industries make and on the critical analysis of the results obtained in this study. These possible routes are: conventional wet extraction followed by spray-drying, for ingredients 1,2,3 and carioca bean protein concentrate; grinding followed by air classification and further processing for ingredients 4 and 5; and grinding for ingredients 6 and the carioca bean flour.

2.2 METHODS

2.2.1 Centesimal composition

The proximate composition of the ingredients was determined according to official AOAC methods (2010), as follows: Moisture (925.09 modified), ash (923.03), protein (001.11),

and fat with automatic extraction (Am 5-04) (AOCS, 2009). Total carbohydrate was calculated by difference.

2.2.2 Protein solubility

Protein solubility is a fundamental parameter for the food industry as it helps to direct the use of the protein ingredient (CUI et al., 2020). The percentage of soluble protein was determined as described by CUI et al (2020) with some modifications. The ingredients were solubilized in water (1% w/v) and the pH adjusted from 3 – 9 with NaOH or HCl. The solutions were kept under constant agitation on an orbital shaker for 30 min at room temperature, followed by centrifugation at 8000 rpm for 15 min. The supernatants were collected and the quantification of the soluble protein was determined by the colorimetric method described by BRADFORD (1976). To determine the percentage of soluble protein, a control solution (1% w/v) of each ingredient was used, solubilized in 0.1 M NaOH instead of water and kept under the same previous conditions. The amount of protein present in the supernatant of the control solution was considered to be 100% of the soluble protein (alkaline medium) and the percentage of each sample was determined by the equation:

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{\text{sample protein concentration}}{\text{protein concentration in the control sample}} \times 100$$

2.2.3 Particle size and apparent density

The particle size was determined using a MICROTRAC S3500 laser equipment (Microtrac Inc., Montgomery Ville, USA), by the light scattering technique. The analysis was carried out in duplicate and in three cycles, using distilled water as dispersant/carrier fluid (refractive index 1.33). For the particle, a refractive index of 1.50 was adopted. For the apparent density, each ingredient was passed through a 500 µm aperture sieve to remove lumps. The samples were carefully transferred a graduated cylinder and gently tapped on the bench 3 and the weight recorded on an analytical balance. The analysis was performed in quintuplicates and the apparent density was expressed in g/cm³ (GHRIBI et.al, 2015)

2.2.4 Morphology

SEM (scanning electron microscope) images were obtained using a Hitachi TM-3000 tabletop SEM (Hitachi, Japan) operated at 15 kV. Neither sputtering nor chemical fixation of

the samples were performed. The dried samples were fixed on the stubs using double-sided tape and the images were obtained at 1000x magnification.

2.2.5 Thermal properties

The temperature and enthalpy of protein denaturation were determined in a DSC Q200 calorimeter (TA Instruments, New Castle, USA), calibrated with indium. Briefly, 3 mg of protein samples were weighed into aluminum pans and water was added. The pans were hermetically sealed and heated in a calorimeter from 25 to 250 °C at a rate of 10 °C/min and a second run was performed at the same condition of temperature to verify the irreversible event of protein denaturation. An empty pan was used as a reference. Initial (T₀) and peak (T_p) denaturation temperatures and enthalpy (ΔH) were computed from the thermograms by the Universal analysis 2000 software. Three replicates were performed for each sample (BRISHTI et al., 2020).

2.2.6 TECHNOLOGICAL PROPERTIES

2.2.6.1 Water and oil holding capacity

The water (WHC) and oil (OHC) holding capacities were carried out as described by GUNDOGAN AND CAN KARACA (2020), with modifications. Approximately 0.01 g of each protein ingredient was weighed into microtubes and 1 ml of water or oil was added, followed by vortexing (Vixar-Vortex Mixer EC) for 1 min. After homogenization, they were left to rest for 30 min at room temperature and centrifuged at 12000 rpm for 20 min (Eppendorf AG 22331 Hamburg Centrifuge, series 5452 XM 344604). The supernatant was discarded and the excess on the lid and edge of the tube was removed with the aid of a paper towel. The weight was recorded and the water and oil holding capacity were defined by the following equation:

$$\text{WHC or OHC (g/g of ingredient)} = \frac{M_2 - M_1}{M_0}$$

Where: M₁ is the mass of the microtube and the dry sample, M₂ is the mass of the tube with the sample after decanting the oil or water, and M₀ is the initial mass of the sample.

2.2.6.2 Emulsion activity index (EAI) and Emulsion stability index (ESI)

The emulsifying activity index was determined according to WANI et al. (2015) with some modifications. 20 mL of soybean oil was added to 60 mL of protein solution (0.5% w/v) with pH adjusted to 7 using 0.1 M NaOH or 0.1 M HCl. Then, the mixture was mechanically

homogenized at 9500 rpm for 1 min, using an Ultra-Turrax (T25 basic, IKA, Werke, Germany) with a S 25 KV-18 probe. 50 µL of the emulsion was withdrawn between the middle and the bottom of the beaker and added of 5 mL of dodecyl -sodium sulfate (SDS) (0.1% w/v) at times 0 and 10 min after homogenization. Absorbances were determined at 500 nm with a spectrophotometer (Biospectro, USA) at times 0 (A0) and 10 min (A10) after emulsion formation. The emulsifying activity index (EAI) and the emulsion stability index (ESI) were calculated using the following equations:

$$\text{EAI (m}^2\text{/g)} = 2 \times 2.303 \times A_0 \times \text{DF} / c \times \theta \times 10000$$

$$\text{ESI (min)} = (A_0 / (A_0 - A_{10})) \times 10$$

Where: DF is the dilution factor (100), c is the initial concentration of the protein solution (g/mL), θ is the oily volume of the emulsion (0.25), A0 and A10 are the absorbances of the emulsion at times 0 min and 10 min, respectively.

2.2.6.3 Foaming capacity and stability

Foaming capacity (FC) and foam stability (FS) were evaluated according to GHRIBI et al. (2015) with some modifications. Protein solutions of 2.5% w/v were prepared and adjusted to pH 7 using 0.1 M NaOH or 0.1 M HCl. 15 mL were transferred to a 100 mL beaker and homogenized for 2 min using an ultra-turrax . (Probe S 25 KV-18 G), following the rotation/time ramp of 6500 rpm/30s, 9500 rpm/30s and 13500 rpm/60s. The foam formed was carefully transferred to a 50 ml beaker with the aid of a spatula. FC and FS were calculated according to the following equations:

$$\text{FC (\%)} = ((V_1 - V_0) / V_0) \times 100$$

$$\text{FS (\%)} = (V_2 / V_0) \times 100$$

Where, V1 is the total volume after stirring, V0 is the initial volume before stirring and V2 is the total volume after the times of 10, 30 and 60 min.

2.2.6.4 Least gelling concentration (LGC)

The lowest gel-forming concentration of the ingredients was determined as described by BOYE et al. (2010). Suspensions varying in concentration (2 to 20%, w/v) were prepared into 5 mL of distilled water and transferred to sealed glass test tubes. The tubes were immersed in a water bath (Ultrathermostatic SL 152-Solab) at 100°C for 1h, followed by immediately cooling in an ice bath and kept overnight at 4°C. The samples were then poured and divided into 3 classifications, regarding gel formation: (1) No gel formation, when the solution was

liquid and flowed with no resistance, (2) weak gel, when the solution flowed with some resistance, (3) gel formation, when the tube was inverted and the solution did not flow. The minimum concentration for gel formation was defined as the lowest concentration to form a firm gel in all the three replicates from the same sample.

2.2.7 Statistical analysis

All measurements were performed in triplicate. ANOVA and Tukey test were used to identify differences between means in composition, physicochemical and functional properties using the STATISTICA software, version 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Statistical significance level was accepted at 5%.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Physicochemical composition of ingredients

The proximate composition of the ingredients is shown in Table 1. The data are on a dry basis in order to enable the comparison with what is provided by the companies' technical sheet. All commercial samples, with the exception of fava bean protein concentrate (FBPC), showed a lower protein content than the provided amount on the technical sheets. Pea protein concentrate (PPC) had the highest difference in protein and moisture. The carioca bean protein concentrate (CBPC), an in house-produced ingredient, did not differ from the protein content of the commercial pea isolate and was higher than the content of the other ingredients, with the exception of soy isolate. The physicochemical characteristics of CBPC were similar to those of protein isolates from other bean species BRISHTI et al., 2020; GUNDOGAN AND KARACA, 2020) and higher than other pulses found in the literature (BOYE et al., 2010).

Table 1. Proximate composition of the ingredients.

Samples	Proximate composition (% , dry basis)				
	Protein	Lipid	Carbohydrate	Moisture	Ash
SPI	85.44 ± 2.60 A	0.34 ± 0.12 D	9.88 ± 2.75 G	5.49 ± 0.04 F	4.35 ± 0.11 C
SPC	69.38 ± 0.76 C	0.83 ± 0.11 D	23.64 ± 0.80 E	5.14 ± 0.10 G	6.15 ± 0.07 A
PPI	79.92 ± 0.83 B	0.49 ± 0.06 D	14.98 ± 0.77 F	7.80 ± 0.04 E	4.62 ± 0.03 C
PPC	50.30 ± 0.58 E	3.53 ± 0.27 A	40.28 ± 0.45 C	10.12 ± 0.04 B	5.89 ± 0.08 B
CBPC	79.75 ± 0.66 B	2.67 ± 0.32 B	15.83 ± 0.64 F	3.71 ± 0.21 H	1.77 ± 0.03 E
CBF	21.83 ± 0.28 G	1.78 ± 0.11 C	72.42 ± 0.34 A	12.88 ± 0.06 A	3.96 ± 0.22 D

FBPC	58.11 ± 0.24 D	2.62 ± 0.26 B	33.34 ± 0.54 D	8.19 ± 0.18 D	5.93 ± 0.04 B
FBF	31.26 ± 0.16 F	0.72 ± 0.08 D	64.34 ± 0.16 B	9.31 ± 0.05 C	3.68 ± 0.02 D

Different letters, in the same column, mean significant difference between samples (Tukey test, $p \leq 0.05$). Legend: SPI: – soy protein isolate; SPC: soy protein concentrate; PPI: pea protein isolate; PPC: pea protein concentrate; CBPC: carioca bean protein concentrate; CBF: carioca bean flour; FBPC: fava bean protein concentrate; FBF: fava bean flour.

3.2 Solubility

All ingredients showed a typical V-shape solubility curve for proteins (Figure 1) with the lowest solubility being close to the isoelectric points and higher in alkaline medium (pH 7-9). Fava bean flour (FBF) (78.22 %), PPC (73.76%) and CBF (56.46%) had the highest amount of soluble protein at pH 7, followed by FBPC (52.84%) , CBPC (30,82%), SCP (22.57%), SPI (19.33 %) and PPI (17.20%). At pH 8, CBPC presented a high solubility increase to 72.52%, pairing with PPC (78.98 %) and FBF (85.18 %).

Commercial pea and soybean protein isolates showed the worst solubility performance, with maximum solubility of 26% at pH 9. During the production of protein isolates and concentrates, the extraction and drying processes can positively or negatively affect the conformation of the protein and consequently its properties. SHAND et al. (2007) and TANGER; ENGEL; KULOZIK (2020) also evaluated the solubility of commercial pea and soybean isolates and verified a similar performance to that found in this study and associated this low solubility with possible denaturation and aggregation of the protein during drying. JIANG; CHEN; XIONG (2009) found that the extraction of soy protein at pH 11 changes its conformation, decreasing solubility but improving other technological properties such as water and oil holding capacity.

We can also see the effect of the extraction on the solubility of the protein, since the protein present in both carioca bean and fava beans flours showed greater solubility than their respective concentrates. Showing that the process of obtaining and concentration affected the structure of proteins. The high solubility of a protein ingredient directs its use for the production of liquid foods, such as plant extracts that simulate the properties of milk or beverages. In this sense, fava bean flour, pea concentrate and carioca bean flour showed higher soluble proteins at pH 7.0, being more suitable for these foods.

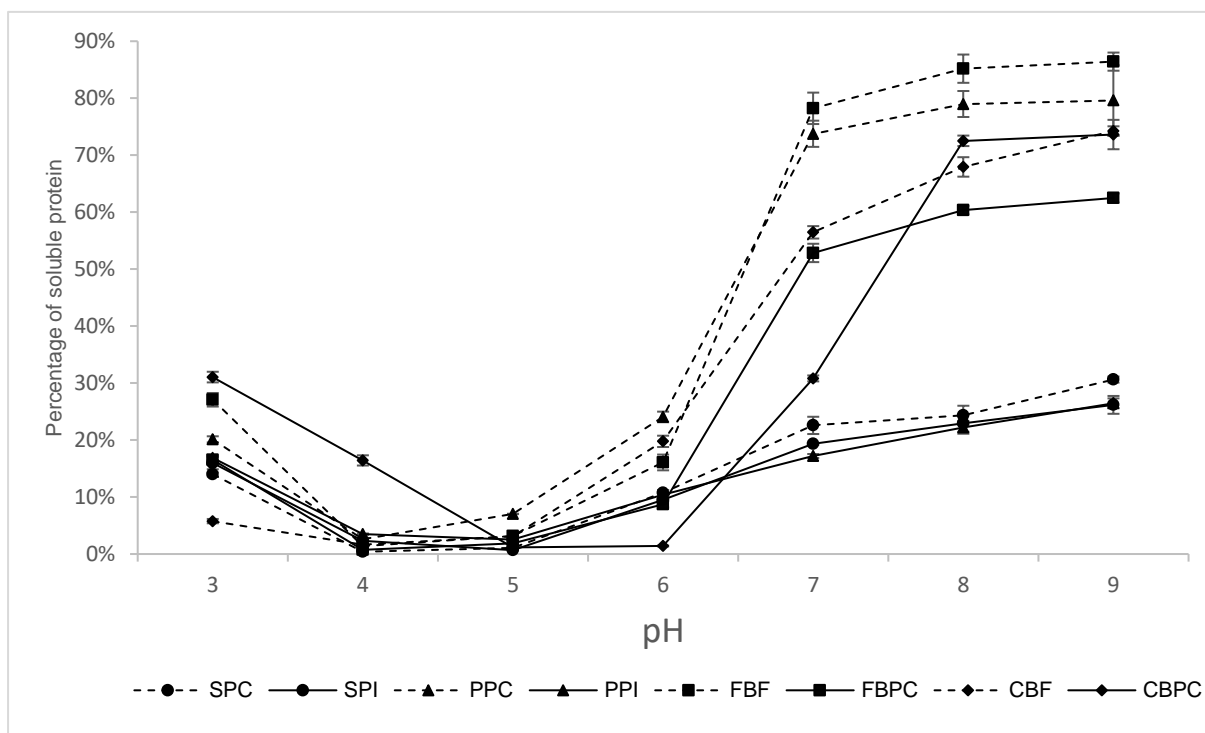


Figure. 1. Solubility curve of the protein from the ingredients.

3.3 Particle size and apparent density

Particle size is an important parameter that influences some properties of ingredients, including their visual acceptance. The smaller the particle size, the finer is the ingredient powder and clearer the product is in visual aspects (SHEN et al. , 2021). The decrease in particle diameter increases some techno-functional properties, such as water absorption and foam stability, due to an increase in surface area per volume unit, improving the characteristics of the final product.

The samples diameter values are listed in Table 2. D (4.3) is the equivalent volume-mean diameter and represents the mean particle size. D10, D50 and D90 values represent the diameters at 10%, 50% and 90% cumulative volume, respectively.

The samples showed significantly different particle sizes among themselves. These differences can be attributed to the different processes used to obtain the protein ingredients (TANGER; ENGEL; KULOZIK, 2020). CBPC had the smallest particle size (5.72 μm), with 90% of the particles being smaller than 9.82 μm . A possible explanation would be the use of spray dryer as a drying method, making it possible to obtain smaller and more homogeneous particles (BRISHTI et al., 2020). SHEN, TANG AND LI (2021) and JOSHI et al. (2011) reported a similar average particle size for quinoa protein isolate (10 μm) and lentil protein isolate (6.7 μm) using spray dryer. PPC and FBPC were similar in size to pea and fava bean

concentrates, obtained by air classification and isoelectric precipitation (REMPEL et al. , 2019; VOGELSANG-O'DWYER et al. , 2020). Even though, PPI had the largest particle diameter, it is still a fine powder with 90% of the particles smaller than 240 μm .

Table 2. Particle size, apparent density and thermal properties of protein ingredients

Properties	Samples							
	SPI	SPC	PPI	PPC	FBPC	FBF	CBPC	CBF
Apparent Density (g/cm³)	0.3775 ± 0.01 C	0.30 83 ± 0.02 D	0.4544 ± 0.01 A	0.2191 ± 0.01 E	0.3287 ± 0.01 D	0.4200 ± 0.01 B	0.3045 ± 0.01 D	0.4359 ± 0.02 AB
D(4.3) (μm)	68.26 ± 3.56 C	66.35 ± 2.09 C	138.10 ± 7.10 A	15.85 ± 1.03 E	20.63 ± 1.00 DE	26.88 ± 1.16 D	5.72 ± 0.09 F	88.37 ± 4.57 B
D10 (μm)	24.64 ± 1.10 B	7.25 ± 0.27 D	38.92 ± 2.73 A	3.33 ± 0.10 EF	3.38 ± 0.04 EF	5.24 ± 0.09 DE	2.04 ± 0.15 F	18.7 ± 0.85 C
D50 (μm)	57.02 ± 2.88 B	52.31 ± 2.02 B	135.00 ± 7.20 A	12.65 ± 0.35 E	13.62 ± 0.36 E	21.87 ± 0.43 D	5.23 ± 0.08 F	45.97 ± 3.61 C
D90 (μm)	124.50 ± 7.00 D	145.00 ± 3.90 C	240.1 0 ± 9.40 A	29.21 ± 1.80 F	46.10 ± 2.72 E	51.65 ± 2.60 E	9.82 ± 0.05 G	216.80 ± 11.10 B
T_{onset} (°C)	108.59 ± 5.24 A	104.93 ± 0.18 A	100.93 ± 9.10 A	112.03 ± 0.71 A	107.46 ± 3.26 A	81.95 ± 4.63 B	111.17 ± 3.06 A	105.92 ± 3.01 A
T_{peak} (°C)	131.71 ± 6.78 AB	127.63 ± 1.77 AB	127.58 ± 8.61 AB	152.96 ± 0.49 AB	139.80 ± 10.46 AB	119.52 ± 2.06 B	147.24 ± 14.32 AB	122.38 ± 2.59 B
ΔH (J/g)	106.33 ± 23.86 C	127.50 ± 0.99 BC	145.50 ± 11.17 BC	106.55 ± 0.49 C	147.09 ± 22.32 BC	242.70 ± 5.37 A	138.30 ± 22.06 BC	178.25 ± 21.71 AB

Different letters in the same line mean significant difference between samples (Tukey test, $p \leq 0.05$).

The apparent density is also present on Table 2. The apparent density (g cm^3) is the density of the material including closed and inaccessible pores. It is given by the ratio between the sample mass and volume of the solid material, including the volume of internal pores (ROUQUEROL *et al.*, 1994). PPI and CBF presented the highest apparent densities among the ingredients, which means that they occupy less space than the other ingredients. A correlation can be made with the particle size where PPI and BBF have the largest mean particle size ($D_{4,3}$) and the PPC and CBPC samples have the smallest mean particle size and apparent density.

Even the CBPC sample having the smallest particle size, PPC has a higher lipid content, which may explain its density being lower than the other ingredients (CHANDI AND SOGI, 2007; DRAKOS *et al.*, 2017). The difference between the density of flours and their respective concentrates or isolates is due to the greater presence of starch that has a greater density than the protein molecules (MEGHA AND GRANT, 1986). Low bulk density is required for ingredients intended for the formulation of weaning foods, in this sense, PPC and CBPC could be the most suitable for these types of foods (CHANDI AND SOGI, 2007)

3.4 Morphology

To evaluate the morphology of the samples, scanning electron microscopy (SEM) analysis was performed and the micrographs can be seen in Figure 2. The spherical shape of protein corpuscles is characteristic of an important number of non-polar residues on their surface (DAMODARAN, 1996). However, although it is possible to verify the presence of these protein bodies, the SPI, SPC, PPI and CBPC samples showed particles with shrinkage and folds between them (red arrows) indicating that these ingredients were spray-dried (BRISHTI *et al.*, 2020). PPC and FBPC samples presented a shapeless structure, not finding anything similar in the literature for comparison. We hypothesize that both concentrates were subjected to some processing during or after drying since the same company provided both samples. The flours (FBF and CBF) showed intact starch granules, cell wall material, and small crystals of approximately $3 \mu\text{m}$ adhered to the starch granules that are proteins bodies (PELGROM *et al.*, 2015). The carioca bean starch granules had an oval shape and approximate size of $30 \mu\text{m}$ and the fava bean starch granules had an approximate size of $25 \mu\text{m}$, in agreement with the findings of CHOE *et al.* (2022) and VOGELSANG-O'DWYER *et al.* (2020).

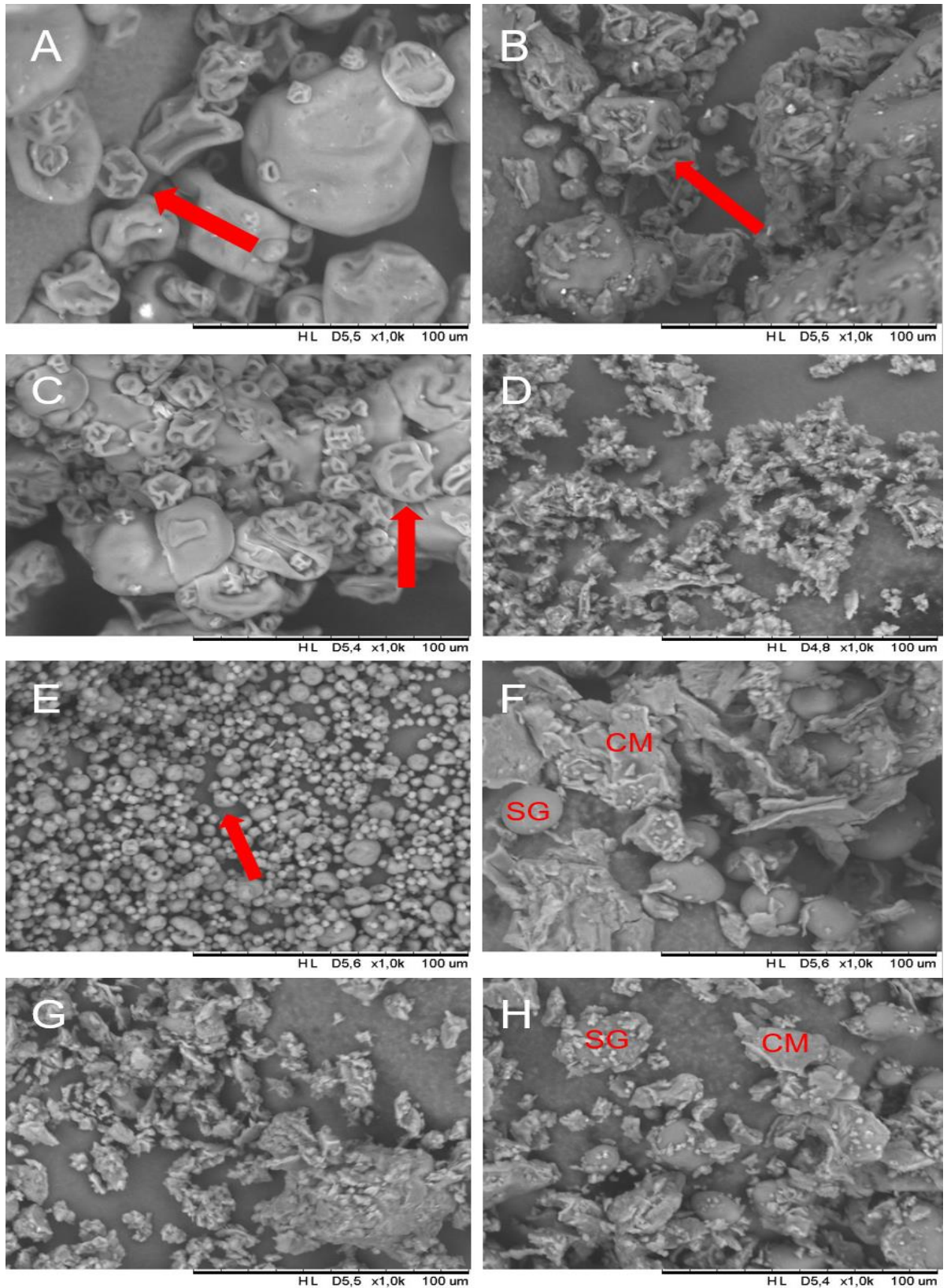


Figure 2. SEM micrographs of the ingredients. (A) SPI; (B) SPC; (C) PPI; (D) PPC; (E) CBPC; (F) CBF; (G) FBBC; (H) FBF. Arrows indicate typical spray-dry particles. SG – starch granulate; CM-cellular material.

3.5 Thermal properties

Differential Scanning Calorimetry (DSC) has become an efficient analysis for determining the thermal stability of different proteins (RUI et al., 2011). With this analysis, it is possible to know the drasticity of the processing to which the samples are submitted to, since protein denaturation is an irreversible event and would not be detected in the thermogram (RICCI et al., 2018). The denaturation temperature is represented by the peak temperature of the event, the higher the temperature is, the greater is the thermal resistance of the protein. Enthalpy (ΔH), calculated from the area below the transition peak, correlates with the extension of the ordered secondary structure of a protein (MARTINEZ AND ANÓN, 1996). The event onset temperature (T_{onset}), peak temperature (t_{peak}) and enthalpy (ΔH) are presented in Table 2.

All samples showed two endothermic peaks that were related to the denaturation of the protein. The first peak showing the major degradation of the protein. When the thermogram presents two peaks, it means that the protein subunits have distinct transitions (RUI et al., 2011). For the first peak, FBF and CBF had the lowest denaturation temperatures (119.52 °C and 122.38 °C, respectively). The other ingredients ranged between 127 °C and 147 °C and PPC had the highest protein denaturation temperature (152.96 °C), showing the highest thermal stability among the other ingredients. The ΔH varied between 106.33 and 242.70 J/g, with FBF having the highest enthalpy and PPC the lowest result. ΔH reflects the energy required to denature the protein (BRISHTI et al. , 2020). This significant difference can be explained by the fact that the protein presented in the flour is in its native state, without having gone through a more severe process that could denature it. OSEN et al. (2014) and TANG et al. (2021) evaluated commercial pea and soybean protein isolates in their experiments, respectively, and both found that commercial samples were completely denatured and did not show any peak in the DSC curve. Our results are lower than those reported by RICCI et al. (2018) and TANG et al. (2021); however, similar to GUNDOGAN AND KARACA (2020) and KUDRE; BENJAKUL; KISHIMURA (2013). The difference in results is a consequence of the different methods used to obtain each ingredient individually.

3.6 TECHNOLOGICAL PROPERTIES

3.6.1 Water and oil holding capacity

The water holding capacity (Figure 3) ranged between 1.34 and 4.52 g water/g sample. PPC sample had the lowest absorption and SPI had the highest water absorption, respectively. Oil holding capacity ranged between 1.22 and 2.84 g oil/g sample with CBPC having the lowest result and FBPC having the highest one. The WHC and OHC values of the ingredients are fundamental for directing their use, as they influence food production in general and, especially, in meat analogue products (JOSEPH, 1997).

The ingredients presented a behavior similar to that reported by MEGHA AND GRANT (1986) where the isolates showed a greater absorption of water than their respective concentrates, except for fava bean and carioca bean ingredients regarding WHC. A possible explanation could be the presence of carbohydrates in the flours that help both in the absorption of water and oil (HOJILLA-EVANGELISTA *et al.* , 2018). The high water absorption of soy and pea isolates can be explained by the partial protein denaturation, as represented by the low solubility. The partial denaturation of the protein breaks weaker interactions and exposes more hydrophilic groups that interact with water, thus increasing its ability to retain water, which is desired in some applications (BÜHLER *et al.* , 2020).

The carioca bean concentrate showed low water and oil retention in relation to the other ingredients. A possible explanation would be the use of the Spray dryer. In the literature, the use of spray drying can affect the particles by forming a hydrophobic layer on them, making it difficult for them to interact with the water (BRISHTI *et al.* , 2020) and, as the concentrate had the smallest particle sizes and consequently has a larger area of exposure, we hypothesize that this effect may have been more drastic. In general, the ingredients evaluated in this study showed similar values to those found in the literature for both WHC and OHC (BOYE *et al.* , 2010; BÜHLER *et al.* , 2020; GUNDOGAN AND KARACA, 2020; TANG *et al.* , 2021).

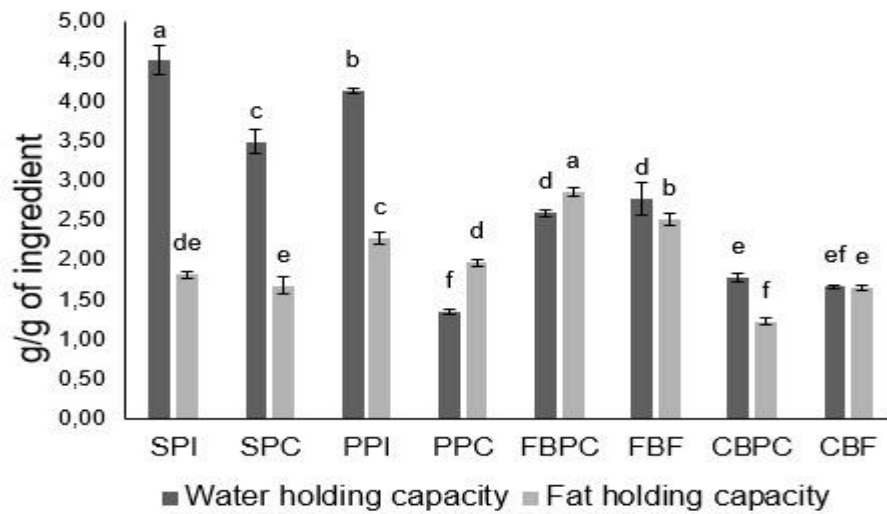


Figure 3. Water and oil holding capacities of the protein ingredients. Different letters mean significant difference between samples ($p < 0.05$).

3.6.2 Emulsion activity index and emulsion stability index

The EAI of protein ingredients are showed in Figure 4. The values ranged from 14.03 m^2/g for FBPC to 19.39 m^2/g for SPI. For ESI, the values ranged from 12.59 min for FBF to 21.26 min for CBPC, being the sample with the highest stability. CBPC showed an EAI (18.87 m^2/g) similar to other isolates of different bean species such as Bombay, Hinis and Gembos (GUNDOGAN AND KARACA, 2020) and higher than other isolates from different pulses such as lentils, broad beans and peas (BOYE et al. , 2010; HALL AND MORARU, 2021). The soybean isolate, pea concentrate and carioca bean concentrate showed the highest emulsifying capacities and can be used for the production of solid and semi-solid foods, such as hamburgers and sausages and other meat analogues.

Even though CBPC presented the lowest water and oil absorption compared to the other ingredients, its EAI did not significantly differ from SPI and PPI (18.21 m^2/g). This is due to the emulsifying capacity to be more correlated with the solubility, surface charge and molecular structure of the protein and with the protein-protein, protein-oil and protein-water interaction than just water and oil absorption or retention capacities (BOYE et al. , 2010; BRISHTI et al. , 2020; GUNDOGAN AND KARACA, 2020; SHEN et al. , 2021; TANG et al. , 2021). As the carioca bean concentrate exhibited a good emulsifying capacity, we believe that the particle size played a significant role in its stability by increasing the contact surface.

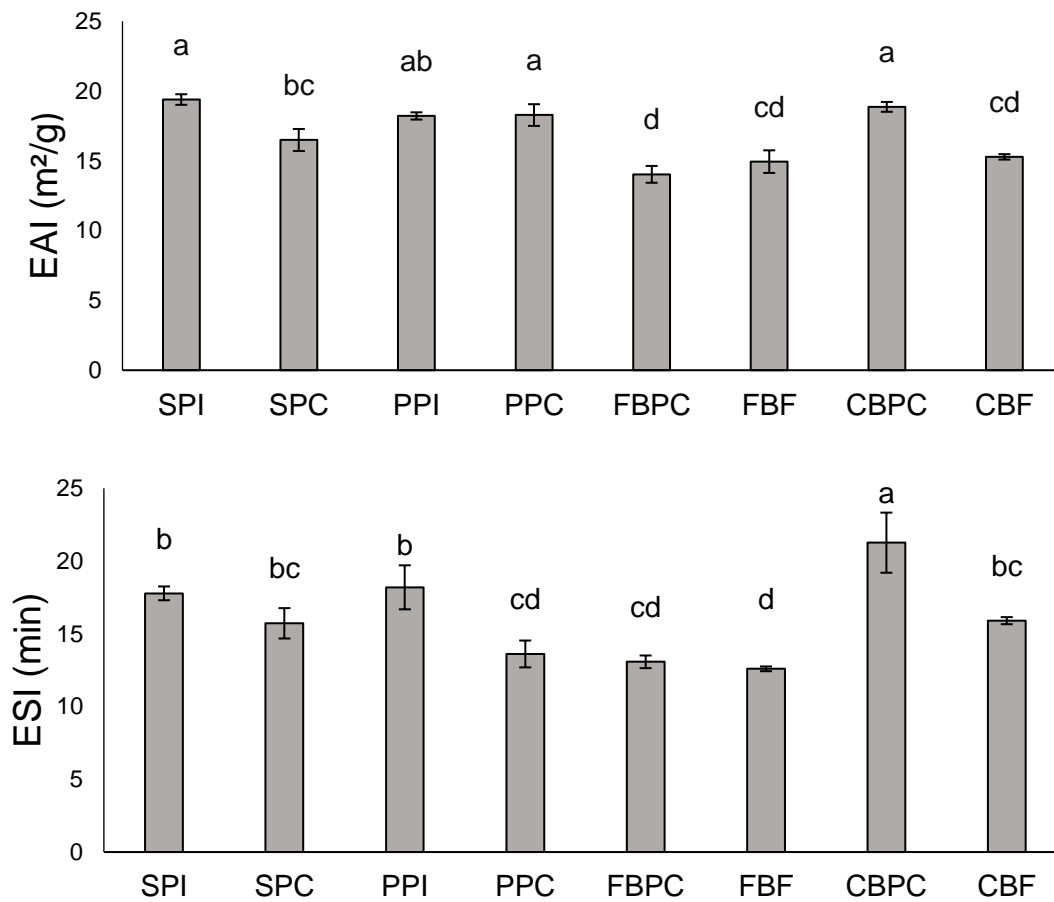


Figure 4. (A) Emulsion activity index and (B) Emulsion stability of the protein ingredients. Different letters mean significant difference between samples ($p < 0.05$).

3.6.3 Foaming capacity and foaming stability

The foaming capacity (FC) and stability (FS) of the ingredients are presented in Figure 5. CBF had the highest foaming capacity (111.11%) along with the PPC (97.8%). The values for the other ingredients varied from 73.33% (CBPC) to 93.33% (FBF). After 60 min, PPI, FBPC, FBF, CBPC and CBF kept approximately 95% of the initially formed foam intact, showing excellent stability. In contrast, SPI, PPC and SPC had a significant loss of their initial foam, less than 75% of the foam was maintained for SPC and less than 65% for SPI and PPC. Even though the CBPC had the lowest foam formation initially, it remained very stable. Good foam stability is ideal for food products such as mousses, toppings and confectionery in general. In this point of view, all ingredients, with the exception of soy isolate and pea concentrate, showed good foam stability up to 60 min, thus being ideal for these types of products.

Foaming properties, like emulsification, are dependent on proteins solubility as well as other components such as carbohydrates. The samples with the most soluble protein, which

were pea concentrate, fava bean flour and carioca bean flour, had the highest foaming capacity . Globular proteins, together with carbohydrates, form an interfacial film that keeps air bubbles in suspension and reduces their coalescence rate (MA et al. , 2011). The foaming capacity and stability results obtained in this study were similar to those found in the literature (BOYE et al. , 2010; MA et al. , 2011; TONTUL et al. , 2018; CUI et al. , 2020; GUNDOGAN AND KARACA, 2020; WANG et al. , 2020; SHEN et al. , 2021).

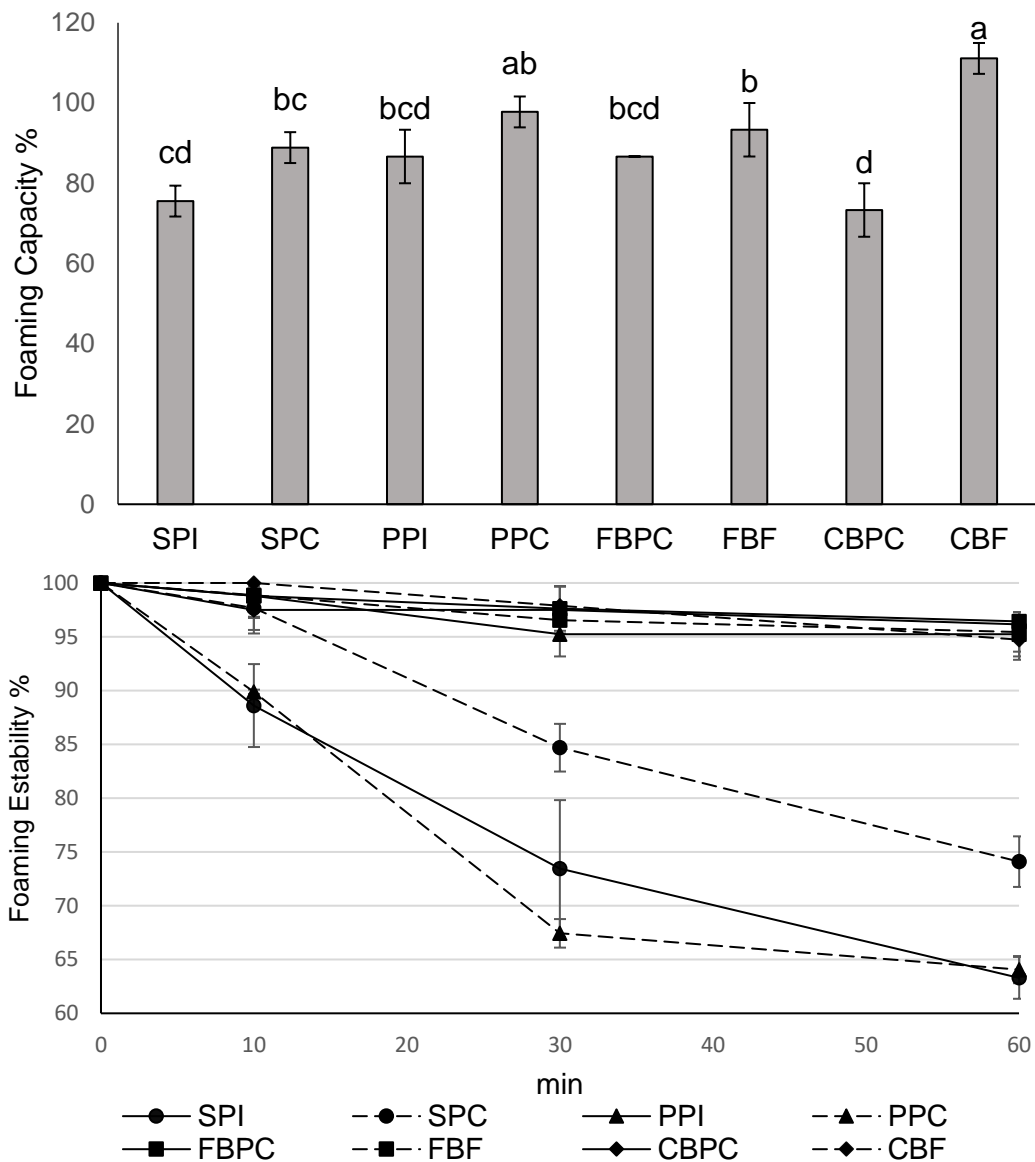


Figure 5. (A) Foaming Capacity and (B) Foaming stability of the protein ingredients. Different letters mean significant difference between samples ($p < 0.05$).

3.6.4 Least gelling concentration

Table 3 presents the results obtained for the least gel formation of the tested ingredients. .A, B and C are the replicates. To form a gel, it is necessary that the protein is denatured, in whole or in part, and its reorganization to form a three-dimensional network (PAPALAMPROU et al., 2009). FBPC had the best gelling properties since the minimum concentration required for gel formation was 12%. SPI, SPC, PPC and CBF showed similar gelling properties and formed a firm gel with 14%, followed by PPI (18%). CBPC showed a firm gel only at the highest concentration (20%), and FBF did not present firm gel formation at any concentration, only a weak gel at the highest concentration. MA et al. (2011) in their studies with flour from different pulses observed that flours from pulses tend to form a gel between 10-14%, which was similar to CBF.

This difference in concentration for carioca bean concentrate can be related to protein subunits. In the literature, it was found that the carioca bean protein subunits do not have a good gel formation (TAN et al., 2014). So this concentration of carioca bean flour forming gel with 14% is more related to the carbohydrates present. Even finding this data in the literature, we cannot make this conclusion because we did not perform more specific analyzes such as SDS-PAGE to better understand this behavior.

A possible explanation for fava bean flour not forming a firm gel is physical competition for water between protein gelation and starch gelatinization. Legume flours contain high protein and starch contents and the gelling property of the flours is related to the interaction of these components with each other. This competition does not form a strong enough structure showing that the interaction between its components has a significant role in this functional property (KAUSHAL et al., 2012).

Table 3. Least gelling concentration for the protein ingredients

Ingredients	Concentrations																													
	2%			4%			6%			8%			10%			12%			14%			16%			18%			20%		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
SPI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SPC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PPI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PPC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FBPC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FBF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBPC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

"-" Did not form gel; "±" Weak gel; "+" Firm gel.

4. CONCLUSION

Thermal, morphological, physical, and technological properties of different commercial ingredients and possible new ingredients were studied. The technological properties varied significantly between them, possibly due to the way in which they were obtained but none of them proved to be an impediment to the application of these ingredients in plant-based products. The carioca bean protein concentrate had the best performance as an emulsifier and good foam stability. Considering the particularity of each ingredient, the results presented here suggest that the processing of carioca bean grain in protein concentrate has great potential for the plant-based market and it could help national industries that need to import soybean and pea protein isolate and concentrate for the development of protein products of plant origin. We encourage further research to be carried out to improve the characteristics of the carioca bean protein concentrate in order to expand their applications such as the effect of using ultrasound, different drying methods and high-pressure as examples. Overall, this study provides information about physical, and technological properties that can be used to optimize the direct application of these ingredients by the food industry.

5. REFERENCES

- ANZANI, C. et al. Optimizing the use of proteins from rich meat co-products and non-meat alternatives: Nutritional, technological and allergenicity challenges. **Food Research International** , vol. 137, no. July, p. 109575, 2020.
- AOAC Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis 18 ed., 3rd rev, 2010.
- AOCS American Oil Chemist's Society, Official methods and recommended practices. Champaign: American Oil Chemists' Society, 2009.
- BRADFORD, MM A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, pp.248-254, 1976 .
- ANGELIS, D. DE, PASQUALONE, A., ALLEGRETTA, I., PORFIDO, C., TERZANO, R., SQUEO, G. & SUMMO, C. (2021). Antinutritional factors, mineral

composition and functional properties of dry fractionated flours as influenced by the type of pulse. **Heliyon** , 7 .

BOYE, JI, AKSAY, S., ROUFIK, S., RIBÉREAU, S., MONDOR, M., FARNWORTH, E. & RAJAMOHAMED, SH (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. **Food Research International** , 43 , 537–546.

BRISHTI, FH, CHAY, SY, MUHAMMAD, K., ISMAIL-FITRY, MR, ZAREI, M., KARTHIKEYAN, S. & SAARI, N. (2020). Effects of drying techniques on the physicochemical, functional, thermal, structural and rheological properties of mung bean (*Vigna radiata*) protein isolate powder. **Food Research International** , 138 , 109783.

BÜHLER, JM, DEKKERS, BL, BRUINS, ME & GOOT, AJ VAN DER. (2020). Modifying faba bean protein concentrate using dry heat to increase water holding capacity. **Foods** , 9 , 1–16.

CHANDI, G.K. & Sogi, D.S. (2007). Functional properties of rice bran protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, 79, 592–597.

CHOE, U. et al. Modification of physicochemical, functional properties, and digestibility of macronutrients in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours by different thermally treated whole seeds. **Food Chemistry**, v. 382, n. October 2021, p. 132570, 2022.

COOPER, A.R. Reflections| Volume 112, ISSUE 5, P825-826, November 01, 2019. To eat soy or to not eat soy: the on going look at phytoestrogens and fertility. October 01, 2019.

CUI, L., BANDILLO, N., WANG, Y., OHM, JB, CHEN, B. & RAO, J. (2020). Functionality and structure of yellow pea protein isolate as affected by cultivars and extraction pH. **Food Hydrocolloids** , 108 , 106008.

DAMODARAN, S. in: O. R. Fennema (Ed.), **Food Chemistry**, 3rd Edition, Marcel Dekker, Basel, NY, 1996, p. 321.

DE Almeida, C. A.; Ferraz, I.S, Ued, F.V; Almeida, A.C. F.; Ciampo, L. (2020). Impact of soy consumption on human health: integrative review. **Brazilian Journal of Food Technology**. 23.10.1590/1981-6723.12919.

DRAKOS, A., Kyriakakis, G., Evageliou, V., Protonotariou, S., Mandala, I. & Ritzoulis, C. (2017). Influence of jet milling and particle size on the composition, physicochemical and mechanical properties of barley and rye flours. **Food Chemistry**, 215, 326–332.

ELIOT M. Herman, Genetically modified soybeans and food allergies, **Journal of Experimental Botany**, Volume 54, Issue 386, 1 May 2003, Pages 1317–1319.

- FAO. (2007). CEREALS, PULSES, VEGETABLES AND VEGETABLE PROTEINS . CODEX Alimentarius.
- GHRIBI, AM, GAFSI, IM, BLECKER, C., DANTHINE, S., ATTIA, H. & BESBES, S. (2015). Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates. **Journal of Food Engineering** , 165 , 179–188.
- GUNDOGAN, R. & CAN KARACA, A. (2020). Physicochemical and functional properties of proteins isolated from local beans of Turkey. **Lwt** , 130 , 109609.
- HALL, AE & MORARU, CI (2021). structure and function of pea , lentil and faba bean proteins treated by high pressure processing and heat treatment. **LWT** , 152 , 112349.
- HOJILLA-EVANGELISTA, MP, SUTIVISEDSEK, N., EVANGELISTA, RL, CHENG, HN & BISWAS, A. (2018). Composition and Functional Properties of Saline-Soluble Protein Concentrates Prepared from Four Common Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society** , 95 , 1001–1012.
- IBRAFE. Instituto Brasileiro de Feijões e Pulses. Revista IBRAFE. **Revista IBRAFE**. 4º edição. 2022. Disponível em: < https://www.ibrafe.org/wp-content/uploads/2018/09/FF_revista_ibrafe_22_DIGITAL.pdf>
- JIANG, J., CHEN, J. & XIONG, YL (2009). Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , 57 , 7576–7583.
- JOSEPH, FZ (1997). chapter 2 water holding capacity of proteins. functionality of Proteins in Food , 76–133.
- JOSHI, M., ADHIKARI, B., ALDRED, P., PANOZZO, JF & KASAPIS, S. (2011). Physicochemical and functional properties of lentil protein isolates prepared by different drying methods. **Food Chemistry** , 129 , 1513–1522.
- KAUSHAL, P., Kumar, V. & Sharma, H.K. (2012). Comparative study of physicochemical, functional, antinutritional and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta*), rice (*Oryza sativa*) flour, pigeonpea (*Cajanus cajan*) flour and their blends. **LWT - Food Science and Technology**, 48, 59–68.
- KUDRE, TG, BENJAKUL, S. & KISHIMURA, H. (2013). comparative study on chemical compositions and properties of protein isolates from mung bean, black bean and bambara groundnut. **Journal of the Science of Food and Agriculture** , 93 , 2429–2436.

LIU, C., WANG, X., MA, H., ZHANG, Z., GAO, W. & XIAO, L. (2008). Functional properties of protein isolates from soybeans stored under various conditions. **Food Chemistry** , 111 , 29–37.

MARTÍNEZ, E. N., & AÑÓN, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44(9), 2523-2530.

MA, Z., BOYE, JI, SIMPSON, BK, PRASHER, SO, MONPETIT, D. & MALCOLMSON, L. (2011). Thermal processing effects on the functional properties and microstructure of lentil, chickpea, and pea flours. **Food Research International** , 44 , 2534–2544.

MEGHA, AV & GRANT, DR (1986). Effect of Heat on the Functional Properties of Pea Flour and Pea Protein Concentrate. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal** , 19 , 174–180.

NGOH, YY, CHOI, SB & GAN, CY (2017). The potential roles of Pinto bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto) bioactive peptides in regulating physiological functions: Protease activating, lipase inhibiting and bile acid binding activities. **Journal of Functional Foods** , 33 , 67–75.

OSEN, R., TOELSTED, S., WILD, F., EISNER, P. & SCHWEIGGERT-WEISZ, U. (2014). High moisture extrusion cooking of pea protein isolates: Raw material characteristics, extruder responses, and texture properties. **Journal of Food Engineering** , 127 , 67–74.

PAPALAMPROU, EM, DOXASTAKIS, GI, BILIADERIS, CG & KIOSSEOGLU, V. (2009). Influence of preparation methods on physicochemical and gelation properties of chickpea protein isolates. **Food Hydrocolloids** , 23 , 337–343.

PELGROM, PJM, BOOM, RM & SCHUTYSER, MAI (2015). Method Development to Increase Protein Enrichment During Dry Fractionation of Starch-Rich Vegetables. **Food and Bioprocess Technology** , 8 , 1495–1502.

REMPEL, C., GENG, X. & ZHANG, Y. (2019). Industrial scale preparation of pea flour fractions with enhanced nutritive composition by dry fractionation. **Food Chemistry** , 276 , 119–128.

RICCI, L., UMILTÀ, E., RIGHETTI, MC, MESSINA, T., ZURLINI, C., MONTANARI, A., BRONCO, S. & BERTOLDO, M. (2018). On the thermal behavior of protein isolated from different vegetables investigated by DSC and TGA. **Journal of the Science of Food and Agriculture** , 98 , 5368-5377.

ROUQUEROL, J., FAIRBRIDGE, C.W., EVERETT, D.H., HAYNES, J.H., PERNICONE, N., RAMSAY, J.D.F., SING, K.S.W., UNGER, K.K. (1994). Recommendations for the characterization of porous solids. **Pure Appl. Chem.** 66 (8), 1739-1758.

RUI, X., BOYE, JI, RIBEREAU, S., SIMPSON, BK & PRASHER, SO (2011). Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine Phaseolus vulgaris legume varieties. **Food Research International** , 44 , 2497–2504.

SÁ, AGA, MORENO, YMF & CARCIOFI, BAM (2020). Plant proteins as a high-quality nutritional source for human diet. **Trends in Food Science and Technology** , 97 , 170–184.

SHAND, PJ, YA, H., PIETRASIK, Z. & WANASUNDARA, PKJPD (2007). Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. **Food Chemistry** , 102 , 1119–1130.

SHEN, Y., TANG, X. & LI, Y. (2021). Drying methods affect physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. **Food Chemistry** , 339 , 127823.

TAN, E.S., Ying-Yuan, N. & Gan, C.Y. (2014). A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation. **Food Chemistry** , 152, 447–455.

TANG, X., SHEN, Y., ZHANG, Y., SCHILLING, MW & LI, Y. (2021). Parallel comparison of functional and physicochemical properties of common pulse proteins. **LWT** , 146 , 111594.

TANGER, C., ENGEL, J. & KULOZIK, U. (2020). Influence of extraction conditions on the conformational alteration of pea protein extracted from pea flour. **Food Hydrocolloids** , 107 , 105949.

TONTUL, İ., KASIMOGLU, Z., ASIK, S., ATBAKAN, T. & TOPUZ, A. (2018). Functional properties of chickpea protein isolates dried by refractance window drying. **International Journal of Biological Macromolecules** , 109 , 1253–1259.

VOGELSANG-O'DWYER M, PETERSEN IL, JOEHNKE MS, SØRENSEN JC, BEZ J, DETZEL A, BUSCH M, KRUEGER M, O'MAHONY JA, ARENDT EK & ZANNINI, E. (2020). Comparison of Faba bean protein ingredients produced using dry fractionation and isoelectric precipitation: Techno-functional, nutritional and environmental performance. **Foods** , 9 , 1–25.

WANG, F., ZHANG, Y., XU, L. & MA, H. (2020). An efficient ultrasound-assisted extraction method of pea protein and its effect on protein functional properties and biological activities. **Lwt** , 127 , 109348.

3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo avaliou a composição, as propriedades térmicas, morfológicas, físicas e tecnológicas de diferentes ingredientes comerciais e possíveis novos ingredientes a partir de leguminosas. De forma resumida, no quadro a seguir temos os resultados obtidos nesse trabalho comparados com o concentrado proteico de soja. A comparação com o concentrado de soja foi escolhida uma vez que o mesmo é o mais utilizado pelas indústrias pois o isolado acaba saindo mais caro e tem usos muito específicos. A comparação foi dividida em melhor, igual ou inferior de acordo com a diferença significativa de cada análise individualmente.

Quadro 1. Comparação dos resultados das propriedades tecnológicas dos ingredientes com relação ao concentrado proteico de soja.

Ingrediente	WHC	OHC	EAI	ESI	FC	FS (60 min)	LGC	Solubilidade (pH 7,0)	Estabilidade térmica
Isolado de Soja	Melhor	Igual	Melhor	Igual	Igual	Inferior	Igual	Igual	Igual
Isolado de ervilha	Melhor	Melhor	Igual	Igual	Igual	Melhor	Inferior	Igual	Igual
Concentrado proteico de ervilha	Inferior	Melhor	Melhor	Igual	Igual	Inferior	Igual	Melhor	Igual
Concentrado proteico de feijão fava	Inferior	Melhor	Inferior	Igual	Igual	Melhor	Melhor	Melhor	Igual
Farinha de feijão fava	Inferior	Melhor	Igual	Inferior	Igual	Melhor	Inferior	Melhor	Igual
Concentrado proteico de feijão carioca	Inferior	Inferior	Melhor	Melhor	Inferior	Melhor	Inferior	Melhor	Igual
Farinha de feijão carioca	Inferior	Igual	Igual	Igual	Melhor	Melhor	Igual	Melhor	Igual

O isolado de soja, o concentrado de ervilha e concentrado do feijão carioca apresentaram as maiores capacidades emulsificantes podendo serem utilizados para a produção de alimentos sólidos e semi-sólidos como, por exemplo, hambúrgueres e embutidos. Todos os ingredientes, com exceção do isolado de soja e concentrado de ervilha, apresentaram a melhor estabilidade de espuma até 60 min, ideais para produtos alimentícios como mousses, coberturas e produtos de confeitaria.

A alta solubilidade de um ingrediente proteico direciona seu uso para produção de alimentos líquidos, como por exemplo, extratos vegetais que simulam as propriedades do leite.

Neste sentido, a farinha de feijão fava, o concentrado de ervilha e a farinha do feijão carioca apresentaram maiores proteínas solúveis em pH 7,0 sendo mais ápteis para esses alimentos.

O isolado de soja, isolado de ervilha e concentrado de soja apresentaram as maiores capacidades de retenção de água sendo favoráveis na produção de alimentos viscosos como sopas e algumas massas no processo de panificação. Por outro lado, o concentrado de feijão carioca apresentou a menor capacidade de retenção de óleo que pode ser o desejado para alimentos que são fritos pois não absorvem muito óleo da fritura. O concentrado de feijão fava apresentou a menor concentração necessária para formar gel, essa propriedade é particularmente importante para elaboração de sobremesas tipo lácteas, como pudins e flans.

As respostas observadas ao longo do estudo para os diferentes ingredientes analisados, variaram significativamente entre si, mas nenhuma delas mostrou ser impeditiva para a aplicação desses ingredientes em produtos *plant-based*. Considerando a particularidade de cada ingrediente, os resultados aqui apresentados sugerem que o beneficiamento do grão de feijão carioca em concentrado proteico tem um grande potencial para o mercado *plant-based*.

APÊNDICE A

Documento técnico na forma de guia, publicado pelo autor, em conjunto com equipe técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, como ferramenta de melhoria e ou adaptações dos métodos utilizados nesse estudo.

Guia para caracterização tecnológica-funcional de ingredientes proteicos para o mercado de produtos de origem vegetal



Caroline Mellinger Silva

Farmacêutica-bioquímica, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Ilana Felberg

Farmacêutica-bioquímica, doutora em Ciência de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Janice Ribeiro Lima

Engenheira de alimentos, doutora em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Lucas de Paiva Gouvêa

Engenheiro de alimentos, estudante de mestrado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, bolsista da CAPES na Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Melicia Cintia Galdeano

Farmacêutica-bioquímica, doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Rodrigo Fernandes Caldeira

Químico, estudante de doutorado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, bolsista da CAPES na Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Tatiana de Lima Azevedo

Química, especialista em Ciências Ambientais, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

APRESENTAÇÃO

Os análogos de produtos de origem animal, também conhecidos como “*plant based*”, são alimentos cujos públicos-alvo são os consumidores vegetarianos, veganos e flexitarianos, e que têm apresentado crescimento de mercado exponencial nos últimos anos. Essa nova demanda deu origem a diversos ingredientes proteicos vegetais destinados à indústria de alimentos, que são usados como agentes emulsificantes, estabilizantes, espumantes, geleificantes, dispersantes, entre outros, em diferentes categorias de produtos.

A aplicabilidade tecnológica e o comportamento desses ingredientes estão relacionados às suas propriedades tecnológicas-funcionais. No entanto, ainda não existe padronização nacional ou internacional de metodologias para a determinação dessas propriedades em ingredientes proteicos de base vegetal. A falta de padronização dificulta a comparação dos resultados obtidos por diferentes organizações.

Dessa forma, por meio de uma seleção e avaliação crítica dos métodos disponíveis na literatura, seguidas de ensaios laboratoriais, foi elaborado o presente guia, que apresenta um conjunto de metodologias adaptadas e/ou melhoradas para cinco determinações em ingredientes vegetais: (1) Capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão, (2) Capacidade de formação de espuma e estabilidade de espuma, (3) Capacidade de absorção de água e de óleo, (4) Solubilidade em água e (5) Capacidade de formação de gel.

Espera-se que este guia auxilie na obtenção de resultados representativos e comparáveis para cada um dos métodos analisados, ajudando no direcionamento da aplicação dos ingredientes proteicos vegetais em alimentos. É uma publicação que se destina a laboratórios de análise, grupos de pesquisa e indústrias, e que pode vir a se tornar um documento de referência entre os profissionais da área.

Edna Maria Morais Oliveira

Chefe-Geral

Embrapa Agroindústria de Alimentos

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Embrapa (projeto 20.19.03.008.00.00 - Desenvolvimento de insumos proteicos vegetais a partir de pulses para substituição de proteína animal em alimentos) e ao “*The Good Food Institute - GFP*” (contrato SAIC 22100.20/0042-1 - Proteínas de feijão como ingredientes alternativos para produtos à base de carne), pelo suporte financeiro para a pesquisa.

SUMÁRIO

Introdução

Etapas de definição dos métodos para caracterização tecnológica-funcional de ingredientes proteicos vegetais

 Seleção das propriedades tecnológicas-funcionais de interesse

 Seleção dos ingredientes a serem testados nas metodologias

 Seleção dos métodos disponíveis na literatura

 Identificação das variáveis observadas para cada método selecionado

 Seleção dos parâmetros e ensaios laboratoriais

Métodos para avaliação tecnológica-funcional de ingredientes proteicos vegetais

 Capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão

 Capacidade de formação de espuma e estabilidade de espuma

 Solubilidade em água

 Capacidade de absorção de água e de óleo

 Capacidade de formação de gel

Considerações finais

Referências

Introdução

Os concentrados e isolados proteicos vegetais são ingredientes cada vez mais utilizados pela indústria na elaboração de alimentos análogos aos de origem animal, mas de base vegetal. No entanto, ainda não existe padronização de metodologias para determinação de propriedades tecnológicas-funcionais que direcionem o uso das mesmas. O problema da falta de padronização é a dificuldade de uma comparação efetiva de resultados obtidos para ingredientes diferentes, por diferentes organizações.

A literatura técnica e científica apresenta métodos com ampla variação de parâmetros, com diferenças desde a etapa de preparo das amostras, princípios analíticos, variáveis do processo metodológico até diferentes formas de expressão dos resultados. Dessa forma, por meio de seleção e avaliação crítica de um compilado de métodos disponíveis na literatura, seguidas de ensaios laboratoriais, foi elaborado este guia com um conjunto de metodologias adaptadas e/ou melhoradas, visando facilitar a comparação das propriedades de diferentes ingredientes proteicos e direcionar melhor a aplicação dos mesmos em produtos alimentares.

Como forma de organização e sistematização dos dados obtidos, para cada metodologia avaliada foram também gerados procedimentos operacionais padrão (POPs), que passaram a compor o portfólio de análises do Laboratório de Bioquímica da Embrapa Agroindústria de Alimentos. No entanto, além da relevância corporativa, representada pelo aumento da capacidade analítica do laboratório, a disponibilização dessas metodologias em forma de guia é uma maneira de facilitar o trabalho de outros grupos, dentro e fora da Embrapa, para que se tenha informações comparáveis sobre os ingredientes proteicos vegetais a serem gerados pela pesquisa ou mesmo analisados sob demanda do setor privado.

Etapas de definição dos métodos para caracterização tecnológica-funcional de ingredientes proteicos vegetais

Seleção das propriedades tecnológicas-funcionais de interesse

A seleção das propriedades tecnológicas de interesse foi inicialmente realizada por meio de consultas à literatura especializada para ingredientes e alimentos proteicos, desde livros-textos e artigos científicos até fichas técnicas de ingredientes correlatos disponíveis no mercado nacional e internacional.

Após consulta aos documentos técnicos e científicos, a seleção foi realizada pela frequência e interesse das propriedades encontradas, bem como pela complementaridade

técnica de informações que cada propriedade gera. Assim, as propriedades selecionadas foram: capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão, capacidade de formação de espuma e estabilidade de espuma, solubilidade em água, capacidade de absorção de água e de óleo e capacidade de formação de gel.

Seleção dos ingredientes a serem testados nas metodologias

Tendo em vista os insumos que estão sendo desenvolvidos em projetos de pesquisa da Embrapa, bem como os ingredientes comerciais de base vegetal mais abundantes no mercado, foram selecionadas as seguintes matérias-primas para compor as buscas por metodologias, bem como para aplicação e ensaios laboratoriais dos métodos: concentrado proteico de soja, isolado proteico de soja, concentrado proteico de ervilha, isolado proteico de ervilha, farinha de feijão-fava, concentrado proteico de feijão-fava (adquiridos comercialmente), farinha de feijão-carioca e concentrado proteico de feijão-carioca (produzidos na Embrapa).

Seleção dos métodos disponíveis na literatura

A busca pelos métodos disponíveis na literatura foi realizada contendo os seguintes critérios de inclusão: métodos de reconhecimento internacional e publicações realizadas por grupos de pesquisa com reconhecida competência na área. Não foi levada em consideração a data das publicações, uma vez que métodos clássicos são, em geral, oriundos de publicações mais antigas. Ao total, foram selecionados 27 artigos científicos para análise.

Identificação das variáveis observadas para cada método selecionado

A literatura selecionada foi avaliada quanto às variáveis que compunham cada um dos cinco métodos analisados. Foram levadas em consideração as variáveis relativas às formas de preparo das amostras (concentração de amostra, solvente de diluição, condições de pH, adição de sais e/ou tampões, etc.), os fundamentos e marcha analítica de cada método (variações quanto aos tempos de análise, rotações por minuto e tempos nos processos de centrifugação, uso ou não de dispersor do tipo Ultra-Turrax, etc.) e a forma de expressão dos resultados (% , g/g de amostra, etc.)

Seleção dos parâmetros e ensaios laboratoriais

Foi realizada uma análise crítica para cada variável selecionada no item anterior. Para algumas delas foi realizada uma tomada de decisão teórica, tendo em vista os ingredientes a

serem analisados e a utilidade do método para análise de ingredientes proteicos vegetais. Para outras variáveis, quando havia dúvida técnica quanto ao melhor procedimento a ser adotado, foram realizados testes laboratoriais com as variáveis apontadas pela literatura. Nesses casos, essas variáveis foram testadas com os oito ingredientes previamente mencionados, de modo a selecionar o procedimento que fosse mais reprodutível ou mais apropriado para as respostas esperadas. Por fim, os procedimentos selecionados foram utilizados para avaliação dos oito ingredientes, em três ou mais replicatas, e os resultados para cada uma das propriedades analisadas apresentaram coeficiente de variação inferior a 10%.

Métodos para avaliação tecnológica-funcional de ingredientes proteicos vegetais

Sugere-se que todas as avaliações sejam realizadas, ao menos, em triplicata, para cada um dos métodos descritos a seguir.

Capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão

Emulsão pode ser definida como uma mistura formada por dois líquidos imiscíveis, onde um componente é definido como fase dispersante ou fase contínua e o outro componente como fase dispersa ou fase emulsionada, por ser encontrado na forma de pequenas gotículas.

As proteínas são consideradas bons agentes emulsificantes, pois possuem numa mesma molécula regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, as quais reduzem a tensão superficial entre as fases, permitindo a formação da emulsão. Contudo, a maioria das proteínas apresenta uma redução ou perda da atividade emulsificante em regiões de pH próximo ao seu ponto isoelétrico, onde a carga líquida e a solubilidade apresentam-se reduzidas. Outros fatores que prejudicam a capacidade emulsificante das proteínas são a presença de sais e a exposição ao calor, que levam à desnaturação.

A alta capacidade emulsificante de um ingrediente proteico direciona seu uso para produção de alimentos sólidos ou semissólidos em que proteínas e gorduras, além de outros ingredientes hidrofílicos e lipofílicos, precisam estar emulsionados, como, por exemplo, hambúrgueres, embutidos, molhos e sobremesas.

Procedimento:

- ✓ Em um béquer de 100 mL, pesar 300 mg da amostra proteica e adicionar 60 mL de água destilada para cada replicata. Homogeneizar e anotar a concentração exata em g/mL;
- ✓ Medir o pH e ajustá-lo para pH 7,0 usando NaOH 0,1 mol/L ou HCl 0,1 mol/L;

- ✓ Em seguida, adicionar 20 mL de óleo de soja comercial à amostra solubilizada e emulsionar, imediatamente, com um homogeneizador tipo Ultra-Turrax (probe S 25 KV-18 G) na rotação de 9500 rpm por um minuto à temperatura ambiente. O dispersor do Ultra-Turrax deve ficar posicionado a uma altura de 5 mm a 7 mm do fundo do béquer (Figura 1);
- ✓ Retirar uma alíquota de 50 µL entre o meio e o fundo do béquer, imediatamente após a homogeneização;
- ✓ Adicionar a alíquota de 50 µL em um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução aquosa de SDS (Dodecil sulfato de sódio) 0,1% (p/v) e homogeneizar por 30 segundos em vortex;
- ✓ Zerar o espectrofotômetro com a solução de SDS 0,1%;
- ✓ Realizar a leitura de absorvância da amostra no comprimento de onda de 500 nm. Esta amostra será considerada tempo 0 (A_0);
- ✓ Após 10 minutos, pipetar 50 µL entre o meio e o fundo do béquer contendo a emulsão, adicionar em 5 mL de SDS 0,1% e homogeneizar por 30 segundos em vortex;
- ✓ Fazer a leitura no espectrofotômetro (A_{10});
- ✓ Calcular o índice de atividade emulsificante (EAI - *Emulsifying Activity Index*) em m^2/g , utilizando a seguinte equação:

$$EAI (m^2/g) = \frac{2 \times 2,303 \times 100 \times A_0}{c \times 0,25 \times 10000}$$

Onde:

A_0 é a absorvância da emulsão no tempo zero, isto é, logo após o fim da homogeneização.

c é a concentração da amostra proteica (g/mL), ou seja, a massa pesada da amostra dividida por 60 mL.

NOTA: Os números 2 e 2,303 são valores fixos, como proposto por Pearce e Kinsella (1978). O número 100 corresponde ao fator de diluição, 0,25 é a fração de volume do óleo adicionado na emulsão e 10000 é usado para a correção da unidade de expressão do resultado.

- ✓ Calcular o índice de estabilidade da emulsão (ESI - *Emulsion Stability Index*) em minutos, utilizando a seguinte equação:

$$ESI (min) = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times 10$$

Onde:

A_0 é a absorvância da emulsão no tempo zero, isto é, logo após o fim da homogeneização.

A_{10} é a absorvância da emulsão após 10 minutos



(A)



(B)

Figura 1. Etapas da análise de capacidade emulsificante. (A) posição do dispersor para fazer a emulsão, (B) solução emulsionada. Fotos: Sidney Pacheco.

A capacidade emulsificante e a estabilidade de emulsão podem ser apresentadas na forma gráfica ou em tabelas. Na Figura 2 tem-se um exemplo de representação gráfica.

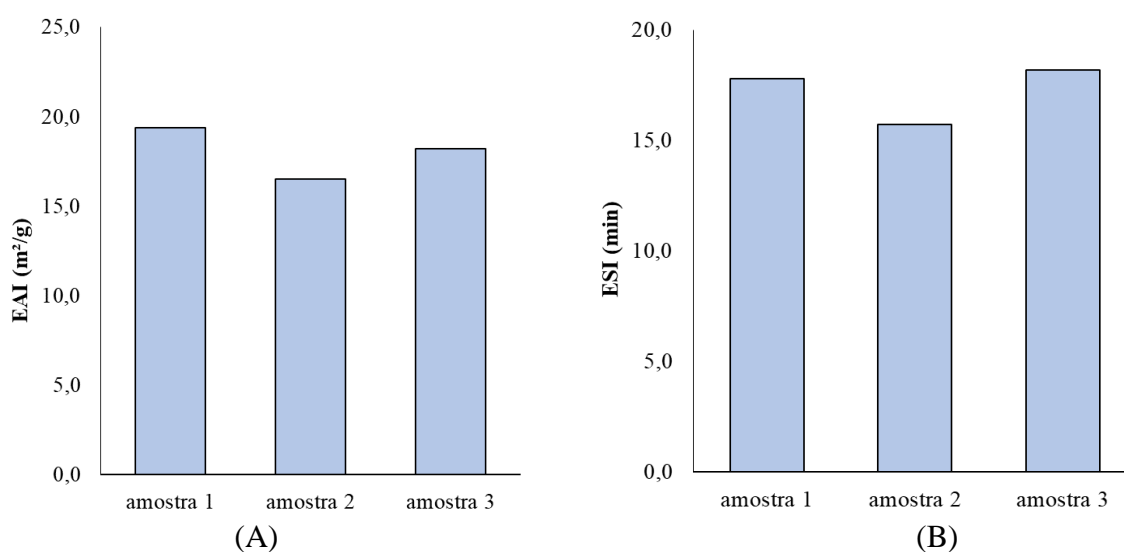


Figura 2. Modelo de representação gráfica de capacidade emulsificante – EAI (A) e estabilidade de emulsão – ESI (B).

O método proposto foi baseado nas informações descritas por Pearce e Kinsella (1978), Naczk et al. (1985), Kaur e Singh (2005), Du et al. (2014), De La Rosa-Millán et al. (2018) e Gundogan e Karaca (2020).

Capacidade de formação de espuma e estabilidade de espuma

As espumas formadas e presentes em matrizes alimentares consistem de gotas de ar dispersas e envolvidas em um líquido que contém um surfactante, que diminui a tensão interfacial e tem a capacidade de formar um filme ao redor das gotas, impedindo sua coalescência. A capacidade de formar espuma estável em presença de ar é uma propriedade funcional importante dos ingredientes proteicos, podendo influenciar e modificar características de diversos produtos alimentícios como mousses, coberturas e produtos de confeitaria.

Procedimento:

- ✓ Pesar 1,5 g da amostra proteica em um béquer de 100 mL;
- ✓ Homogeneizar a amostra com 60 mL de água destilada usando um bastão de vidro para solubilização, e, em seguida, em um agitador magnético, manter a homogeneização durante a correção de pH e retirada da alíquota (esse volume de solução é suficiente para que o experimento seja realizado em triplicata);
- ✓ Ajustar o pH da dispersão para 7,0 utilizando NaOH 0,1 mol/L ou HCl 0,1 mol/L;
- ✓ Retirar 15 mL da solução e adicionar em um béquer de 100 mL (a partir daqui, o procedimento segue descrito para cada replicata);
- ✓ Homogeneizar utilizando Ultra-Turrax por 2 minutos (probe S 25 KV-18 G), seguindo a rampa de rotação/tempo, na seguinte sequência, de modo direto, sem interrupção: 6500 rpm/30 s, 9500 rpm/30 s e 13500 rpm/60 s. Observar que o dispersor deverá ficar submerso 5 mm de profundidade na amostra para que ocorra uma boa formação de espuma;
- ✓ Transferir todo o conteúdo do béquer para uma proveta de 50 mL com auxílio de uma espátula, acertando as bordas para que a espuma fique nivelada na proveta (recomenda-se que o responsável pela análise estipule um tempo máximo para passar a solução e a espuma para a proveta, minimizando o erro entre as amostras) (Figura 3);
- ✓ Medir e anotar o volume da espuma na própria proveta, nos tempos 0 minuto, 10 minutos, 30 minutos e 60 minutos;
- ✓ Calcular a capacidade de formação de espuma (FC - *Foaming Capacity*) e a estabilidade de espuma (FS - *Foaming Stability*) utilizando as seguintes equações:

$$FC (\%) = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \times 100$$

$$FS (\%) = \frac{V_2}{V_1} \times 100$$

Onde:

V_0 é o volume inicial da solução da amostra proteica.

V_1 é o volume após a homogeneização (solução + espuma).

V_2 é o volume que permaneceu (solução + espuma) após repousar por 10 minutos, 30 minutos ou 60 minutos em temperatura ambiente.



Figura 3. Formação de espuma. Foto: Sidney Pacheco.

Usualmente, a estabilidade de espuma é apresentada em um gráfico em função do tempo (Figura 4).

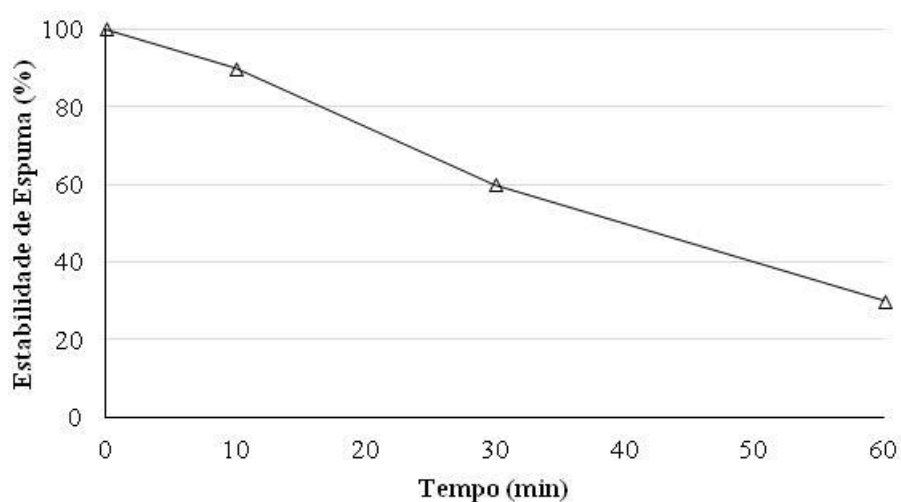


Figura 4. Modelo de gráfico para representação da estabilidade de espuma de ingredientes proteicos.

O método proposto foi baseado nas informações descritas por Poole et al. (1984), Kaur e Singh (2005), Zheng et al. (2008), Aydemir e Yemenicioğlu (2013), Du et al. (2014), Shevkani et al. (2015), Lafarga et al. (2018), Gundogan e Karaca (2020) e Saricaoglu (2020).

Solubilidade em água

A solubilidade é um parâmetro crítico da funcionalidade de um ingrediente proteico, sendo uma das propriedades tecnológicas mais importantes para a utilização em alimentos. A solubilidade dos ingredientes depende de sua composição, principalmente da proporção e distribuição de grupos polares (hidrofílicos) e grupos apolares (hidrofóbicos) dos aminoácidos que constituem a estrutura proteica, e também do pH do meio, uma vez que está intimamente relacionada à conformação das proteínas em solução. A alta solubilidade de um ingrediente proteico direciona seu uso para produção de alimentos líquidos, como, por exemplo, extratos vegetais que simulam as propriedades do leite.

Procedimento:

- ✓ Pesar 300 mg da amostra proteica em tubo tipo Falcon de 50 mL para cada pH a ser testado e para cada replicata;
- ✓ Adicionar 30 mL de água destilada e homogeneizar;
- ✓ Ajustar o pH, em potenciômetro, para os valores em teste (3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9) com uso de HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M. Caso ocorra grande alteração no volume, utilizar soluções ácidas ou alcalinas mais concentradas;
- ✓ Agitar por 30 minutos em agitador orbital de tubos à temperatura ambiente;
- ✓ Retirar uma alíquota de 2 mL e colocar em microtubo tipo Eppendorf;
- ✓ Centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos em centrífuga para microtubos;
- ✓ Retirar o sobrenadante, transferir para outro microtubo e determinar a concentração de proteína solúvel utilizando o método espectrofotométrico de quantificação de proteínas solúveis (Bradford, 1976);
- ✓ Em paralelo, para o preparo de amostra controle, preparar uma solução de 1% da amostra proteica em NaOH 0,1 M (considera-se que nessa solução toda proteína estará solúvel no sobrenadante) e determinar a concentração total de proteína na amostra utilizando o método de Bradford, como citado anteriormente;
- ✓ Calcular a solubilidade, utilizando a fórmula:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{C}{C_T} \times 100$$

Onde:

C é a concentração de proteína no sobrenadante em cada pH testado

C_T é concentração total de proteína presente na amostra controle

Na Figura 5 são mostrados tubos com amostra proteica solubilizada em diferentes valores de pH.

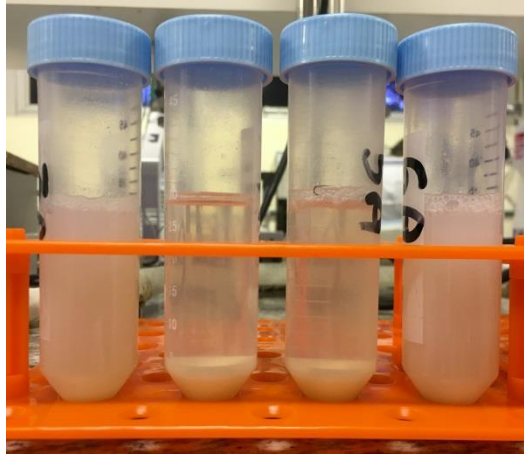


Figura 5. Tubos com amostra proteica solubilizada em diferentes valores de pH (da esquerda para a direita, pH: 3, 4, 5 e 6). Foto: Sidney Pacheco.

Usualmente a solubilidade proteica em água é mostrada em um gráfico de solubilidade em função do pH (Figura 6). As avaliações de solubilidade podem também ser realizadas em relação a outros parâmetros de interesse, como, por exemplo, mantendo-se o pH fixo e variando-se a temperatura.

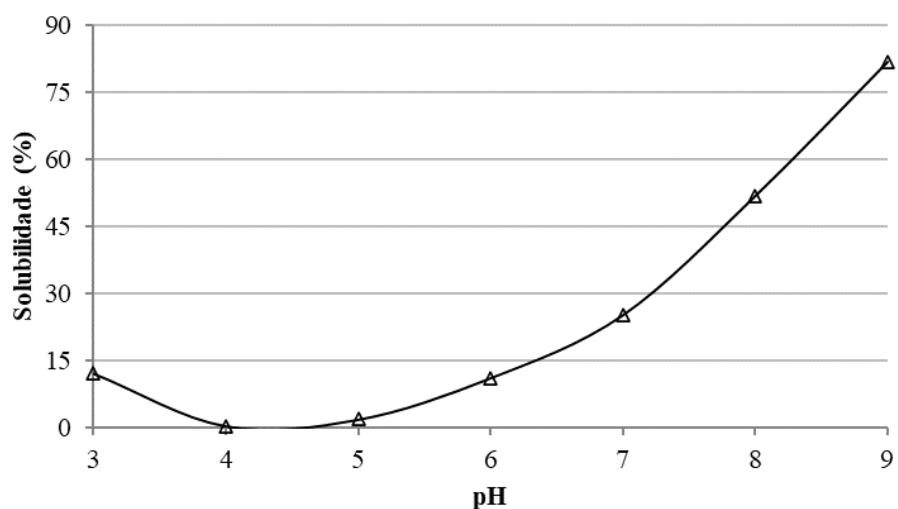


Figura 6. Modelo de gráfico para representação da solubilidade de ingredientes proteicos.

O método proposto foi baseado nas informações descritas por Boye et al. (2010), Joshi et al. (2012), Jarpa-Parra et al. (2014), Ladjal-Ettoumi e Chibane (2015), Ladjal-Ettoumi et al. (2016), Jarpa-Parra (2018), Alzuwaid et al. (2020) e Ibrahim et al. (2021).

Capacidade de absorção de água e de óleo

A capacidade de absorção de água de um ingrediente proteico é definida como a razão entre a quantidade de água em gramas que esse ingrediente pode absorver por grama de amostra. Da mesma forma, a capacidade de absorção de óleo é a quantidade de óleo em gramas que esse ingrediente pode absorver por grama de amostra.

A capacidade de absorção de água é uma propriedade muito importante nos ingredientes proteicos, pois a retenção de água é um fator a ser considerado na produção de alimentos viscosos como sopas e de algumas massas no processo de panificação. Por outro lado, a retenção de óleo por parte dos ingredientes é importante para a aplicação na indústria de alimentos, principalmente no processo de elaboração de embutidos, pois podem formar emulsões, unindo a água e a gordura na fabricação, por exemplo, de salsichas.

Procedimento:

- ✓ Pesar e anotar a massa de um microtubo tipo Eppendorf, para cada replicata (M_t);
- ✓ Pesar, nesse microtubo, aproximadamente 100 mg do ingrediente proteico e anotar o valor exato da massa de amostra, descontando a massa do microtubo (M_0);
- ✓ Adicionar 1 mL de água destilada (para capacidade de absorção de água) ou 1 mL de óleo de soja (para capacidade de absorção de óleo) ao microtubo;
- ✓ Fechar o tubo e homogeneizar manualmente até que a amostra apresente aspecto homogêneo;
- ✓ Agitar em aparelho tipo vortex por 1 minuto;
- ✓ Deixar em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente (Figura 7A);
- ✓ Centrifugar em centrífuga de microtubos à temperatura ambiente na rotação de 12000 rpm pelo período de 20 minutos;
- ✓ Verter todo o sobrenadante e descartar;
- ✓ Em seguida, encostar a borda do microtubo em papel absorvente para drenar o sobrenadante residual (Figura 7B);
- ✓ Pesar o tubo tipo Eppendorf com o precipitado e anotar a massa (M_f).

- ✓ Calcular a capacidade de absorção de água (WHC - *Water Holding Capacity*), ou capacidade de absorção de óleo (OHC - *Oil Holding Capacity*) utilizando a seguinte equação:

$$WHC \text{ ou } OHC \text{ (g/g amostra)} = \frac{M_1 - M_t - M_0}{M_0}$$

Onde:

M_1 é a massa do tubo com a amostra úmida, após o descarte do sobrenadante residual de água ou óleo

M_0 é a massa inicial da amostra

M_t é a massa do microtubo tipo Eppendorf

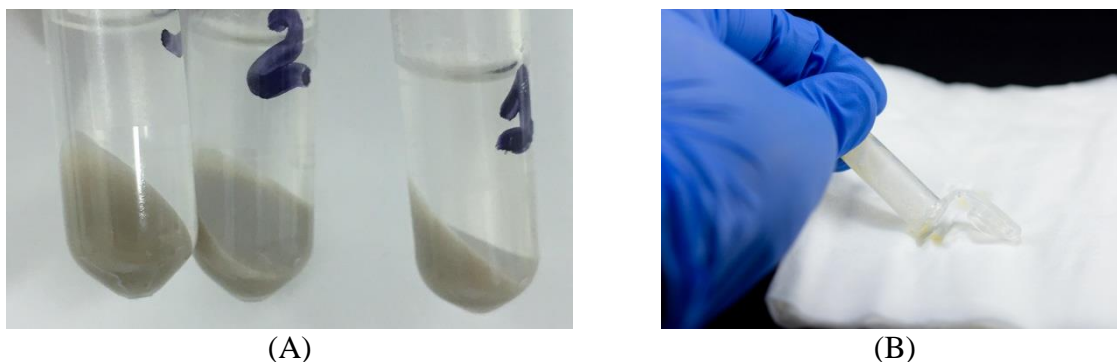


Figura 7. Análise de absorção de água (ou de óleo). (A) Microtubos, (B) Retirada de sobrenadante residual do microtubo em papel absorvente. Fotos: Sidney Pacheco.

As capacidades de absorção de água e de óleo podem ser representadas na forma gráfica ou em tabelas. Um exemplo de representação gráfica está mostrado na Figura 8.

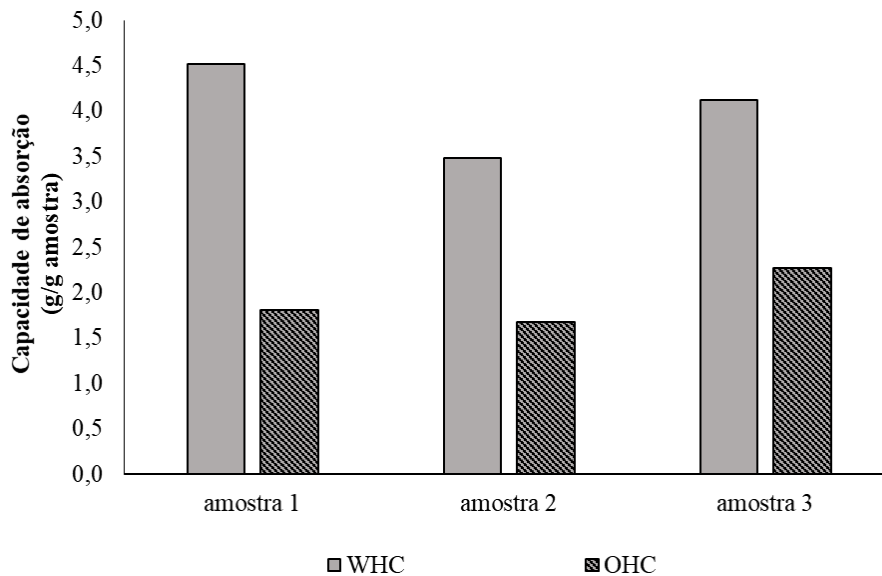


Figura 8. Exemplo de representação gráfica das análises de absorção de água (WHC) e de óleo (OHC).

O método proposto foi baseado nas informações descritas por Rodsamran e Sothornvit (2018), Čakarevic et al. (2019), Gundogan e Karaca (2020), Bozkurt et al. (2021), Marchini et al. (2021) e Omura et al. (2021).

Capacidade de formação de gel

A capacidade de formação de gel é geralmente expressa pela concentração mínima de gelificação, que pode ser definida como a concentração mínima de uma substância necessária para a formação de um gel estável. A gelificação de proteínas é observada quando as proteínas formam uma rede tridimensional após o aquecimento a uma temperatura mais alta do que a temperatura de desnaturação da proteína, seguido de resfriamento. Quanto menor for a concentração mínima necessária para a gelificação, melhor é a capacidade de formar géis. A formação de gel de proteína é frequentemente favorecida por interações hidrofóbicas e, em alguns casos, pontes de dissulfeto covalentes também podem contribuir para o desenvolvimento da rede. Essa propriedade é particularmente importante para elaboração de sobremesas tipo gelatina ou tipo lácteas, como pudins e flans.

Procedimento:

- ✓ Em dez tubos de ensaio de 30 mL, com tampa plástica sem rosca, pesar as seguintes quantidades de amostra: 0,1 g; 0,2 g; 0,3 g; 0,4 g; 0,5 g; 0,6 g; 0,7 g; 0,8 g; 0,9 g e 1,0 g;
- ✓ Adicionar em cada tubo 5 mL de água destilada;
- ✓ Homogeneizar em vortex por 1 minuto;
- ✓ Aquecer em banho-maria a 100 °C (água fervente) por 60 minutos;
- ✓ Resfriar imediatamente em banho de gelo;
- ✓ Colocar os tubos na geladeira a 4 °C;
- ✓ Manter por 2 horas sob refrigeração;
- ✓ Retirar da geladeira (Figura 9) e verter os tubos vagarosamente, em ordem crescente de concentração, verificando se há escoamento;
- ✓ A resposta do teste será:
 - (-) **Não formou gel**, quando a solução se apresenta líquida;
 - (±) **Gel fraco**, quando a solução escoar, porém mais viscosa;
 - (+) **Formou gel**, quando o tubo é invertido e a solução não escoar.
- ✓ A menor concentração (g/mL) em que a amostra não escoar, formando um gel firme, será denominada concentração mínima de gelificação (LGC - *Least Gelling Concentration*) (Quadro 1) e quanto menor for essa concentração, melhor será a capacidade de gelificação.

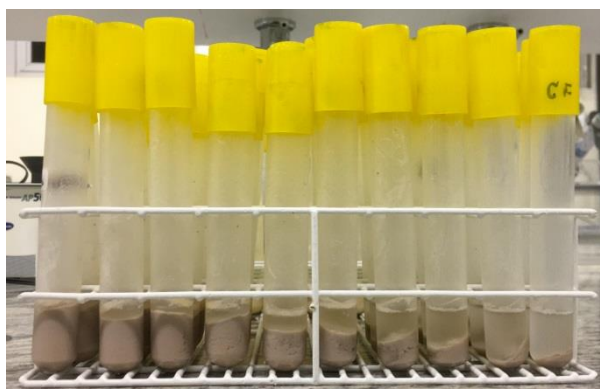


Figura 9. Teste de formação de gel com tubos em ordem decrescente de concentração. Tubos da esquerda para a direita são referentes às concentrações de 0,20; 0,18; 0,16; 0,14; 0,12; 0,10; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 g/mL. Foto: Sidney Pacheco.

Quadro 1. Modelo usado na determinação de concentração mínima de gelificação ou LGC (*Least Gelling Concentration*) de um ingrediente proteico.

Repetição	Concentração (g/mL)									
	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
1	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

(-) não formou gel, (±) gel fraco, (+) formou gel. No exemplo considera-se como LGC a concentração em que as três repetições formaram gel, ou seja 0,10 g/mL.

O método proposto foi baseado nas informações descritas por Sathe e Salunkhe (1981), Ghribi et al. (2015), Jarpa-Parra (2018) e Ibrahim et al. (2021).

Considerações finais

Como proposto, a partir de métodos descritos na literatura científica e após revisão, melhoria e/ou adaptação, protocolos analíticos foram compilados de modo a gerar uma padronização quanto às análises dos principais parâmetros que caracterizam tecnologicamente e funcionalmente ingredientes proteicos de origem vegetal.

Referências

- ALZUWAID, N. T.; SISSONS, M.; LADDOMADA, B.; FELLOWS, C. M. Nutritional and functional properties of durum wheat bran protein concentrate. **Cereal Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 304–315, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/cche.10246>.
- AYDEMIR, L. Y.; YEMENICIOĞLU, A. Potential of Turkish Kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 686–694, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.023>.
- BOYE, J. I., AKSAY, S.; RIBÉREAU, S. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 537–546, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>
- BOZKURT, F.; BEKIROĞLU, H.; DOĞAN, K.; KARASU, S.; SAGDIC, O. Technological and bioactive properties of wheat glutenin hydrolysates prepared with various commercial proteases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 149, e-111787, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111787>.
- BRADFORD, M. 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. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- ČAKAREVIĆ, J.; VIDOVIĆ, S.; VLADIĆ, J.; GAVARIĆ, A.; JOKIĆ, S.; PAVLOVIĆ, N.; BLAŽIĆ, M.; POPOVIĆ, L. Production of bio-functional protein through revalorization of apricot kernel cake. **Foods**, v. 8, n. 8, p. 1-12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods8080318>.

DE LA ROSA -MILLÁN, J.; ORONA-PADILLA, J. L.; FLORES-MORENO, V. M.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Physicochemical, functional and ATR-FTIR molecular analysis of protein extracts derived from starchy pulses. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1414–1424, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13719>.

DU, S.-K.; JIANG, H.; YU, X.; JANE, J.-L. Physicochemical and functional properties of whole legume flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 308–313, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.001>.

GHRIBI, A. M.; GAFSI, I. M.; BLECKER, C.; DANTHINE, S.; ATTIA, H.; BESBES, S. Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 165, p. 179–188, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.021>.

GUNDOGAN, R.; KARACA, A. C. Physicochemical and functional properties of proteins isolated from local beans of Turkey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 130, e-109609, p. 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109609>.

IBRAHIM, S. G.; WAN-ZUNAIRAH, W. I.; SAARI, N; KARIM, R. Functional properties of protein concentrates of KB6 kenaf (*Hibiscus cannabinus*) seed and its milky extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 135, 110234, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110234>.

JARPA-PARRA, M. Lentil protein: a review of functional properties and food application. An overview of lentil protein functionality. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 4, p. 892–903, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13685>.

JARPA-PARRA, M.; BAMDAD, F.; WANG, Y.; TIAU, Z.; TEMELLI, F.; HAN, J.; CHEN, L. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 461–469, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02>.

JOSHI, M.; ADHIKARI, B.; ALDRED, P.; PANOZZO, J. F.; KASAPIS, S.; BARROW, C. J. Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1343–1353, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.029>.

KAUR, M.; SINGH, N. Studies on functional, thermal and pasting properties of flours from different chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 403–411, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.015>.

LADJAL-ETTOUMI, Y.; BOUDRIES, H.; CHIBANE, M.; ROMERO, A. Pea, Chickpea and Lentil Protein Isolates: Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties. **Food Biophysics**, v. 11, p. 43–51, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9411-6>.

LADJAL ETTOUMI, Y.; CHIBANE, M. Some physicochemical and functional properties of pea, chickpea and lentil whole flours. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, p. 987–996, 2015. DOI: [http://www.ifrj.upm.edu.my/22%20\(03\)%202015/\(16\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/22%20(03)%202015/(16).pdf).

LAFARGA, T.; ÁLVAREZ, C.; BOBO, G.; AGUILÓ-AGUAYO, I. Characterization of functional properties of proteins from Ganxet beans (*Phaseolus vulgaris* L. var. Ganxet) isolated using an ultrasound-assisted methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 98, p. 106–112, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.033>.

MARCHINI, M.; MARTI, A.; FOLLI, C.; PRANDI, B.; GANINO, T.; CONTE, P.; FADDA, C.; MATTAROZZI, M.; CARINI, E. Sprouting of sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] moench): Effect of drying treatment on protein and starch features. **Foods**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10020407>.

NACZK, M.; DIOSADY, L. L.; RUBIN, L. J. Functional properties of canola meals produced by a two-phase solvent extraction system. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 6, p. 1685–1688, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb10565.x>.

OMURA, M. H.; OLIVEIRA, A. P. H. de; SOARES, L. de S.; COIMBRA, J. dos S. R.; BARROS, F. A. R. de; VIDIGAL, M. C. T. R.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; OLIVEIRA, E. B. de. Effects of protein concentration during ultrasonic processing on physicochemical properties and techno-functionality of plant food proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 113, 106457, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106457>.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 716–723, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>.

POOLE, S.; WEST, S. I.; WALTERS, C. L. Protein-protein interactions: Their importance in the foaming of heterogeneous protein systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 35, n. 6, p. 701–711, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740350618>.

RODSAMRAN, P.; SOTHORNVIT, R. Physicochemical and functional properties of protein concentrate from by-product of coconut processing. **Food Chemistry**, v. 241, p. 364–371, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.116>.

SARICAUGLU, F. T. Application of high-pressure homogenization (HPH) to modify functional, structural and rheological properties of lentil (*Lens culinaris*) proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 760–769, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.034>.

SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Functional Properties of the Great Northern Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Proteins: Emulsion, Foaming, Viscosity, and Gelation Properties. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 1, p. 71–81, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb14533.x>.

SHEVKANI, K.; SINGH, N.; KAUR, A.; RANA, J. C. Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 43, jan., p. 679–689, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.024>.

ZHENG, H.-G.; YANG, X.-Q.; TANG, C. H.; LI, L.; AHMAD, N. Preparation of soluble soybean protein aggregates (SSPA) from insoluble soybean protein concentrates (SPC) and its functional properties. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 154–164, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.013>.