



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

JACKELINE LIMA DE MEDEIROS

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE ISOLADOS PROTEICOS E
GENÓTIPOS DE EXCELÊNCIA DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**

FORTALEZA

2013

JACKELINE LIMA DE MEDEIROS

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE ISOLADOS PROTEICOS E
GENÓTIPOS DE EXCELÊNCIA DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- M439c Medeiros, Jackeline Lima de.
Caracterização bioquímica e funcional de isolados proteicos e genótipos de excelência de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] / Jackeline Lima de Medeiros. – 2013.
94 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Área de concentração: Bioquímica.
Orientação: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho.
1. Feijão. 2. Plantas – Proteínas. 3. Valor nutritivo. 4. Bioquímica. I. Título.

CDD 574.192


JACKELINE LIMA DE MEDEIROS

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE ISOLADOS PROTEICOS E
GENÓTIPOS DE EXCELÊNCIA DE FEIJÃO - CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)


Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e
Biologia Molecular, da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial para obtenção
do Título de Mestre em Bioquímica. Área de
Concentração: Bioquímica.

Aprovada em: 22/02/2013.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dra. Fernanda Maria Machado Maia
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dedico esta pesquisa a toda minha família pelo incentivo dado ao longo do meu trajeto estudantil, e pelo constante apoio e infinito amor em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho, inicialmente por ser uma pessoa admirável, forte e de um senso humor ímpar. Obrigada, pela compreensão, confiança, apoio, competência e por ter aceitado orientar-me durante esses dois anos, muito obrigada.

À professora Dra. Henriette Monteiro Cordero de Azeredo, pelo apoio e presteza e por ceder a infraestrutura e o pessoal do Laboratório de Embalagens – EMBRAPA Tropical, indispensáveis para a execução deste trabalho.

Às professoras Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa e Fernanda Maria Machado Maia por aceitarem participar da minha banca e por suas valiosas sugestões.

A todos os professores que ministraram disciplinas para o Curso de Mestrado em Bioquímica Vegetal, pelos conhecimentos cedidos.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, na pessoa do Prof. Dr. Marcio Viana, Coordenador, do Prof. Dr. José Hélio, Vice-Coordenador, pelo apoio institucional no decorrer de meu curso de Mestrado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec), onde este trabalho foi realizado, Terezinha Souza, Lady Clarissa, Davi Farias, Luiz Filho, Pedro Matheus, Nayana Soares, Nathanna Sousa, Renata Maria, Gabrielle de Paula, Thiago Almeida, Leonardo Vieira pela amizade e companheirismo. Em especial, aos amigos Martônio Viana e Renalison Farias pelo apoio e contribuição para a realização deste trabalho, pela amizade e companheirismo. Aos meus ex-colegas de laboratório e amigos, Katharine Gurgel, Alison Rebouças e Tiago Gama, pela amizade e carinho cedidos durante vários momentos.

Aos colegas do Curso de Bioquímica Elaine Angelim e Paulo Carvalho, pela amizade, companheirismo, ajuda e apoio dado durante todo o curso e execução deste trabalho.

À Valéria Melo, Hálisson Lucas e Manuella Macedo, meus amigos Engenheiros de Alimentos, pela valorosa ajuda na execução deste trabalho, pelos momentos de descontração, estudos e apoio dado.

Às minhas amigas nutricionistas, Isabel Ribeiro, Cristiane Martins, Diana Cris, Patricia Gomes, pela sincera amizade, ajuda, paciência, compreensão, companheirismo sempre presentes em minha vida.

Em especial, aos meus pais Francisco Heleno Genu de Medeiros (*in memoriam*) e Rocilda Lima de Medeiros, por serem meu porto seguro, pelo constante incentivo dado aos meus estudos, pelo apoio e confiança incondicionais. Obrigada, pelo amor, infinito amor que me guia e me faz lutar a cada dia.

Às minhas irmãs Ana Karine Lima de Medeiros, Katarine Lima de Medeiros, Karoline Lima de Medeiros, pelo apoio, amizade e compaheirismo.

Aos meus sobrinhos Davi Lima de Medeiros e Grabiela Medeiros Moreira pela alegria e carinho que me proporcionam a cada dia.

Ao meu marido e grande companheiro Wilton Akira Bastos Shimabukuro, pelo inestimável apoio, amor, amizade e serenidade que me proporcionou durante a execução deste trabalho. Obrigada pela compreensão e por me tornar um ser humano melhor.

A Deus, que ilumina e guia todos os caminhos da minha vida.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições e Unidades:

Empresa Brasileira de Pesquisa Agro-Pecuária (Embrapa) Meio-Norte, por meio de parceria no projeto “Desenvolvimento de cultivares para o agronegócio do feijão-caupi no Brasil”

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), por financiar projeto intitulado “Inclusão de novos genótipos de feijão-caupi e de outras leguminosas de elevado valor nutricional e funcional na alimentação da população do semi-árido”;

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará;

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará;

Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará;

Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, onde o trabalho foi desenvolvido;

Laboratório de Embalagens – EMBRAPA Tropical.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingido o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma importante leguminosa devido ao seu potencial nutricional, revelado principalmente pelo alto teor de proteínas. As proteínas apresentam destaque nas propriedades funcionais (tecnológicas) e o interesse por novas fontes proteicas a custos acessíveis, leva ao crescente estudo das leguminosas. Assim, o presente trabalho objetivou a obtenção de isolados proteicos de dois genótipos de feijão-caupí (Cauamé e Tumucumaque), bem como a caracterização bioquímica e funcional destes isolados e de suas sementes. Os resultados mostraram que as sementes dos genótipos estudados são boas fontes de proteínas (23,19 a 24,02%), fibras (17,75 a 19,78%) e apresentam baixo teor de lipídeos (1,67%). Os isolados proteicos obtidos apresentaram elevado teor proteico (> 90%) e rendimento (35,11 e 38,12%, respectivamente Tumucumaque e Cauamé). Tanto os isolados como as sementes não se mostraram tóxicos, mas apresentaram inibidores de tripsina (24,2 a 28,2 UI/ µg de proteína), quimiotripsina (26,66 a 32,17 UI/ µg de proteína) e lectina (80.000 a 320.000 UI/ µg de proteína). A digestibilidade dos isolados (63,23 a 63,81%) foi superior a das sementes (50,07 a 54,37%). A fração proteica predominante foi a globulina, com maior concentração nos isolados. A solubilidade das sementes e isolados apresenta-se em formato de U, com menor solubilidade no ponto isoelétrico. Os isolados proteicos apresentaram melhor capacidade de absorção de água (2,41 a 2,44 ml/g de amostra), de óleo (2,38 a 2,8 ml/g de amostra) e formação de gel (8 a 10%). Já as sementes apresentaram maior formação de espuma (52,66 a 57,89%). Assim, pode-se concluir que os isolados proteicos obtidos desse genótipo são promissores para aplicação nutricional, por apresentarem elevado teor proteico (> 90%), razoável digestibilidade (>60%) e perfil de aminoácidos. Da mesma forma, são promissores para a aplicação tecnológica, uma vez que se destacaram nas propriedades de solubilidade, capacidade de absorção de água e de óleo e formação de gel. Assim, os isolados proteicos podem ser utilizados como ingredientes de produtos alimentícios, contribuindo com o aumento do valor nutricional dos alimentos e agregando valor aos genótipos melhorados do feijão-caupi.

Palavras-chave: Feijão. Valor nutricional. Proteínas vegetais. Propriedades tecnológicas.

ABSTRACT

The cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) is an important plant due to their nutritional potential, revealed to mainly high protein content. The highlight proteins present in the functional properties (technological) and interest in new sources of protein at affordable costs leads to increasing interest in studying the legume. Thus, the present study aimed to obtain protein isolates from bean cowpea genotypes, as the biochemical and functional characterization of these isolates and their seeds. The results showed the seeds are good sources of protein (23.19 to 24.02%), fiber (17.75 to 19.78%) and have a low lipid content (1.67%). The protein isolated obtained showed high purity (above 90%) and yield (35.11 and 38.12%). Both isolated as seeds not proved toxic but exhibited trypsin inhibitor (24.2 to 28.2 IU), chymotrypsin (26.66 to 32.17 IU) and lectin (80.000-320.000 IU). The digestibility of isolated (63.23 and 63.81%) was higher than the seeds (50.07 to 54.37%). The predominant proteic fraction was globulin, with the highest concentration in the isolates. The seeds and isolated solubilities presents U-shaped, with lower solubility at the isoelectric point. The isolated protein showed greater capacity for absorb water (2.41 to 2.44 ml/g sample), oil (from 2.38 to 2.81 ml / g sample) and gel concentrations (8-10%). Already seeds showed higher foaming (52.66 to 57.89%).

Keywords: Beans. Nutritional value. Plant proteins. Technological properties.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fluxograma para a obtenção do isolado proteico de feijão-caupi, em pH 8,5 com tampão Tris-Hcl para solubilização da proteína **41**
- Figura 2** - Esquema utilizado para separação das globulinas, albuminas e proteínas tipo prolaminas, glutelinas ácidas e glutelinas básicas de feijão-caupi **47**
- Figura 3** - Perfil das proteínas de eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) sob condições desnaturantes dos extratos brutos e isolados proteicos dos genótipos de feijão-caupi 1- Marcador Molecular [Fosforilase b de coelho (97 kDa); Albumina bovina (66 kDa); Ovalbumina do ovo de galinha (45 kDa) Anidrase carbônica bovina (30 kDa) Inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) alfa-lactalbumina bovina (14,4 kDa)]; 2. Cauampe; 3. Isolado Cauamé; 4. Tumucumaque; 5. Isolado Tumucumaque. **60**
- Figura 4** - Solubilidade de sementes e de isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi em diferentes pHs, determinada pela razão percentual entre a quantidade de proteína solúvel e a quantidade de proteína total. **63**
- Figura 5** - Atividade Emulsificante em sementes e isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi Cauamé (A), Isolado Cauamé (B), Tumucumaque (C), Isolado Tumucumaque (D). **67**
- Figura 6** - Formação de espuma (A) e estabilidade da espuma (B) da semente do genótipo Cauamé de feijão- caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]. Formação de espuma (mL) das amostras em triplicada do genótipo Cauamé (A) e a estabilidade (mL) (B) após 120 min..... **69**
- Figura 7** - Formação de espuma (A) e estabilidade da espuma (B) do isolado proteico do genótipo Cauamé de feijão- caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]. Formação de espuma (mL) das amostras em triplicada do isolado proteico Cauamé (A) e a estabilidade (mL) (B) após 120 min..... **70**

Figura 8 - Figura 8 - Formação de espuma (A) e estabilidade da espuma (B) da semente do genótipo Tumucumaque de feijão- caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]. Formação de espuma (mL) das amostras em triplicada do genótipo Tumucumaque (A) e a estabilidade (mL) (B) após 120 min..... **71**

Figura 9 - Figura 9 - Formação de espuma (A) e estabilidade da espuma (B) do isolado proteico do genótipo Tumucumaque de feijão- caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]. Formação de espuma (mL) das amostras em triplicada do isolado proteico Tumucumaque (A) e a estabilidade (mL) (B), após 120 min **72**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estimativa da área cultivada e produção do feijão-caupi no Brasil, média do período de 2004 a 2008	22
Tabela 2 -	Propriedades funcionais das proteínas que influenciam em diferentes sistemas alimentícios	28
Tabela 3 -	Composição proximal (%) das sementes dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi expressa em peso seco	52
Tabela 4 -	Teor proteico (%) e rendimento dos isolados proteicos das sementes dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi	53
Tabela 5 -	Proteína solúvel em extrato bruto das sementes e dos isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi	55
Tabela 6 -	Inibidores de tripsina, quimotripsina e atividade hemaglutinante presentes em extrato bruto das sementes e dos isolados proteicos de genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [<i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp]	56
Tabela 7 -	Composição de aminoácidos (g.Kg de proteína ⁻¹) presentes em extrato bruto das sementes e dos isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi comparada ao requerimentos diários estabelecidos pela FAO/WHO/UNU para crianças.	57
Tabela 8 -	Digestibilidade <i>in vitro</i> das sementes e dos isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi	59
Tabela 9 -	Teores de proteínas (N x 6,25) presentes nas sementes dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi de acordo com a solubilidade frente às diferentes soluções de extração	61

Tabela10 -	Capacidades de absorção de água e de óleo de sementes e dos isolados proteicos dos genótipos cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi	64
Tabela 11 -	Atividade emulsificante e estabilidade da emulsão de sementes e dos isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [<i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp].....	66
Tabela 12 -	Capacidade de formação de espuma e estabilidade de sementes e dos isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [<i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp]	68
Tabela 13 -	Formação de gel de sementes e dos isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [<i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp]	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
AE	Atividade Emulsificante
CAA	Capacidade de Absorção de Água
CAO	Capacidade de Absorção de Óleo
EB	Extrato Bruto
EE	Estabilidade da Emulsão
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAT	Fibra Alimentar Total
gTI	Grama de Tripsina Inibida
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PI	Ponto Isoelétrico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	<i>N', N', N', N'</i> , tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Definição e Origem	20
1.2	Produção e Consumo	21
1.3	Importância Socioeconômica	22
1.4	Composição Química	23
1.4.1	<i>Proteínas</i>	24
1.4.2	<i>Carboidratos</i>	25
1.4.3	<i>Lipídeos</i>	26
1.5	Processo de Isolamento das Proteínas	26
1.6	Propriedades Funcionais	27
1.6.1	<i>Solubilidade</i>	28
1.6.2	<i>Capacidade de Absorção de Água e Óleo</i>	29
1.6.3	<i>Propriedades Emulsificantes</i>	31
1.6.4	<i>Espumabilidade</i>	31
1.6.5	<i>Geleificação</i>	32
1.7	Esolha dos Genótipos	33
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivos Gerais	35
2.2	Objetivos Específicos	35
3	MATERIAIS	36
3.1	Obtenção e Processamento dos Feijões	36
3.2	Animais de Laboratório e Alojamento	36
3.3	Reagentes Químicos e Outros Materiais	37
3.3.1	<i>Proteínas</i>	37
3.3.2	<i>Reagentes para Eletroforese</i>	37
4	METODOLOGIA	38
4.1	Caracterização Bioquímica da Farinha das Sementes e de Seus Isolados Proteicos	38
4.1.1	<i>Composição Proximal</i>	38
4.1.1.1	<i>Proteínas Totais</i>	38
4.1.1.2	<i>Lipídeos Totais</i>	38

4.1.1.3	<i>Material Mineral</i>	39
4.1.1.4	<i>Fibra Alimentar</i>	39
4.1.1.5	<i>Carboidratos Digeríveis</i>	40
4.1.2	<i>Preparo do Isolado Proteico</i>	40
4.1.3	<i>Preparo do Extrato Bruto</i>	42
4.1.4	<i>Quantificação das Proteínas Solúveis</i>	42
4.1.5	<i>Deteção e/ou Quantificação de Compostos Tóxicos e/ou Antinutricionais</i>	42
4.1.5.1	<i>Inibidor de Tripsina</i>	42
4.1.5.2	<i>Inibidor de Quimotripsina</i>	43
4.1.5.3	<i>Lectina</i>	43
4.1.5.4	<i>Toxicidade</i>	44
4.1.6	<i>Composição em Aminoácidos</i>	44
4.1.7	<i>Digestibilidade Sequencial in vitro</i>	45
4.1.8	<i>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS (PAGE-SDS)</i>	46
4.1.9	<i>Classe de Proteína</i>	46
4.2	Propriedades Funcionais	48
4.2.1	<i>Solubilidade</i>	48
4.2.2	<i>Capacidade de Absorção de Água e Óleo</i>	48
4.2.3	<i>Determinação da Atividade Emulsificante</i>	48
4.2.4	<i>Espumabilidade</i>	49
4.2.5	<i>Geleificação</i>	50
4.3	Análise Estatística	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Caracterização Bioquímica	51
5.1.1	<i>Composição Proximal</i>	51
5.1.2	<i>Isolado Proteico</i>	51
5.1.3	<i>Proteínas Solúveis</i>	54
5.1.4	<i>Compostos Tóxicos e/ou antinutricionais</i>	54
5.1.5	<i>Composição de aminoácidos</i>	54
5.1.6	<i>Digestibilidade in vitro</i>	58
5.1.7	<i>Perfil Eletroforético</i>	58
5.1.8	<i>Classe de Proteína</i>	58

5.2	Caracterização Funcional	62
5.2.1	<i>Solubilidade</i>	62
5.2.2	<i>Capacidade de Absorção de Água e Óleo</i>	62
5.2.3	<i>Atividade Emulsificante e Estabilidade</i>	65
5.2.4	<i>Espumabilidade</i>	65
5.2.5	<i>Geleificação</i>	65
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÃO	83
7	REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição e origem

O feijão-caupi é uma dicotilidônea pertencente à ordem Fabales, família fabaceae, tribo Phaseoleae, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (FREIRE FILHO *et al.*, 2005). O gênero *Phaseolus* possui cerca de 50 espécies, das quais cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lanatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman. Dentre os quais, o feijão-comum, *P. vulgaris*, é o mais importante, por ser a espécie cultivada mais antiga, principalmente na forma de semente e a mais utilizada nos cinco continentes (SANTOS; GALIVANTES, 1998; EFITA, 2012).

O feijão-caupi possui vários nomes vulgares, sendo conhecido como feijão-de-macácar ou de macaça, feijão-macáçar ou macaça e feijão de corda na Região Nordeste; feijão-da-colônia, feijão-de-praia e feijão-de-estrada na Região Norte; e feijão-miúdo na região sul. É também designado de feijão-catador e feijão-gurutuba em algumas regiões da Bahia e no norte de Minas Gerais e de feijão-fradinho nos Estados da Bahia e do Rio de Janeiro (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

A origem precisa do feijão-caupi foi durante muito tempo questionada. A Ásia e a África foram inicialmente apontadas como possíveis centros de origem. Entretanto, a ausência de linhagens selvagens na Ásia, como possível progenitor, levou a questionar a possível origem no centro asiático. Todas as evidências levam a crer que a origem e domesticação do feijão caupí ocorreu no continente Africano, sendo a África Ocidental o grande centro de diversidade de cultivares de feijão caupi, e que provavelmente foi domesticado por agricultores da região (GOMEZ, 2004; TIMKO, *et al.* 2007; TIMKO, SINGH, 2008).

O feijão-caupi se desenvolve tanto em condições ambientais favoráveis como apresenta excelente adaptação à seca, a altas temperaturas ou outro estresse abiótico, quando comparado a outras culturas, as quais dificilmente conseguiriam produzir grãos nessas condições. Esta espécie é tolerante à baixa fertilidade em função as suas altas taxas de fixação de nitrogênio, simbiose com micorrizas e a melhor capacidade de tolerar o solo em diferentes faixas de pH (TIMKO *et al.*, 2007; TIMKO; SINGH, 2008; IITA, 2012).

1.2 Produção e Consumo

O feijão é um alimento tradicional muito consumido pelos brasileiros, constituindo um dos principais componentes da dieta alimentar. Os grãos da referida leguminosa representam uma importante fonte de proteína, ferro e carboidratos na dieta humana dos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais (SEAB, 2012).

O consumo alimentar de feijão da população brasileira combina a tradicional dieta à base de arroz e feijão com alimentos pouco nutritivos e muito calóricos (SEAB, 2012). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (2011), o consumo alimentar médio de feijão *per capita* é de 14,94 kg/hab/ano.

Segundo a FAO a produção mundial de feijão seco incluindo os gêneros *Phaseolus* e *Vigna* em 2010 foi em torno de 22,9 milhões de toneladas, sendo a média de 2006 a 2010, de 21,2 milhões de toneladas. Os principais produtores mundiais são: Índia, Brasil, Mianmar, EUA, China e México, juntos respondendo por cerca de 65% da produção mundial. O Brasil, segundo maior produtor, isoladamente representa cerca de 14% (FAO, 2012).

A produção mundial de feijão advém dos gêneros *Phaseolus* e *Vigna*, sendo que este último envolve as diferentes cultivares de feijão-caupi. O feijão-caupi apresenta várias formas de utilização, sendo aproveitado principalmente como grãos secos para o consumo humano. A produção mundial de feijão-caupi, em 2007, atingiu 3,6 milhões de toneladas em 12,5 milhões de hectares (FIGUEIRAS *et al.*, 2009; EMBRAPA, 2012). Já em 2010, a produção foi de 5,6 milhões de toneladas. Esta produção foi alcançada por 36 países, entretanto, os maiores produtores foram Nigéria (40%) e Niger (31%) (FAO, 2012).

O feijão-caupi é cultivado em cerca de sete milhões de hectares em todo o mundo, predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo tendo como destaque a África, por ser o maior produtor, predominantemente na Nigéria e Niger, mas o Haiti, a Índia, o Brasil, os EUA e a Bósnia, apresentam produção significativa. No Brasil, o feijão-caupi é cultivado principalmente nas regiões Norte e Nordeste, tendo uma importância econômica e social significativa por ser um suprimento alimentar e gerar empregos para as populações rurais e urbanas (FREIRE FILHO, *et al.* 2005; IITA, 2012).

No Brasil, a produção de feijão-caupi concentra-se nas regiões Nordeste (1,2 milhões de hectares) e Norte (55,8 mil hectares) do país. Entretanto, a região Centro-Oeste começa a conquistar espaço, em função do desenvolvimento de cultivares com características que favorecem o cultivo mecanizado. O feijão-caupi contribui com 35,5% da área plantada e

15% da produção de feijão total (feijão-caupi + feijão comum) no país. (EMBRAPA, 2012). A Tabela 1 mostra a área cultivada e produção de feijão-caupi de 2004 a 2008.

Tabela 1- Estimativa da área cultivada e produção do feijão-caupi no Brasil, média do período de 2004 a 2008.

Região	Área Cultivada (ha)	Produção (t)
Norte	55.824	47.915
Nordeste	1.285.826	421.199
Centro-oeste	17.852	22.017
Brasil	1.319.168	482.324

Fonte: EMBRAPA (2012)

O aumento da produtividade de feijão comum é marcado pela evolução de práticas culturais, desenvolvimento de cultivares modernas e adoção de tecnologias pelos agricultores brasileiros. Esses fatores permitiram uma alavancada na produtividade, saindo dos 500 kg/ha em 1970 para 1.000 kg/ha em 2009/2010. Em alguns estados do país, em função da elevada tecnologia a produtividade supera os 2.000 kg/ha. (CONAB, 2011)

1.3 Importância Socioeconômica

O feijão é uma leguminosa que desempenha um importante papel na dieta da população na Ásia, América Central, América do Sul e em parte da África. A desnutrição proteico-calórica é um dos maiores problemas nutricionais enfrentados pelos países em desenvolvimento, principalmente por crianças pré-escolares. Em função do crescimento da população, este problema tende a aumentar no futuro. O fornecimento adequado de proteínas de origem animal é caro, sendo as proteínas de origem vegetal uma alternativa para melhorar o estado nutricional da população (PHILLIPS *et al.*, 2003; IQBAL *et al.*, 2006; DARFOUR *et al.*, 2012).

Leguminosas desempenham um importante papel na nutrição humana uma vez que são fontes de proteínas, calorias, fibras e certas vitaminas e minerais. Em populações afro-asiáticas, as leguminosas são as principais fontes de proteínas e calorias, devido ao poder econômico e cultural (HOFFMAN; FALVO, 2004; IQBAL *et al.*, 2006).

O interesse por novas fontes alimentares que forneçam proteínas a custos acessíveis às camadas de menor poder aquisitivo leva ao crescente interesse de se estudar as leguminosas. As proteínas de origem vegetal quando combinadas, podem proporcionar todos os aminoácidos essenciais, sendo considerada uma excelente fonte de proteína (HOFFMAN; FALVO, 2004). As misturas proteicas de origem vegetal têm-se tornado uma alternativa econômica, social e ecológica viável para a indústria de alimentos, com o intuito de suplementar dietas deficientes e agregar maior valor a essas fontes alimentícias (SANTOS *et al.*, 2012).

A utilização de produtos proteicos pela indústria de alimentícia tem mostrado um aumento significativo em função de suas características funcionais (capacidade de absorção de água e óleo, capacidade emulsificante, de formação de gel e formação de espuma). Nesse sentido, diversos estudos estão sendo realizados, com o objetivo de agregar valor funcional (industrial) e nutricional aos alimentos, sendo desenvolvidos isolados proteicos com diferentes alimentos, tais como: isolados proteicos de semente de goiaba (FONTANARI *et al.*, 2007), isolados proteicos das sementes de melão (HORAX *et al.*, 2011), isolados proteicos de feijão (RANGEL *et al.*, 2003), isolados proteicos de grão de bico (SÁNCHEZ-VIOQUE *et al.*, 1999), isolados proteicos de soja (VALLIM, 2011), isolados proteicos da casca do maracujá (SOUZA *et al.*, 2008), dentre outros.

1.4 Composição Química

O feijão-caupi é uma excelente fonte de proteína (23-25%), tendo duas a quatro vezes mais do que cereais e tubérculos; apresenta aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibra alimentar e baixa quantidade de gordura (2% em média) (EMBRAPA MEIO-NORTE, 2003, PHILLIPS *et al.*, 2003).

Estudo realizado com genótipos de feijão caupi revela que os teores de fibra alimentar podem variar de 19 a 35%, sendo considerado assim, uma excelente fonte deste nutriente (CARVALHO *et al.*, 2010). Segundo Salgado *et al.* (2005), o teor de fibra varia com a maturidade do grão, tendo o grão verde um maior teor deste carboidrato. Pesquisas revelam a importância do consumo de fibras devido ao papel terapêutico que elas exercem, estando relacionada com a prevenção e/ou redução de processos carcinogênicos, redução do colesterol plasmático, da glicemia e de doenças cardiovasculares (DONATTO *et al.*, 2006).

O feijão-caupi se destaca por ser rico em ácido fólico, uma vitamina B essencial para prevenir defeitos no tubo neural. Constitui ainda uma excelente fonte das vitaminas

tiamina (B₁), de niacina, de piridoxina (B₆) e de riboflavina (B₂). Dentre os minerais se destacam o ferro, o zinco, o potássio e o fósforo. Apresenta índice glicêmico mais baixo quando comparado com cereais ou tubérculos, pois o amido desta leguminosa é digerido de forma mais lenta não apresentando alterações abruptas dos níveis de glucose no sangue após o seu consumo (TIMKO *et al.*, 2007; GRANGEIRO *et al.*, 2005; PHILLIPS *et al.*, 2003).

1.4.1 Proteína

Uma característica marcante dos feijões é o seu alto teor proteico. Estudos revelam variedades de genótipos de feijão-caupi com percentagens de proteínas variando de 19 a 26%, podendo chegar a 40 % (MAIA *et al.*, 2000; ONWULIRI; OBU, 2002; FROTA *et al.* 2008b). Outras leguminosas como o grão de bico, a lentilha e a ervilha, apresentam 24, 26 e 24,9% de proteína, respectivamente (IQBAL, 2006).

Em feijões como em outras leguminosas, as proteínas de reserva representam cerca de 80% das proteínas totais das sementes. Apresentam predominantemente globulinas e albuminas, e, ao contrário dos grãos de cereais, praticamente não contêm prolaminas e um teor relativamente baixo de glutelina. A fração globulina representa de 33,1 a 47,6%; albumina, 15,4 a 29,3%; glutelinas básicas, 6,4 a 20,2%, glutelinas ácidas, 3,8 a 11,7% e prolaminas 1,1 a 3,2%. A proporção de globulina:albumina está na faixa de 2:1 a 3:1. (SGARBIERE, 1996a; GRANGEIRO *et al.*, 2005).

Em relação à composição aminoacídica, o feijão-caupi é rico em lisina e triptofano, quando comparado com grão de cereais, entretanto é deficiente em metionina e cisteína quando comparado a proteínas de origem animal (GRANGEIRO *et al.*, 2005; TIMKO *et al.*, 2007).

Apesar de ser uma excelente fonte proteica, quando ingerido isoladamente o feijão é considerado uma fonte de proteína de baixo valor biológico quando comparado com as de origem animal. Isso ocorre, em função de sua baixa digestibilidade e pelo reduzido teor e biodisponibilidade de aminoácidos sulfurados. Daí a importância da dieta mista, contendo feijão e cereais, tais como arroz e milho, em decorrência do efeito complementar desses alimentos, o feijão com alto conteúdo de lisina, e os cereais, constituídos de aminoácidos sulfurados (GRANGEIRO *et al.*, 2005; TIMKO *et al.*, 2007).

As leguminosas de um modo geral apresentam fatores tóxicos e/ou antinutricionais que quando consumidos podem causar respostas adversas no organismo. Os de maior relevância encontrados no feijão-caupi são as lectinas e os inibidores de proteases.

Outros não proteicos de destaque são os taninos e ácido fítico. As lectinas são proteínas (ou glicoproteínas) que possuem a capacidade de reconhecer com alta especificidade e de se ligar de forma reversível a resíduos de carboidratos, sem alterar a estrutura química deles. Os efeitos tóxicos e antinutricionais das lectinas de origem vegetal resultam da interação destas com glicoconjugados da superfície celular das células epiteliais do trato digestório. Esta interação ocorre em função das lectinas serem resistentes à degradação proteolítica, e uma quantidade considerável das moléculas presentes na dieta permanecer intacta e reativa. A ligação das lectinas aos enterócitos promove desarranjos estruturais e morfológicos da borda em escova, estimulação da secreção de nitrogênio endógeno e redução da atividade enzimática intestinal. Estudos mostram a presença de lectina nas sementes de cultivares de feijão-caupi, estas apresentam alta estabilidade térmica tornando-as resistentes ao calor, sendo necessário que sejam adequadamente cozidas antes de consumida pela população (SGARBIERE, 1996a; GRANGEIRO *et al.*, 2005).

Os inibidores de proteases inibem com alta especificidade ação de enzimas proteolíticas, como tripsina e quimiotripsina. Nas sementes de feijão-caupi são encontrados vários inibidores de tripsina e quimiotripsina, com massa molecular de 8 kDa; são ricos em cisteína, formam pontes dissulfeto e são classificados como Bowman-Birk. São extremamente estáveis ao tratamento térmico e ao pH (GRANGEIRO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2001).

1.4.2 Carboidratos

Os carboidratos constituem a principal reserva armazenada na maioria das sementes cultivadas como fonte de alimento. O amido é o carboidrato mais comumente encontrado nas sementes. Estudos realizados com genótipos de feijão-caupi desenvolvidos no Nordeste, apresentaram teor de carboidrato variando de 51,09 a 74,54 % (GRANGEIRO *et al.*, 2005). Maia *et al.*, (2000) encontraram teores de carboidratos variando de 67,8 a 76,1%.

Além dos polissacarídeos de reserva, as leguminosas contêm oligossacarídeos causadores de flatulência. Os açúcares são a rafinose, verbascose e estaquiose os quais não são digeridos pelo homem por causa da falta das enzimas alfagalactosidase e betafrutósídease, assim que alcançam o intestino grosso e são metabolizados por uma variedade de microorganismos do cólon, que os hidrolisam e fermentam; esses carboidratos produzem gases ou flatos. Este fenômeno limita a aceitação e utilização do feijão-caupi (ONYENEKWE *et al.*, 2000; GRANGEIRO *et al.*, 2005).

Estudo realizado por Onyenekwe (2000) com cinco cultivares de feijão-caupi mostrou que os teores de rafinose variaram de 1,14 a 1,33% e os de estaquiose 3,5 a 4,20%.

1.4.3 Lipídeos

Estudo realizado no Nordeste brasileiro com 30 genótipos de feijão-caupi demonstrou que o teor de lipídeos é baixo, variando de 1,0 a 1,4% (CARVALHO *et al.*, 2012). Pesquisa também realizada no Nordeste com outros genótipos do referido feijão apresentou valores superiores, com uma variação de 1,22 a 3,58% (MAIA *et al.*, 2000). O teor lipídico pode variar de acordo com o genótipo, origem, localização, clima, condições ambientais e tipo de solo no qual elas crescem (FROTA, 2008b). Os ácidos graxos predominantes nestas sementes são os insaturados e desses, os ácidos oleicos e linoleico compreendem mais de 60% (GRANGEIRO *et al.*, 2005).

1.5 Processo de Isolamento das Proteínas

O isolamento das proteínas consiste na solubilização das proteínas de um alimento em uma solução aquosa alcalina, separando-se o material insolúvel numa primeira centrifugação. O sobrenadante sofre então ajuste de pH com solução ácida, até um valor próximo ao ponto isoeletrico. Quase todas as proteínas dos alimentos são ácidas, exibindo a solubilidade mínima em pH de 4-5 e solubilidade máxima em pH alcalino (RAPHAEL, 1997; DAMADORAN, 2010). Após ter sido atingido o pH no ponto isoeletrico (pH igual ao PI), a solução fica em repouso para que as proteínas se agreguem e precipitem. Nova centrifugação é realizada, descarta-se o sobrenadante, e no precipitado, a maior parte das proteínas devem estar presente (FROTA, 2007).

Antes de realizar o processo de obtenção de isolados proteicos, é necessário que a amostra seja delipidada, pois a gordura pode formar uma emulsão durante o processo de extração da proteína. Em testes realizados para obtenção de isolados proteicos com farinha de feijão-caupi sem delipidar, resultou em produtos com baixa pureza (apenas 50% de proteína), indicando que a delipidação se faz necessária mesmo em baixas concentrações de lipídeos para melhorar a eficiência do processo (ABBOT *et al.*, 1991; SATHE *et al.*, 2002; FROTA, 2007).

Estudos sobre obtenção de isolados proteicos de feijão caupi, através do método de precipitação isoeletrica, demonstraram conteúdo proteico variando de 75 a 92%, essa

diferença pode ter ocorrido em função da ausência de delipidação, maior teor proteico da semente utilizada, ou diferença na metodologia, tal como diferente concentração utilizada e/ou a realização ou não de reextração (HORAX *et al.* 2004; FROTA, 2007; KHALID, *et al* 2012) .

1.6 Propriedades Funcionais

Propriedade funcional é definida como qualquer propriedade de um alimento ou componente de um alimento, excetuando-se as nutricionais, que influencia a sua aceitação e utilização. A funcionalidade ou valor funcional é definido como o somatório das propriedades funcionais de um alimento ou ingredientes alimentícios. As propriedades funcionais são as várias características que a proteína hidratada propicia ou com a qual contribui em um produto alimentício, destacando-se: solubilidade, hidrofobicidade, capacidade de absorção de água e óleo, viscosidade, capacidade emulsificante, formação de géis e formação de espumas (SGARBIERI, 1996b; CÂNDIDO, 1998).

A funcionalidade das proteínas dos alimentos refere-se às propriedades físico-químicas que influenciam no desempenho das proteínas dos sistemas alimentares durante o processamento, armazenamento, preparo e consumo. Os atributos sensoriais dos alimentos são obtidos pelas interações complexas entre vários ingredientes funcionais (SGARBIERI, 1996; CÂNDIDO, 1998; DAMODARAN, 2010).

As propriedades físico-químicas que controlam a funcionalidade proteica incluem tamanho, forma, composição e sequência dos aminoácidos, carga líquida e distribuição das cargas, razão de hidrofobicidade/hidrofiliidade, estruturas secundárias, terciárias e quaternárias; flexibilidade e rigidez molecular e capacidade de interagir/reagir com outros componentes (DAMODARAN, 2010).

As propriedades funcionais das proteínas podem ser modificadas por agentes físicos, químicos e biológicos, nos processos de obtenção ou isolamento de proteínas, o tipo de extração utilizado, a temperatura, o pH, a força iônica, e as condições de secagem e estocagem da proteína isolada (SGARBIERI, 1996a).

A utilização de proteínas de origem vegetal na indústria de alimentos depende da versatilidade de suas propriedades funcionais, as quais são influenciadas por fatores intrínsecos, além das condições e métodos de concentração, sendo a precipitação isoelétrica o processo mais utilizado para concentrar proteínas (RODRÍGO-AMBRIZ *et al.*, 2005).

Segundo Aremu *et al.* (2007), as proteínas de sementes possuem requisitos essenciais para as propriedades funcionais, podendo ser utilizadas em vários produtos alimentares (Tabela 2). A utilização de farinha de feijão em produtos alimentares é atribuída à sua funcionalidade, em termos de hidratação, formação de espuma, gelificação e textura (PRINYAWIWATKUL *et al.*, 1997).

Tabela 2 - Propriedades funcionais das proteínas que influenciam em diferentes sistemas alimentícios

Propriedade Funcional	Alimentos
Solubilidade, viscosidade	Bebidas
Viscosidade, capacidade de absorção de água emulsificação	Crems, sopas e molhos
Formação de massa	Massas alimentícias, pães
Formação de espuma, emulsificação, Capacidade de absorção de água	Pães, bolos e biscoitos
Geleificação, formação de espuma	Sobremesas lácteas, merengue
Emulsificação, viscosidade, geleificação	Queijos
Geleificação, capacidade de absorção de água, emulsificação	Produtos cárneos cozidos
Texturização, fixação de aromas, absorção de água	Similares da carne
Emulsificação	Maionese, manteiga
Geleificação, formação de espuma	Produtos de ovos
Absorção de gordura	Salsicha, mortadela, linguiça, Patê de carne

Fonte: Ordoñez *et al.* (2005)

1.6.1 Solubilidade

A água é um constituinte essencial dos alimentos, as propriedades reológicas e texturiais dependem da interação da água com outros constituintes do alimento, em especial as proteínas e os polissacarídeos. A solubilidade da proteína é influenciada por vários fatores como: massa molecular, densidade e distribuição das cargas elétricas, que por sua vez é

influenciada pelo pH, natureza e concentração dos íons ou força iônica, interações hidrofóbicas e temperatura. As interações hidrofóbicas promovem as interações proteína-proteína, resultando, assim, na diminuição da solubilidade. Em contrapartida, as interações iônicas, promovem a interação proteína água, aumentando, assim, a solubilidade (SGARBIERI, 1996b; DAMORARAM, 2010).

1.6.2 Capacidade de Absorção de Água

A Capacidade de absorção de água está relacionada com a capacidade de hidratação de uma proteína e da capacidade de reter água absorvida contra a força da gravidade dentro de uma matriz proteica, o que depende, em parte, da sua composição de aminoácidos; quanto maior o número de resíduos carregados, maior a capacidade de hidratação da proteína. Esta propriedade pode indicar a potencial aplicabilidade de um isolado ou concentrado proteico em sistemas alimentares aquosos, especialmente naqueles que envolvem a elaboração de massas (SGARBIERI, 1996b; SILVA-SÁNCHEZ *et al.*, 2004; DAMORARAM, 2010).

A atração hidrofílica pode ser medida como o grau de hidratação (conteúdo de água/g de proteína) e como a habilidade do produto para captar água espontaneamente (esponjamento). Também pode está relacionada com a quantidade de água que permanece na proteína após exposição a um excesso de água e aplicação de uma força de centrifugação ou pressão (SGARBIERI, 1996b).

A capacidade de entumescimento ou absorção de água depende de fatores extrínsecos como o tipo ou composição de material proteico, tempo de contato com a água, força iônica do meio e temperatura do processamento, e de propriedades intrínsecas das proteínas como estrutura e organização espacial (SANTOS, 2009).

Os resultados da capacidade de absorção de água e/ou de óleo são geralmente expressos em gramas de água e/ou de óleo absorvido por grama de proteína ou ainda mililitro de água e ou óleo por grama de proteína (SANTOS, 2009). Sathe *et al.*, (1982), considerando a densidade da água igual a 1g/mL e a densidade do óleo 0,93 g/mL, expressam, dessa forma, a capacidade de absorção de água e óleo por g de água e/ou óleo por grama de amostra.

A capacidade de absorção de água e de óleo elevada é essencial na formulação de sistemas alimentares, como salsichas, massas de bolo, maioneses e molhos para saladas (CHANGI; SOGI, 2007). A propriedade de absorção de água e de óleo poderá determinar se o material proteico terá um bom desempenho em produtos cárneos, sendo a hidrofobicidade

das moléculas proteicas o principal mecanismo para esta interação (MIZUBUTI *et al.*, 2000; SÁNCHEZ *et al.*, 2004; CASTILLO *et al.* 2008).

Estudo realizado por Fontanari *et al.* (2007), com isolados proteicos de semente de goiaba, obtidos através de precipitação isoeletrica, mostrou capacidade de absorção de água variando de 1,0 a 1,75 mL/g de proteína; já a capacidade de absorção de óleo variou de 1,75 a 2,25 mL/g de proteína. Os mesmos autores justificaram a maior capacidade de absorção de óleo pela interação das sequencias dos grupos de aminoácidos apolares que expondo mais áreas de microdomínios hidrofóbicos, leva a uma maior retenção de óleo. Já pesquisa realizada por Appiah *et al.* (2011) com três variedades de feijão caupi apresentou melhores resultados em relação à absorção de água (1,89 a 2,13), e resultado semelhante (1,95 a 2,31) em relação a absorção de óleo.

1.6.3 Propriedades emulsificantes

As emulsões são dispersões de um líquido em outro líquido. Podem ter dois tipos de emulsões, dependendo da composição das fases. Quando a água é a fase contínua (externa) e o óleo ou gordura a fase interna (descontínua), tem-se o tipo de emulsão de óleo em água. Quando a água é a fase interna e o óleo a fase externa tem-se uma emulsão de água em óleo (SGARBIERI, 1996b; ORNELLAS *et al.* 2000; WALSTRA; VLIET, 2010).

As proteínas despertam grande interesse na indústria de alimentos devido as suas propriedades industriais e funcionais, que contribuem para a firmeza das emulsões, aumentam a sua estabilidade e conferem ao produto maior valor nutritivo. A principal característica desse agente emulsificante é a de ser anfifílica, o que permite a formação de uma camada entre as duas fases, separando-as e impedindo que os glóbulos da fase interna coalesçam, desempenhando uma importante função de estabilização da matriz da membrana (HEKKEN e STRANGE, 1993; SGARBIERI, 1996b; CANO-MEDINA *et al.*, 2011).

A emulsão é uma importante propriedade funcional das proteínas que afeta o comportamento de vários produtos industriais, incluindo adesivos, cosméticos e material de embalagem. Vários alimentos naturais ou processados apresentam propriedade emulsificante, tais como, leite, gema do ovo, manteiga, margarina, maionese, salsicha, lingüiça, dentre outros (DAMADORAN, 2010; CANO-MEDINA *et al.*, 2011).

Alguns fatores podem afetar a formação e estabilidade de uma emulsão, como a temperatura, o tamanho das partículas de gordura, pH, quantidade e tipo de proteína e viscosidade da emulsão. A viscosidade tem uma relação direta com a emulsão, indicando que

quanto maior a viscosidade, mais estável se apresenta a emulsão. A temperatura quando muito alta diminui a viscosidade do óleo, aumentando a área superficial e facilitando a coalescência das partículas de lipídeo. A temperatura ideal para a manutenção da emulsão é em torno de 20° C (SGARBIERI, 1996b; WALSTRA e VLIET, 2010).

1.6.4 Espumabilidade

A formação de espuma refere-se à expansão de volume da dispersão proteica com a incorporação de ar por batimento, agitação e aeração. As proteínas podem agir como estabilizadores desse sistema, acumulando-se na interface ar-água, alterando as propriedades de superfície. A capacidade de formação de espuma depende, da natureza aminoacídica da proteína, do pH, da solubilidade, da temperatura (desnaturação) e da presença de sais junto à proteína (SGARBIERI, 1996b; ZAVARESE *et al.*, 2000; ROUIMI *et al.*, 2005).

Estudos relatam que as espumas são mais estáveis em pH isoeletrico, portanto que não tenha insolubilização no pI, isto ocorre em função da ausência de interações repulsivas, promovendo assim, interações mais favoráveis de proteína-proteína e a formação de uma película viscosa na interfase. Além disso, ocorre aumento da quantidade de proteína adsorvida à interface e às moléculas de adsorção, contribuindo, tanto para a espumabilidade como para a estabilidade da espuma. Entretanto, caso a concentração da fração solúvel seja muito baixa, a capacidade de formação de espuma será menor, mas a estabilidade dela será maior. (FURTADO *et al.*, 2001; DAMADORAM, 2010).

Outro fator de destaque que influencia na formação e estabilidade da espuma é a concentração de proteína. Quanto maior a concentração proteica, mais firme será a espuma. A firmeza ocorre devido ao pequeno tamanho da bolha e da alta viscosidade. A estabilidade é aumentada por grandes concentrações proteicas, uma vez que se aumenta a viscosidade e facilita a formação de uma película proteica coesiva de múltiplas camadas na interfase. (DAMADORAM, 2010).

Muitos alimentos processados são do tipo espuma, como cremes batidos, sorvetes, merengues, bolos, pães, suflês, mousses e marshmallows. As propriedades texturiais próprias destes alimentos ocorrem em função das minúsculas bolhas de ar dispersas (ALLEONI, 2006; DAMADORAM, 2010).

A capacidade de formação de espuma pode variar de acordo com os métodos e equipamentos utilizados para a sua preparação. A espuma é formada por um misturador ou agitador, ocorrendo expansão do volume proteico, sendo mensurado através de cilindro

graduado. A estabilidade da espuma refere-se ao volume máximo da espuma formada em função do tempo de repouso, sendo geralmente medida pela liberação de fluido da espuma (SGARBIERI, 1996b; LOMAKINA e MIKOVÁ, 2006).

1.6.5 Geleificação

O gel é uma fase intermediária entre o sólido e o líquido, sendo composto de polímeros em ligação cruzada por meio de ligação covalentes ou não covalentes para a formação de uma rede capaz de aprisionar água, bem como outras substâncias de baixa massa molecular. Este processo ocorre pela transformação do líquido viscoso numa matriz elástica (ALLEONI, 2006; DAMORARAM, 2010)

A maior parte dos géis proteicos de alimentos é preparada por meio do aquecimento de uma solução proteica moderadamente concentrada. Nessa fase a proteína no estado sol é primeiramente transformada no estado pró-gel, por meio da desnaturação. No estado pró-gel um número importante de grupos funcionais como pontes de hidrogênio e grupos hidrofóbicos ficam expostos, de modo que a segunda etapa pode ocorrer. Quando o pró-gel é resfriado até a temperatura ambiente ou de refrigeração, a diminuição da energia cinética térmica facilita a formação de ligações não covalentes estáveis entre os grupos funcionais expostos das moléculas, constituindo-se, assim, a geleificação (ANDRADE e NASSER, 2005; DAMADORAM, 2010).

A integridade física dos géis depende do equilíbrio das forças atrativas e repulsivas das moléculas de proteínas envolvidas no sistema. Se as forças atrativas predominam, um coágulo é formado e a água é conduzida para fora da matriz da rede. Se as forças repulsivas dominam, uma imagem tridimensional da rede não pode ser formada. A natureza e propriedades dos géis são influenciadas por vários fatores como concentração de proteína, pH da solução e natureza e concentração de eletrólitos (TOTOSAUS *et al.*, 2002; ALLEONI, 2006).

A formação de gel é de grande importância no processamento de alimentos e no desenvolvimento de novos produtos, em função da textura que o gel proporciona ao alimento. A exemplo de alimentos que utilizam dessa propriedade, podemos citar sobremesas, pudins, produtos cárneos e tofu (ALLEONI, 2006).

1.7 Escolha dos Genótipos

O feijão-caupi possui grande variabilidade genética que o torna versátil, sendo usado para várias finalidades e em diversos sistemas de produção. O melhoramento genético do feijão-caupi, tem sido desenvolvido, com as seguintes finalidades: aumentar a produtividade e melhorar a qualidade visual, aumentar a adaptabilidade, a estabilidade e tolerância a estresses hídricos, desenvolver cultivares com arquitetura moderna e mais adaptada à agricultura familiar, incorporar resistência múltipla a doenças e aumentar a resistência a insetos (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

A Embrapa Meio-Norte (Centro de pesquisa Agropecuária Meio-Norte – CPAMN) coordena as pesquisas com feijão-caupi desde 1991, desenvolvendo estratégias e metodologias de melhoramento genético. O esquema utilizado para a obtenção de cultivares melhorados de feijão-caupi, consta das seguintes etapas: seleção de parentais, formação da população básica, avanço de geração, com descarte das plantas com sintomas severos da doença e ataque severo de pragas, formação de linhagens teste de produtividade, formação da semente genética, lançamento de novos cultivares.

Estudo realizado Sousa (2010) com 30 genótipos de feijão-caupi fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Meio-Norte, Teresina, Piauí, objetivou dentre aqueles genótipos detentores de boas propriedades agronômicas, identificar aqueles de superior qualidade nutricional e funcional para serem sugeridos como parentais em programas de melhoramento, visando o desenvolvimento de cultivares de alto valor nutricional e comercial.

Sousa (2010) criou para avaliar os trinta genótipos e compará-los em termos de qualidade nutricional o índice de qualidade nutricional (IQN). Para tanto, foi levado em consideração a importância do feijão como fonte de proteína, ferro, zinco e fibra, além de níveis moderados de fatores tóxicos e/ou antinutricionais, como inibidores de tripsina, inibidores de quimotripsina e lectinas. Foi estabelecido com base nos valores desejáveis, um valor limítrofe mínimo e máximo para os indesejáveis. Quando o valor era superior ao limítrofe, o resultado era positivo, e negativo se fosse menor. Para as características indesejáveis, o inverso era verdadeiro. Em seguida cada valor foi multiplicado pelo seu peso de acordo com a característica em questão e procedeu-se com a soma algébrica de cada termo. O resultado final foi então dividido pela soma dos pesos.

Após realizar o cálculo do IQN, os genótipos foram classificados em ordem decrescente, indicando os que obtiveram maior qualidade nutricional. Dos trinta genótipos avaliados, o Cauamé (1º) e o Tumucumaque (2º), apresentaram melhores resultados, respectivamente, sendo então escolhidos para o presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Obter isolados proteicos de genótipos de excelência de feijão-caupi bem como caracterizar bioquímica e funcionalmente esses isolados e suas sementes.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver metodologias para obtenção dos isolados proteicos a partir de farinha de genótipos de feijão-caupi;
- Realizar a caracterização bioquímica da farinha das sementes de feijão por meio de determinação da composição proximal, quantificação das principais classes de proteínas, determinação do perfil eletroforético e de aminoácidos das proteínas, avaliação *in vitro* da digestibilidade proteica e avaliação da presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais;
- Realizar a caracterização bioquímica dos isolados proteicos por meio da determinação do teor proteico e rendimento, determinação do perfil eletroforético e de aminoácidos das proteínas e avaliação *in vitro* da digestibilidade proteica;
- Caracterizar funcionalmente os isolados proteicos e as farinhas das sementes quanto à solubilidade, capacidade de absorção de água e de óleo, atividade emulsificante, espumabilidade e gelificação.

3 MATERIAL

3.1 Obtenção e processamento dos feijões

As sementes de feijão-caupi foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Meio-Norte, Teresina, Piauí. Os genótipos utilizados (Cauamé e Tumucumaque) foram desenvolvidos através de técnicas de melhoramento genético convencional.

As sementes foram moídas em moinho elétrico para grãos de café (Cadence, Caxias do Sul, Brasil). Em seguida, a farinha foi peneirada em malha de 1,0 mm² e posta em estufa (FANEM, Modelo 002 CB, São Paulo, Brasil) a 45° C por 24 h para a obtenção de material homogêneo e livre de umidade. Parte da farinha obtida foi delipidada a frio com hexano, na proporção de 1:3 (p/v), perfazendo um total de quatro trocas de solvente. O hexano foi separado da farinha em capela de exaustão à temperatura ambiente. As farinhas, integral e delipidada, foram acondicionadas a 4° C em potes plásticos hermeticamente fechados até a realização das análises.

3.2 Animais de Laboratório e Alojamento

Um coelho da raça Nova Zelândia com três meses de idade foi adquirido junto ao setor de cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFC. O coelho foi mantido no Biotério de Manutenção do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC com água e ração apropriadas *ad libitum*. Camundongos machos convencionais da linhagem Swiss foram adquiridos do Biotério Central da UFC (Biocen-UFC) com 3 semanas de idade. Os animais foram alojados no Biotério Experimental do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec), do Departamento de Biologia da UFC, com temperatura (23,0 ± 2,0 °C) e fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro) controlados. Os Camundongos foram mantidos em número adequado em caixas de polipropileno com substrato de raspa de pinho, água e ração (Nutrilabor, Campinas, São Paulo, Brasil) *ad libitum* até atingirem cerca de 20 g. Os protocolos utilizados com animais de laboratório são todos autorizados pelo Comitê de Ética em Experimental Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, onde o projeto foi submetido (Protocolo N^o 34/09) para parecer formal, seguindo a Legislação vigente (Lei No. 11.794/2008), que regulamenta a criação e uso de animais de laboratório na pesquisa científica no Brasil.

3.3 Reagentes Químicos e Outros Materiais

3.3.1 Proteínas

Albumina sérica bovina (BSA), marcadores de massa molecular e proteases foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EEUU) e da AMRESCO Inc. (Ohio, EEUU).

3.3.2 Reagentes para Eletroforese

Acrilamida, Coomassie Brilliant Blue R-250, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), TEMED (*N', N', N', N'*- tetrametiletilenodiamina), trizma-base, metilenobisacrilamida, β -mercaptoetanol, nitrato de prata e demais reagentes foram comprados das empresas Amersham Biosciences (Piscataway, EEUU), Sigma-Aldrich Co. (St Louis, EEUU), Acros Organics (Geel, Bélgica) e AMRESCO Inc. (Ohio, EEUU).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e estão citados no decorrer da descrição da metodologia, assim como todos os equipamentos usados nos experimentos.

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização Bioquímica da farinha das sementes e de seus isolados proteicos

4.1.1 Composição Proximal

4.1.1.1 Proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas em triplicata das amostras de farinha das sementes e de isolados proteicos de feijão-caupi segundo o método Microkjeldahl, utilizando o fator 6,25 para conversão do teor de N em teor de proteína. Balões de Kjeldahl contendo 0,05 g de amostra, 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,5 g de mistura catalítica (sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio metálico, 100:10:1, respectivamente), foram levados para um digestor (Modelo MA 448, Marconi, Piracicaba, Brasil) e deixados por 1 h após atingir 400 °C. Em seguida, o material digerido foi transferido para balões volumétricos de 50 mL, que tiveram seus volumes aferidos com água deionizada. O teor de nitrogênio foi obtida por ensaio fotolorimétrico como descrito por Baethgen e Alley (1989), utilizando uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de sulfato de amônio (Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.1.1.2 Lipídeos totais

O teor de lipídios totais das amostras de farinha das sementes de feijão foi determinado em triplicata segundo o método descrito pela AOAC (1997). Amostras de 5 g foram pesadas em balança analítica (Bioprecisa, Modelo FA2104N, São Paulo, Brasil) e depositadas em cartuchos de papel de filtro, sendo, então, transferidas para um sistema de Soxhlet 303 mm. A extração foi contínua durante 8 h, sendo o *n*-hexano utilizado como solvente, na proporção de 1:5 (p/v). Em seguida, o solvente foi evaporado em capela de exaustão 'overnight' e estufa de secagem por 4 h. Os lipídios totais foram calculados pela diferença entre os pesos inicial e final dos balões, para posterior cálculo do percentual em relação à amostra bruta inicial.

4.1.1.3 Material mineral

A matéria mineral foi determinada em triplicata de acordo com a metodologia preconizada pela AOAC (1997). Amostras pesando 1 g foram levadas em cadinhos de porcelana a forno mufla (Quimis, Modelo Q-318m24, Diadema, Brasil), e calcinizadas à temperatura de 550° C por 4 h. O valor da matéria mineral foi determinado pela diferença entre os pesos inicial e final dos cadinhos.

4.1.1.4 Fibra Alimentar

A determinação do teor de fibra alimentar da farinha das sementes de feijão foi realizada seguindo a metodologia descrita pela AOAC (1997) e utilizando o kit para ensaio de fibra alimentar total TDF-100A (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EEUU). Amostras delipidadas secas foram primeiramente gelatinizadas com alfa-amilase termo estáveis. Logo depois, foram digeridas enzimaticamente com protease e amiloglucosidase para remover as proteínas e amido, respectivamente, presentes na amostra. Em seguida, foi adicionado etanol 95% para precipitar a fibra solúvel. O resíduo foi então filtrado e lavado com etanol e acetona. Depois de secos, os resíduos foram pesados. Metade dos resíduos de cada amostra foi analisada para proteínas totais e o restante para matéria mineral (segundo os tópicos 4.1.1 e 4.1.3, respectivamente). Paralelamente às amostras, foi realizado um ensaio branco, onde nenhuma amostra estava presente. O teor de fibra alimentar total (FAT) das amostras foi calculado de acordo com a fórmula.

$$\% \text{ FAT} = \frac{R_{(a)} - P_{(a)} - C_{(a)} - B}{P_i(a)}$$

Onde:

R (a) = Peso do resíduo da amostra

P(a) = Peso das proteínas da amostra

C (a) = Peso da matéria mineral (cinzas) da amostra

B = Resíduo (branco) – Proteína (branco) – Cinzas (branco)

Pi(a) = Peso inicial da amostra (mg).

B = R_{branco} – P_{branco} – A_{branco}

4.1.1.5 Carboidratos digeríveis

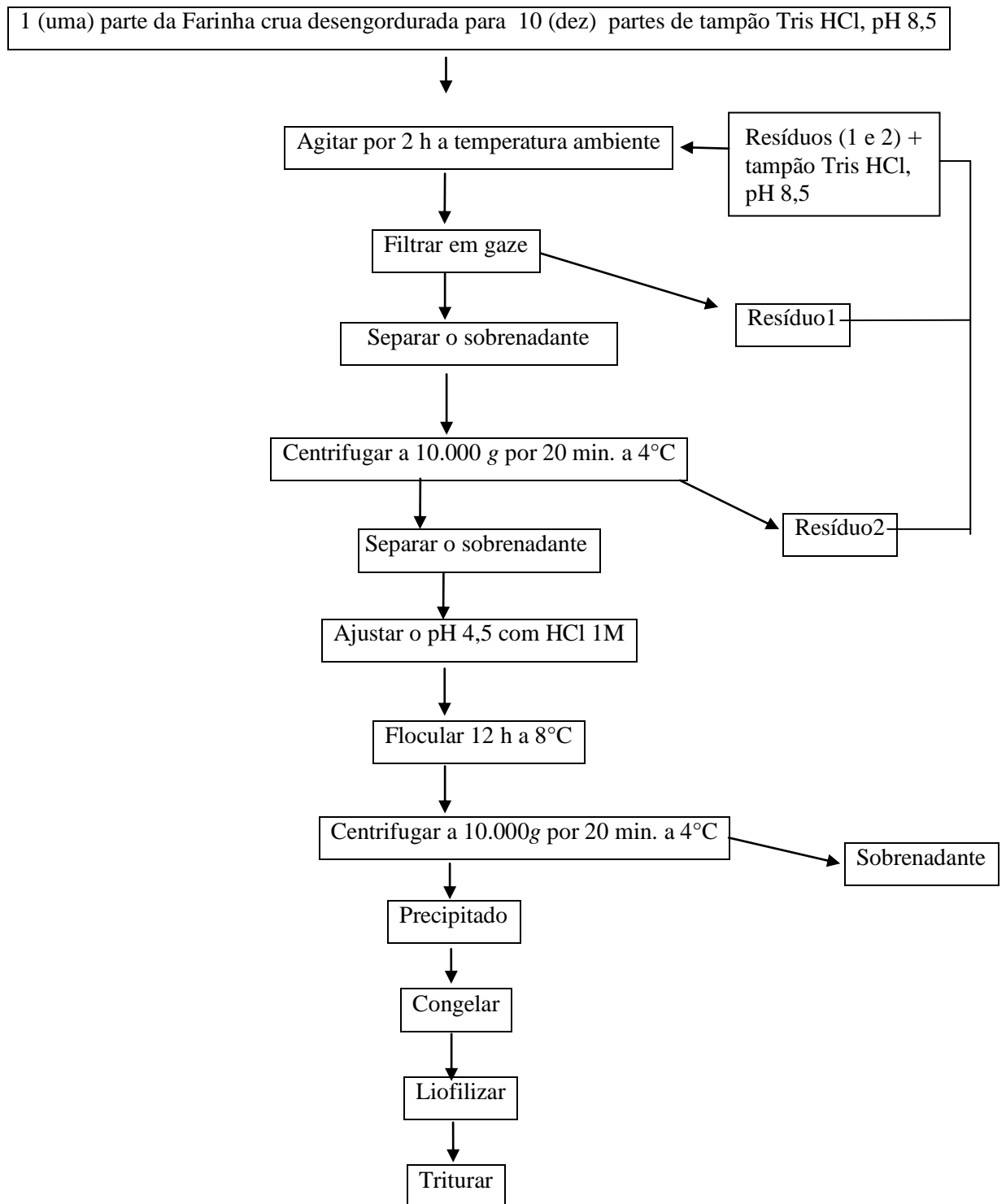
O percentual de carboidratos digeríveis foi calculado por diferença dos demais constituintes analisados (proteínas totais, lipídeos totais, matéria mineral e fibra alimentar total), de forma que o total some 100%.

4.1.2 Preparo do isolado proteico

A obtenção de isolado proteico foi realizada segundo Frota (2007) com alterações, com o objetivo de aumentar o teor proteico, o rendimento e/ou reduzir o custo de produção. Inicialmente foram realizados os seguintes testes com a farinha de feijão-caupi do genótipo cauamé: farinha delipidada extraída com tampão tris-HCl (50 mM) na proporção 1/10; farinha integral extraída com tampão tris-HCl na proporção 1/10; farinha delipidada extraída com tampão tris-HCl na proporção 1/20; farinha integral extraída com tampão tris-HCl na proporção 1/20; e farinha integral extraída com tampão tris-HCl na proporção 1/10 com reextração.

Ao analisar os resultados, a farinha integral extraída com tampão tris-HCl na proporção 1/10 seguida de reextração apresentou melhor rendimento (43,44%), entretanto o teor proteico encontrado foi abaixo de 80%. Optou-se para a obtenção do isolado a farinha delipidada, na concentração de 1/10 e reextração, pois foi o que obteve maior teor proteico e segundo maior rendimento. Os isolados proteicos foram obtidos, conforme Figura 1.

Figura1 - Fluxograma para a obtenção do isolado proteico de feijão caupi, em pH 8,5 com tampão Tris-HCl para solubilização da proteína.



4.1.3 Preparo do extrato bruto

A farinha delipidada foi extraída em solução Tris HCl 50 mM com NaCl 200 mM, pH 8,5, mantendo a proporção 1:10 (p/v). A extração foi realizada por 4 h, sob agitação constante, em ambiente refrigerado a 4° C. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 x g, por 30 min a 4° C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante denominado extrato bruto (EB) (FROTA, 2008).

4.1.4 Quantificação de proteínas solúveis totais

A dosagem das proteínas solúveis do extrato bruto e dos isolados proteicos de feijão-caupi foi determinada pelo método de Bradford (1976). A uma alíquota de 100 µL, em tampões de extração, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 min foram feitas as leituras das absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro (Genesys 10, Spectronic Unicam, New York, EEUU). A concentração foi estimada em relação a uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de albumina sérica (BSA) (Sigma A2153) em NaCl 0,9%.

4.1.5 Detecção e/ou quantificação de compostos tóxicos e/ou antinutricionais

4.1.5.1 Inibidor de tripsina

O ensaio para a detecção do inibidor de tripsina dos genótipos estudados, bem como dos isolados proteicos dos referidos genótipos foi realizado segundo Erlanger *et al.* (1961). Vinte microlitros de solução de tripsina bovina (Sigma T8003) (0,3 mg/mL em HCL 2,5 mM) foi pré- incubada com tampão Tris-HCL 50 mM, pH 7,5 e 100 µL da solução de inibidor por 15 min a 37° C. Após esse período, a reação foi iniciada pela adição de 200 µL do substrato de azocaseína 1% em tampão Tris-HCL 50 mM, pH 7,5. Decorridos 30 min, a reação foi interrompida adicionando-se 300 µL da solução de TCA 20%. A mistura da reação foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min para remover a proteína precipitada e o sobrenadante alcalinizado com NaOH 2 N na proporção de 1:2 (v/v). A leitura das absorbâncias foi realizada a 440 nm para acompanhar a degradação do substrato pela enzima. Provas em branco (controle negativo) foram realizadas em duplicata e os testes em triplicata. Os resultados foram expressos em Unidades de Inibição por micrograma de proteína (UI/ µg de

proteína). Uma Unidade de Inibição foi definida como decréscimo em 0,01 da absorbância a 440 nm.

4.1.5.2 Inibidor de quimotripsina

O ensaio para a detecção do inibidor de tripsina dos genótipos estudados, bem como dos isolados proteicos dos referidos genótipos foi determinado segundo Erlanger *et al.* (1961). Vinte microlitros de solução de quimotripsina bovina (Sigma C7762) (0,1 mg/mL em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contendo CaCl₂ 20mM) foi pré-incubada com o mesmo tampão e 100 µL da solução de inibidor por 15 min a 37° C. Após esse período, a reação foi iniciada pela adição de 200 µL do substrato de azocaseína 1% em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Decorridos 30 min, a reação foi interrompida adicionando-se 300 µL da solução de TCA 20%. A mistura da reação foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min para remover a proteína precipitada e o sobrenadante alcalinizado com NaOH 2 N na proporção de 1:2 (v/v). A leitura das absorbâncias foi realizada a 440 nm para acompanhar a degradação do substrato pela enzima. Provas em branco (controle negativo) foram realizadas em duplicata e os testes em triplicata. Os resultados foram expressos em Unidades de Inibição por miligrama de proteína (UI/µg de proteína). Uma Unidade de Inibição foi definida como decréscimo em 0,01 da absorbância a 440 nm.

4.1.5.3 Lectina

A presença de lectina nas sementes e isolados proteicos de feijão-caupi foi avaliada através de ensaios de atividade hemaglutinante, segundo Moreira e Perrone (1977), adaptada para tubos de ensaio. Os extratos brutos (EB) e isolados foram diluídas seriadamente com NaCl 0,9% (1:2;1:4; 1:8; 1:16 etc) e cada diluição foi misturada (1:1) com uma suspensão a 2% de eritrócitos de coelho, nativos e tratados previamente com um “pool” de proteases de *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU). O tratamento com proteases foi feito através da mistura da solução de proteases (1 mg. mL⁻¹) com a suspensão de eritrócitos a 2%, na proporção 1:100 (v/v), por 1 h, a 4 °C. Em seguida, as proteases foram retiradas por centrifugações e lavagens com NaCl 0,9%. Portanto, os tubos contendo o EB e o isolado e suas diluições foram incubados a 37 °C, durante 30 min, com o sangue nativo e tratado do animal e, depois, por mais 30 min à temperatura ambiente. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 2000 x g, por 1 min, e a aglutinação visualizada a olho nu. Os

resultados foram expressos como título de hemaglutinação, o qual foi definido como o recíproco da maior diluição que é capaz de provocar aglutinação visível, ou como quantidade mínima de proteína ($\mu\text{g}/\text{mL}$) capaz de induzir aglutinação visível. Essa concentração foi denotada como uma unidade de atividade hemaglutinante (UH. Kg^{-1} farinha).

4.1.5.4 Toxicidade

A avaliação da toxicidade aguda do EB da farinha delipidada e do isolado proteico dos genótipos estudados de *Vigna unguiculata*, foi realizada através de injeção intraperitoneal (0,3 mL/10 g de peso corpóreo) em camundongos machos, seguindo metodologia descrita por Vasconcelos *et al.* (1997), com modificações.

4.1.6 Composição em Aminoácidos

A composição em aminoácidos da farinha delipidada das sementes e isolados proteicos de feijão-caupi foi realizada através de cromatografia de troca-iônica em HPLC (“High Performance Liquid Chromatography”), adaptada a partir do método descrito por Spackman; Stein; Moore (1958). Em triplicata, 4 mg de farinha delipidada foi hidrolisada com 1 mL de HCl 6,0 M contendo 1% de fenol (p/v), por 22 h, a 110 °C, em ampolas de vidro fechadas, sob atmosfera de nitrogênio. Concluída a hidrólise, as ampolas foram abertas e o HCl/fenol removido por evaporação, em dessecador com pressão reduzida na presença de NaOH. A seguir, as amostras foram dissolvidas em tampão citrato de sódio pH 2,2, filtradas em membrana de 40 μm (Millipore®) e submetidas à análise de aminoácidos.

O aminoácido aromático triptofano, sensível à hidrólise ácida, foi determinado pelo método descrito por Pintér-Szakács e Molnár-Perl (1990). Amostras contendo 12,5 mg de farinha foram colocadas em contato com 2,5 mL de reagente contendo ninhidrina a 1% dissolvida em HCl 37% + ácido fórmico 96% (2:3, v/v), por 2 h, a 35 °C. O branco foi realizado paralelamente em condições semelhantes, mas sem ninhidrina. A seguir, às amostras em solução foram adicionados 2,5 mL de uma mistura feita com as soluções HCl/ácido fórmico descritas e etanol absoluto (1:4, v/v). O teor de triptofano foi medido através de leitura espectrofotométrica a 380 nm, tendo como referência uma curva padrão feita com L-triptofano (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EEUU).

4.1.7 Digestibilidade sequencial *in vitro*

O ensaio de digestibilidade sequencial *in vitro* utilizando as enzimas pepsina e tripsina foi realizado segundo a metodologia de Tang *et al.*,(2009). Em duplicata, 500 mg da farinha delipidada e dos isolados proteicos dos genótipos de feijão-caupi foram suspensos em HCl 0,1 M (pH 1,5) (1% p/v) e incubados em banho-maria (Banho Dubnoff, Nova Ética) a 37° por 5 min sob agitação constante. Em seguida, uma alíquota de pepsina (1:100, p/p) foi adicionada, homogeneizada e a suspensão incubada a 37° C, por 2 h sob agitação constante. A reação foi parada pela elevação do pH para 7,0 com adição de NaOH 5 N. Em seguida, foi adicionada tripsina (1:100 p/p) à mistura neutralizada e esta foi novamente incubada em banho-maria sob as mesmas condições anteriores. Às amostras digeridas, foi adicionado, lentamente, o mesmo volume do ácido tricloroacético (TCA) 10% para a obtenção de precipitados. A suspensão foi então centrifugada e o teor de nitrogênio no precipitado (Nt) foi determinado conforme Baethgen e Alley (1989). Para a obtenção do controle negativo (branco), 500 mg de amostra foram suspensos em HCl 0,1 M, precipitados com TCA sem terem passado por digestão enzimática, centrifugado e o nitrogênio presente no precipitado denominado de No.

A digestibilidade proteica (%) foi definida como:

$$\% \text{ Digestibilidade} = \frac{\text{No} - \text{Nt}}{\text{Ntot}}$$

Onde:

No: nitrogênio no precipitado da amostra que sofreu digestão enzimática.

Nt: nitrogênio do precipitado da amostra que não sofreu digestão enzimática.

Ntot: nitrogênio presente na farinha da semente ou isolado proteico.

4.1.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo SDS (PAGE-SDS)

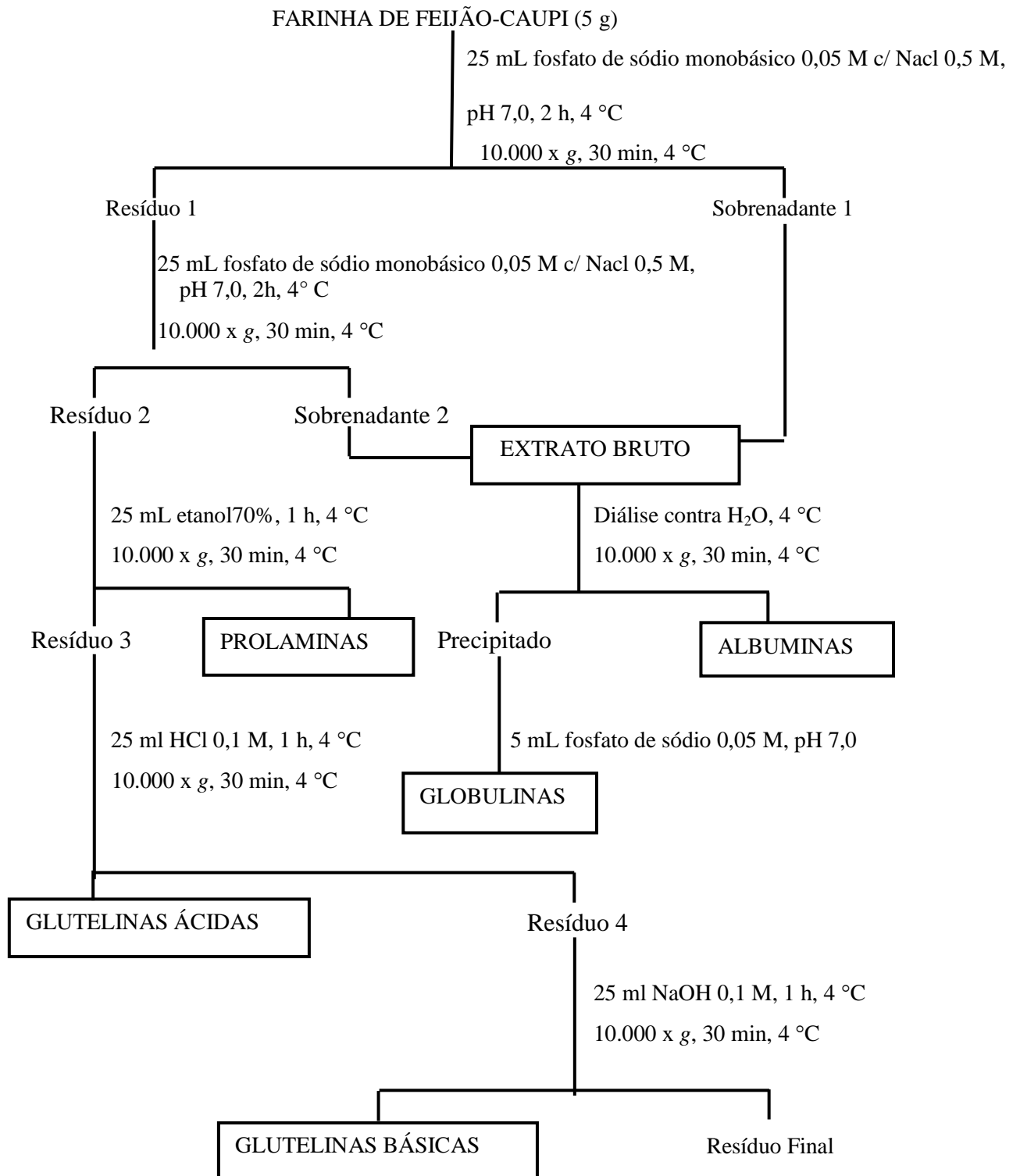
O perfil proteico do EB da farinha delipidada e dos isolados proteicos dos genótipos de feijão-caupi foi observado por eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970). O extrato bruto e isolados proteicos foram ajustados com o tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, Ph 6,8 com SDS 2%, glicerol, azul de bromofenol e β -mercaptoetanol) para uma concentração proteica de 2,5 mg/mL. As amostras foram aquecidas a 100 °C, durante 5 min, e centrifugadas a 10.000 x g, durante 5 min, a 4 °C. Em seguida, 15 μ L de cada amostra foram aplicadas em poços feitos em um gel vertical de 2 mm de espessura, composto por géis de aplicação e separação que encerravam 5 e 12,5% de acrilamida, respectivamente. A corrida foi conduzida a uma corrente constante de 20 mA por placa, durante 1,5 h. As bandas proteicas foram coradas com solução de “Coomassie Brilliant Blue” R-250 a 0,05%. A descoloração foi feita com solução de metanol, ácido acético glacial e água (1:3,5:8, v/v/v).

4.1.9 Classes de proteína

As principais classes de proteínas foram separadas de acordo com sua solubilidade em globulinas; albuminas; prolaminas e glutelinas ácidas e básicas, conforme mostrado na Figura 2.

Os teores de proteínas das diferentes classes citadas foram determinados pelo método de Baethgen e Alley (1989), descrito anteriormente.

Figura 2 - Esquema utilizado para separação das globulinas, albuminas e proteínas tipo prolaminas, glutelinas ácidas e glutelinas básicas de *Vigna unguiculata*.



4.2 Propriedades funcionais

4.2.1 Solubilidade

A solubilidade da proteína foi determinada segundo Were *et al.*,(1997). Misturou-se 125mg de farinha com 25 ml de água destilada e o pH da solução foi ajustado em 2, 4, 6, 8, 10, utilizando-se NaOH 0,5 M ou HCl 0,5 M. As soluções obtidas foram misturadas durante 1 hora a 24° C, utilizando-se um agitador magnético. Posteriormente, foram centrifugados a 1.200 x g durante 20 min a 4°C. Os teores de proteínas totais e solúveis no sobrenadante foram determinados pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1990), utilizando-se o fator de conversão de 6,25. A solubilidade da proteína foi determinada como:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{Quantidade de proteína solúvel}}{\text{Quantidade de proteína total}} \times 100$$

4.2.2 Capacidade de absorção de água e óleo

As capacidades de absorção de água (CAA) e de óleo (CAO) foram determinadas segundo Beuchat (1977), com modificações das quantidades utilizadas, mas mantida a mesma proporção. Um grama da farinha dos isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque foram homogeneizadas com 5 mL de água destilada e/ou óleo de soja por 3 min. As amostras permaneceram em repouso à temperatura ambiente (24° C), por 30 min. Posteriormente foram centrifugados a 15.000 x g por 15 min. A capacidade de absorção foi determinada pela diferença entre o volume inicial e o volume final.

4.2.3 Determinação da atividade emulsificante

A atividade emulsificante das sementes e isolados dos genótipos Cauamé e Tumucumaque foi determinada segundo Yasumatsu *et al.*,(1972), com modificações referentes a quantidades, mas mantidas as mesmas proporções. Amostras em triplicata, pesando 1,4 g, foram solubilizadas com 20 mL de água e 20 mL de óleo, com auxílio de um homogeneizador (Biovera, Ika Ultra Turrax T25 digital, Rio de Janeiro, Brasil), com

velocidade de 10.000 rpm, por 1 min. A emulsão foi dividida em tubos graduados de 50 ml e centrifugados a 1.300 x g, por 5 min.

A atividade emulsificante foi determinada como:

$$\text{Atividade Emulsificante} = \frac{\text{volume da camada emulsificada}}{\text{volume total do conteúdo do tubo}} \times 100$$

Para a determinação da estabilidade, prepara-se a emulsão conforme procedimento descrito anteriormente, aquece em banho-maria a 80° C e esfria em água corrente por 15 min.

A emulsão foi dividida em tubos graduados de 50 ml e centrifugados a 1.300 x g por 5 min.

A Estabilidade da emulsão é determinada como: (Volume da camada emulsificada remanescente/volume total da camada emulsificada) x 100.

4.2.4 Espumabilidade

A capacidade e a estabilidade de formação de espuma foram determinadas segundo Coffeman e García (1977). Alíquotas de concentração proteica a 2% (m/v) foram dispersas em 40 ml de água destilada e homogeneizada na velocidade de 16.000 rpm/1min. A mistura foi imediatamente transferida para uma proveta graduada de 100 ml e o volume registrado. A porcentagem do aumento do volume foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$(\%) \text{ Volume} = \frac{(V_2 - V_1) \times 100}{V_1}$$

Onde: V_2 é o volume após homogeneização;

V_1 é o volume antes da homogeneização.

A estabilidade da espuma foi avaliada pela redução de volumes (em ml) nos intervalos de tempo de 30, 60, 90 e 120 min.

4.2.5 Gelificação

A propriedade funcional geleificação foi determinada segundo Adebawale *et al.* (2005), com algumas modificações (DARFOUR, *et al.* 2012). Inicialmente, foram preparadas dispersões em diferentes concentrações, para determinar a concentração mínima de amostra onde ocorre geleificação. Dispersões de 2, 4, 6, 8, 10,12, 14, 16, 18 e 20% foram colocadas em tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram aquecidos por 1 h à temperatura de 80° C, resfriados rapidamente e mantidos por 2 h a 4° C. A menor concentração capaz de promover geleificação foi aquela em que os tubos foram invertidos e as amostras não caíram ou deslizaram pela parede do tubo.

4.3. Análise Estatística

Foram calculadas média e desvio padrão de todos os valores obtidos. Para avaliar o grau de similaridade entre as variáveis foram realizados testes de comparações simples (*t*-test) e de comparações múltiplas (ANOVA seguida de Teste de Tukey). O nível de confiança das inferências foi de 95 % ($\alpha = 0.05$).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização Bioquímica

5.1.1 Composição Proximal

A Tabela 3 apresenta a composição proximal (proteínas totais, lipídeos totais, carboidratos totais, cinzas totais e fibras totais) em base seca da farinha integral de sementes dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi. As sementes se destacam por apresentar elevado teor de proteínas (23,19 e 24,02%, Cauamé e Tumucumaque, respectivamente), de fibra total (17,75 e 19,78%) e baixo teor de lipídeos totais (4,17 e 4,32%). Não houve diferença significativa entre os genótipos ($p > 0,05$) em relação aos teores de proteína, lipídeos e fibras.

5.1.2 Isolado Proteico

A Tabela 4 apresenta o teor proteico e o rendimento das sementes dos genótipos de feijão-caupi. Observou-se que o método de extração com tampão Tris-HCl na proporção 1/10 por precipitação isoelétrica com re-extração, obteve excelente resultado, pois o teor proteico extraído de ambos os genótipos foi acima de 90% e o rendimento ao redor de 40%. O genótipo Cauamé apresentou melhor resultado, tanto em teor proteico como em rendimento. Anteriormente, foram testados a farinha delipidada extraída com Tris-HCl na proporção 1/10, sem re-extração e se observou o teor proteico abaixo de 80% e rendimento de aproximadamente 40%.

Ao testar a farinha integral extraída com Tris-HCl na proporção 1/10, sem re-extração, o teor proteico obtido foi abaixo de 80% e o rendimento abaixo de 40%. A farinha integral extraída com Tris-HCl na proporção 1/10, com re-extração, mostrou teor proteico acima de 80% (84,07%) e rendimento acima de 40%. Por último, se testou farinha delipidada extraída com tris-HCl na proporção 1/20, com re-extração e se observou o teor proteico acima de 90% e rendimento de aproximadamente 40%, como este resultado foi bem próximo ao encontrado na proporção 1/10, com re-extração, optou-se pela menor proporção em função do menor custo de obtenção .

Tabela 3 - Composição proximal (%) das sementes dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp] expressa em peso seco

Constituinte	Cauamé	Tumucumaque
Proteína *	23,19 ± 0,95 ^a	24,02 ± 0,90 ^a
Carboidratos **	53,66 ± 0,21 ^a	50,30 ± 1,56 ^b
Lipídeo	1,67 ± 0,03 ^a	1,67 ± 0,01 ^a
Cinzas	4,17 ± 0,04 ^a	4,32 ± 0,05 ^a
Fibras	17,75 ± 0,86 ^a	19,78 ± 0,43 ^a

Letras diferentes na horizontal indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$), pelo teste estatístico t-test, Os valores são médias ± desvio padrão de triplicatas nas determinações de proteínas, lipídeos e cinzas e duplicatas nas determinações de fibra alimentar.

* N total x 6,25;

** Determinado pela diferença percentual da soma de todos os outros constituintes

Tabela 4 - Teor proteico (%) e rendimento dos isolados proteicos das sementes dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]

Constituinte	Cauamé	Tumucumaque
Proteína *	95,14 ± 1,09 ^a	92,44 ± 1,07 ^b
Rendimento	38,12 ± 0,13 ^a	35,11 ± 0,20 ^b

Letras diferentes na horizontal indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$), pelo teste estatístico t-test

Os valores são médias ± desvio padrão, em triplicata

* N total x 6,25;

5.1.3 Proteínas Solúveis

A solubilidade das proteínas presentes nas sementes e nos isolados proteicos dos genótipos de feijão caupi está exposta na Tabela 5.

5.1.4 Compostos tóxicos e/ou antinutricionais

Os resultados da análise quantitativa da presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais analisados estão mostrados na tabela 6. Os inibidores de tripsina apresentaram variação de 24,2 a 28,6 UI/ μg de proteína, sendo a menor inibição apresentada pelo genótipo Cauamé, entre os isolados proteicos não houve diferença estatística. Os inibidores de quimotripsina variaram de 26,66 a 32,17 UI/ μg de proteína, sendo a menor inibição obtida pelo isolado proteico Tumucumaque.

A presença de lectinas, avaliada indiretamente pela capacidade de aglutinar eritrócitos de coelho, previamente tratados com tripsina, foi expressa como título de hemaglutinação e pode-se observar na Tabela 6 que não houve diferença estatística significativa em relação aos genótipos e isolados proteicos de feijão-caupi.

Em relação à toxicidade, tanto os genótipos como os isolados proteicos estudados não se mostraram tóxicos em camundongos machos após a injeção intraperitoneal.

5.1.5 Composição de aminoácidos

A composição de aminoácidos das farinhas das sementes e dos isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque está apresentada na Tabela 7. Analisando os aminoácidos essenciais, há predominância de fenilalanina + tirosina, leucina e lisina. Por outro lado, as sementes e os isolados mostraram-se deficientes em isoleucina; as sementes e o isolado proteico Tumucumaque em metionina + cisteína. O isolado proteico Tumucumaque apresentou a treonina como aminoácido limitante e o isolado cauamé, a treonina e o triptofano. Em relação aos aminoácidos não-essenciais, destacaram-se os elevados teores de ácido glutâmico e ácido aspártico (ambos acima de $100\text{g. Kg de proteína}^{-1}$)

Tabela 5 - Proteína solúvel em extrato bruto das sementes e dos isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]

Sementes e Isolados	Proteína Solúvel (mg. mL⁻¹)
Cauamé	9,94 ± 0,30 ^b
Tumucumaque	11,03 ± 0,36 ^{ab}
Isolado Cauamé	12,95 ± 0,14 ^c
Isolado Tumucumaque	12,24 ± 0,04 ^{ac}

Letras diferentes na horizontal indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$), pelo teste estatístico Tukey
Os valores são médias ± desvio padrão de triplicatas

Tabela 6 - Inibidores de tripsina, quimotripsina e atividade hemaglutinante presentes em extrato bruto das sementes e dos isolados proteicos de genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]

Sementes e Isolados	Inibidor de Tripsina (UI/ μg de proteína)	Inibidor de Quimotripsina (UI/ μg de proteína)	Atividade Hemaglutinante (UH. Kg^{-1} farinha) ^e
Cauamé	24,2 \pm 0,70 ^d	26,70 \pm 0,50 ^{ac}	160.000 ^{acd}
Tumucumaque	27,5 \pm 0,55 ^{bc}	32,17 \pm 0,3 ^d	320.000 ^{ab}
Isolado Cauamé	28,6 \pm 0,05 ^{ac}	28,00 \pm 0,20 ^{ab}	80.000 ^c
Isolado Tumucumaque	28,2 \pm 0,50 ^{ab}	26,66 \pm 0,3 ^{bc}	320.000 ^{bd}

Letras diferentes na horizontal indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$), pelo teste estatístico Tukey. Os valores são médias \pm desvio padrão de triplicatas para os ensaios de inibição de proteases e duplicatas para ensaios de atividade hemaglutinante.

e - Atividade expressa como título de hemaglutinação (UH Kg^{-1} farinha) que é o recíproco da maior diluição capaz de causar aglutinação visível.

Tabela 7 – Composição de aminoácidos (g.Kg de proteína⁻¹) das proteínas presentes em extrato bruto das sementes e dos isolados proteicos de genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp] comparada ao requerimentos diários estabelecidos pela FAO/WHO/UNU para crianças.

Aminoácidos	Genótipos				Clara do Ovo	Crianças ^b	
	Cauamé	Tumucumaque	Isolado Cauamé	Isolado Tumucumaque		2-5 anos	6-12 anos
Essenciais							
Thr	36,65	37,47	32,93	31,56	46,16	34	28
Val	54,55	54,33	61,63	57,20	80,29	35	25
Leu	76,97	79,10	91,22	85,83	97,95	28	28
Ile	46,14	46,63	52,79	49,09	62,64	66	44
Lys	64,68	66,61	70,47	66,24	77,52	58	44
Phe+Tyr	88,83	91,60	105,51	97,68	113,50	63	44
Met+Cys	24,79	24,98	36,07	24,64	87,33	25	22
Trp	14,88	13,74	10,83	11,35	17,52	11	9
Não-Essenciais							
Asx	111,47	115,32	122,23	117,89	116,09		
Glx	173,78	182,35	194,04	185,50	151,27		
Ser	45,92	48,08	51,06	48,72	72,64		
Gly	40,75	42,05	38,24	36,18	44,87		
Ala	40,97	42,05	39,91	37,55	66,04		
His	31,69	32,68	33,76	32,93	27,65	19	19
Arg	75,03	79,31	78,60	75,16	65,85		50
Pro	41,83	43,71	46,25	44,10	43,14		

Valores médios da composição de aminoácidos das farinhas das sementes e dos isolados proteicos de feijão-caupi, obtidos de duas repetições. ^b Requerimentos de aminoácidos para crianças em diferentes faixas etárias estabelecidas pela FAO/WHO/UNU (1985)

5.1.6 Digestibilidade proteica *in vitro*

Os valores obtidos para a digestibilidade proteica *in vitro* das sementes e dos isolados proteicos dos genótipos estudados são mostrados na Tabela 8. Tanto os isolados proteicos como as sementes de feijão-caupi, mostraram baixa digestibilidade, variando de $50,07 \pm 0,18$ (Tumucumaque) a $63,81 \pm 0,35$ (Isolado Cauamé).

5.1.7 Perfil Eletroforético

O perfil proteico é mostrado na Figura 3. As proteínas predominantes tanto no extrato bruto como nos isolados proteicos apresentam massa molecular acima de 45 kDa, com predominância das bandas entre 45 a 66 kDa, aparecendo de forma mais intensa nos isolados proteicos. É possível perceber que há diferenças nas concentrações de algumas proteínas, o que fica mais evidente ao se comparar os isolados proteicos e os extratos brutos.

5.1.8 Classe de Proteína

As principais classes de proteínas das sementes estudadas (genótipos Cauamé e Tumucumaque) foram separadas de acordo com a solubilidade, conforme Tabela 9. Os valores a seguir são, respectivamente, referentes ao genótipo Cauamé e Tumucumaque. A maioria das proteínas constituía-se de globulinas ($48,62 \pm 0,15$ a $53,81 \pm 0,57$), seguidas de albuminas ($22,76 \pm 0,02$ a $24,71 \pm 0,07$), glutelinas básicas ($14,62 \pm 0,01$ a $14,65 \pm 0,01$), glutelinas ácidas ($7,11 \pm 0,02$ a $10,22 \pm 0,01$). As proteínas tipo prolaminas foram menos abundantes ($1,7 \pm 0,01$ a $1,8 \pm 0,01$).

Tabela 8 - Digestibilidade *in vitro* das sementes e dos isolados proteicos de genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]

Sementes e Isolados	Digestibilidade <i>in vitro</i>* (%)
Cauamé	54,37 ± 0,10 ^b
Tumucumaque	50,07 ± 0,18 ^b
Isolado Cauamé	63,81 ± 0,35 ^a
Isolado Tumucumaque	63,23 ± 0,69 ^a

Letras diferentes na horizontal indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste estatístico Tukey. Valores são médias ± desvio padrão de duplicatas;

*digestibilidade sequencial utilizando pepsina e tripsina, segundo método descrito por Tang *et al.* (2009)

Figura 3 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) sob condições desnaturantes dos extratos brutos e isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]. 1- Marcador Molecular [Fosforilase b de coelho (97 kDa); Albumina bovina (66 kDa); Ovalbumina do ovo de galinha (45 kDa) Anidrase carbônica bovina (30 kDa) Inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) alfa-lactalbumina bovina (14,4 kDa)]; 2. Cauamé; 3. Isolado Cauamé; 4. Tumucumaque; 5. Isolado Tumucumaque.

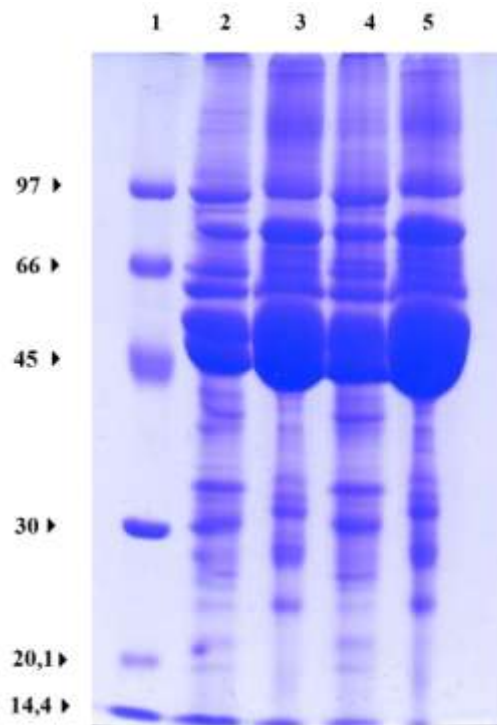


Tabela 9 - Teores de proteínas (N x 6,25) presentes nas sementes dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp], de acordo com a solubilidade frente às diferentes soluções de extração

Proteínas	Cauamé (%)	Tumucumaque (%)
Globulina	53,81 ± 0,57 ^a	48,62 ± 0,15 ^b
Albumina	22,76 ± 0,02 ^a	24,71 ± 0,07 ^b
Prolamina	1,70 ± 0,01 ^a	1,80 ± 0,01 ^b
Glutelina ácida	7,11 ± 0,02 ^a	10,22 ± 0,01 ^b
Glutelina básica	14,62 ± 0,01 ^a	14,65 ± 0,01 ^a

Letras diferentes na horizontal indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste estatístico t-test
Valores são médias ± desvio padrão de duplicatas;

5.2 Caracterização Funcional

5.2.1 Solubilidade

Os valores obtidos para a solubilidade das sementes e dos isolados proteicos dos genótipos estudados são mostrados na Figura 4. Observou-se que em pH 4,0 tanto os genótipos como os isolados proteicos apresentaram a menor solubilidade. Em pH 2,0 a solubilidade é acima de 75% para as sementes e acima de 80% para os isolados. O pH 8,0 proporcionou a maior solubilidade tanto para os isolados proteicos (acima de 90%) como para as sementes (acima de 80%). Em pH 10, a solubilidade foi bem próxima aos valores encontrados em pH 8,0, mantendo-se uma constância.

5.2.2 Capacidade de absorção de água e óleo

A capacidade de absorção de água e de óleo dos isolados proteicos apresentou melhor resultado do que as farinhas das sementes dos genótipos estudados (Tabela 10). Observou-se que houve diferença significativa entre a capacidade de absorção de água das sementes (1,21 e 1,51 mL/g de amostra, respectivamente Tumucumaque e Cauamé) e os isolados proteicos (2,41 e 2,44 mL/g de amostra, respectivamente Cauamé e Tumucumaque). Também houve significativa diferença na absorção de óleo das sementes (0,68 e 0,92 mL/g de amostra, respectivamente Tumucumaque e Cauamé) e os isolados proteicos (2,38 e 2,81 mL/g de amostra).

Figura 4 - Solubilidade de sementes e de isolados proteicos dos genótipos de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp] Cauamé e Tumucumaque em diferentes pHs, determinada pela razão percentual entre a quantidade de proteína solúvel e a quantidade de proteína total.

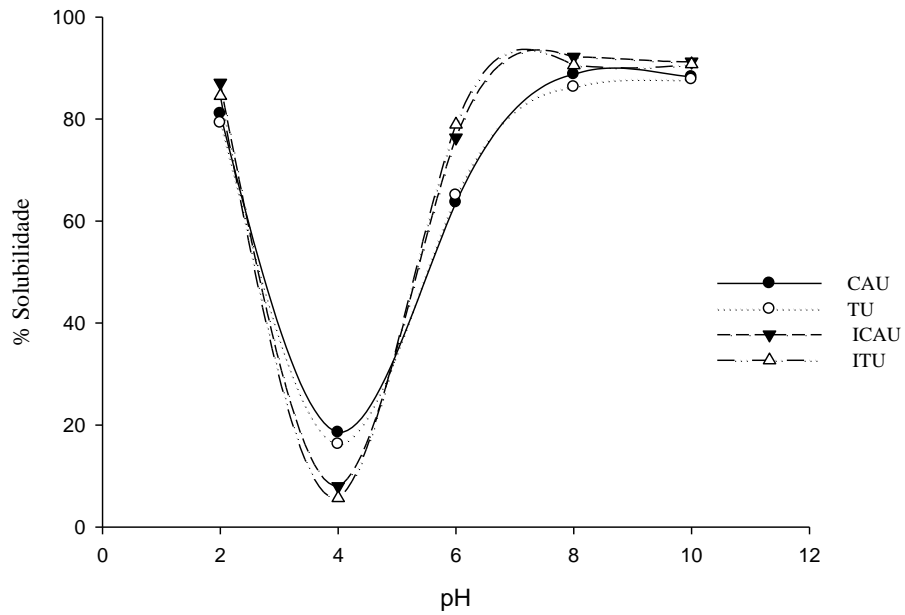


Tabela 10 - Capacidade de absorção de água e óleo de sementes e dos isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]

Sementes e Isolados	CAA* (ml/g amostra)	CAO** (ml/g amostra)
Cauamé	1,51 ± 0,05 ^b	0,92 ± 0,05 ^a
Tumucumaque	1,21 ± 0,03 ^c	0,68 ± 0,02 ^b
Isolado Cauamé	2,44 ± 0,02 ^a	2,81 ± 0,05 ^c
Isolado Tumucumaque	2,41 ± 0,03 ^a	2,38 ± 0,03 ^d

Letras diferentes na horizontal indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$), pelo teste estatístico Tukey

*CAA – capacidade de absorção de água

**CAO - capacidade de absorção de óleo

5.2.3 Atividade emulsificante e estabilidade

Os resultados dos ensaios de atividade emulsificante e estabilidade são mostrados na tabela 11. A atividade emulsificante ficou ao redor de 50%. Os melhores resultados da atividade emulsificante foram aqueles da semente do genótipo Cauamé ($50,00 \pm 0,01$) e do isolado proteico do genótipo Tumucumaque ($50,00 \pm 1,21$), os quais não apresentaram diferença significativa. Entretanto, no que se refere à estabilidade da emulsão as farinhas dos genótipos estudados apresentaram melhor resultado sendo Cauamé ($46,25 \pm 0,31$) e Tumucumaque ($43,33 \pm 2,58$).

A figura 5 mostra a atividade emulsificante das sementes e isolados proteicos em triplicata. Observa-se nas figuras 5A, 5B, 5C e 5D que não há diferença entre o tamanho das camadas de emulsão formadas. Entretanto, nota-se nas figuras 5A e 5C das sementes dos genótipos Cauamé e Tumucumaque que a camada da emulsão se apresenta mais firme, desde o momento de sua formação. Já as figuras 5B e 5D, as camadas são instáveis.

5.2.4. Espumabilidade

A capacidade de formação de espuma e a estabilidade são mostrados na Tabela 12. As farinhas das sementes apresentaram melhor resultado tanto na capacidade de formação de espuma (variando de 52,66 a 57,89%) quanto na estabilidade da espuma. Após 120 min, o genótipo Cauamé apresentou a capacidade de formação de espuma de 44,22% e o genótipo Tumucumaque de 37,88%. Em relação aos isolados, com 30 minutos, o isolado Cauamé mostrou uma redução brusca da capacidade de formação de espuma (26,71%). Já o isolado Tumucumaque, apresentou resultado próximo a farinha de seu genótipo.

As Figuras 6, 7, 8 e 9, mostram a formação de espuma (mL) das amostras em triplicata e a estabilidade após 20 minutos.

5.2.5. Geleificação

As concentrações das diferentes amostras que formam gel podem ser visualizadas na Tabela 13. Os melhores resultados foram obtidos pelos isolados proteicos (8% isolado Cauamé e 10% isolado Tumucumaque)

Tabela 11 - Atividade emulsificante e estabilidade da emulsão de sementes e dos isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]

Sementes e Isolados	AE* (%)	EE** (%)
Cauamé	50,00±0,01 ^a	46,25±0,31 ^c
Tumucumaque	47,50±1,29 ^b	43,33±2,58 ^b
Isolado Cauamé	47,50±1,70 ^b	25,61±1,29 ^a
Isolado Tumucumaque	50,00±1,21 ^a	23,71±0,99 ^a

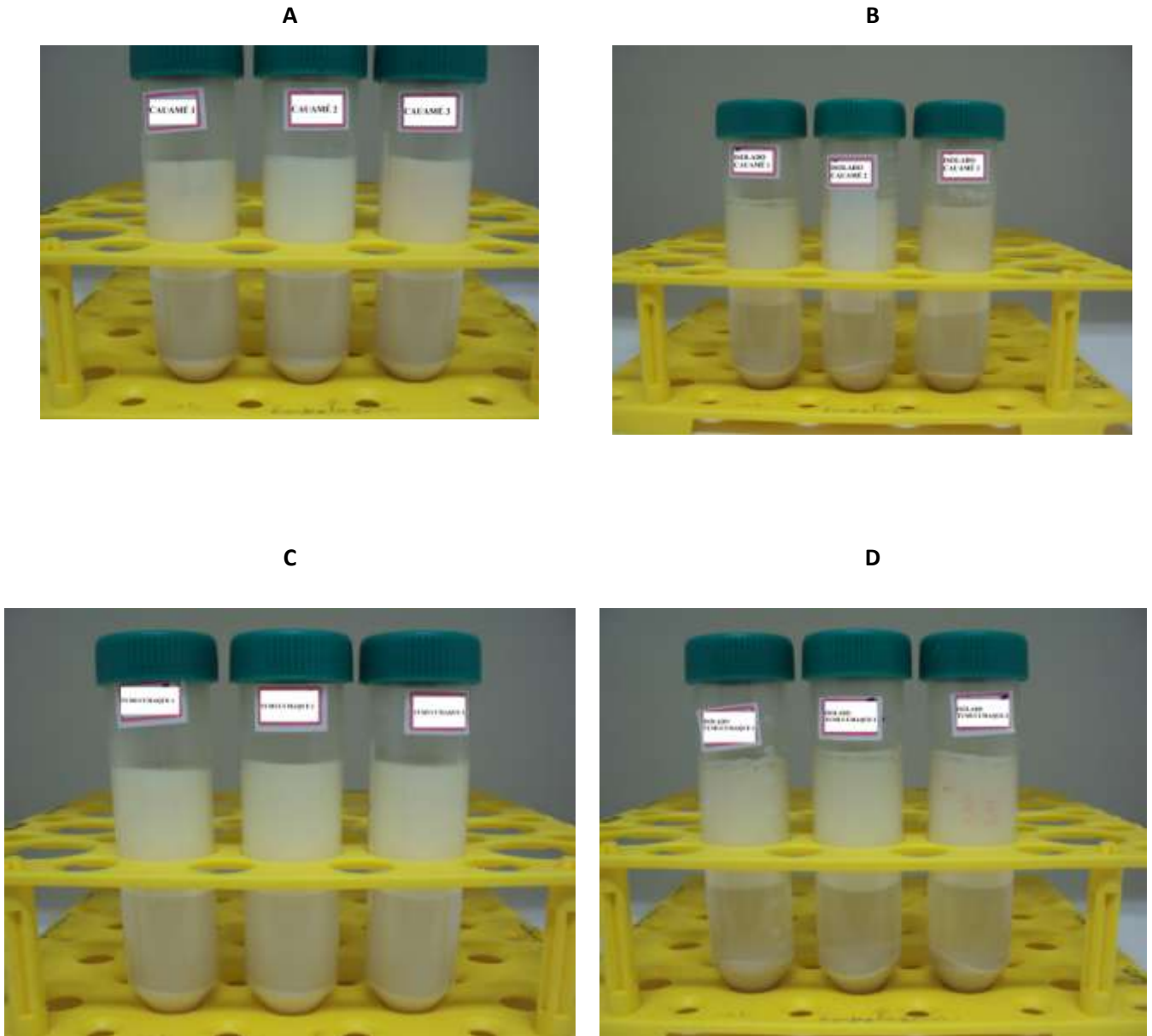
Letras diferentes na horizontal indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$), pelo teste estatístico Tukey

Valores são médias \pm desvio padrão de triplicatas;

AE atividade emulsificante, determinada pela razão percentual da camada emulsificada pelo volume total do conteúdo do tubo.

EE estabilidade da emulsão, determinada pela razão percentual da camada emulsificada remanescente pelo volume total da camada emulsificada.

Figura 5 - Atividade emulsificante em sementes e isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]. Cauamé (A), Isolado Cauamé (B), Tumucumaque (C), Isolado Tumucumaque (D), realizados em triplicata.



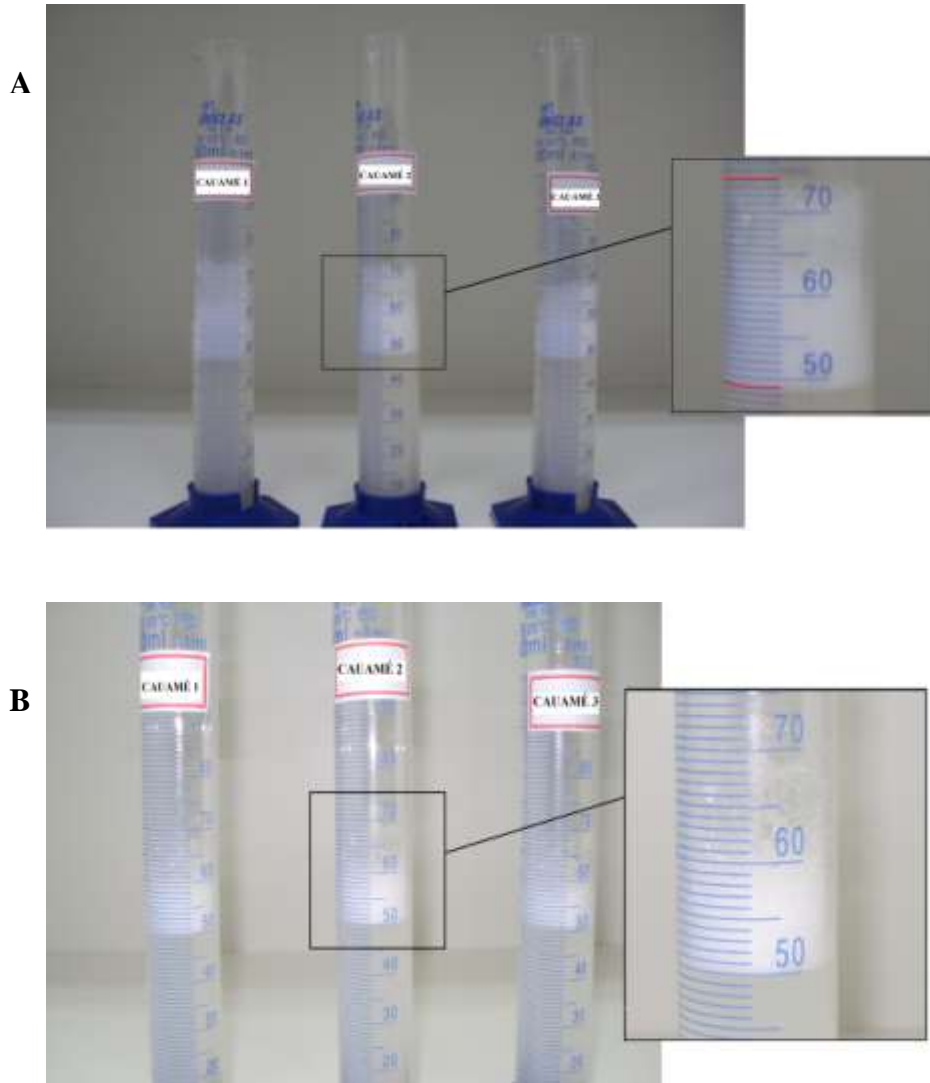
Fonte: Jackeline Medeiros

Tabela 12 - Capacidade de formação de espuma e estabilidade de sementes e dos isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]

Sementes e Isolados	Capacidade de Formação de Espuma (%)	Volume da Espuma (mL)	Estabilidade vol (ml) em intervalos de minutos			
			30	60	90	120
Cauamé	57,89±0,48 ^c	27 ^a	22 ^a	20 ^a	20 ^c	18 ^c
Tumucumaque	52,66±0,91 ^a	25 ^a	20,5 ^a	18 ^a	14 ^a	15,5 ^a
Isolado Cauamé	51,51±0,93 ^a	21,5 ^b	11 ^b	9 ^b	9 ^b	8,5 ^b
Isolado Tumucumaque	46,40±0,67 ^b	22,5 ^b	17,5 ^c	14 ^c	13 ^a	13 ^a

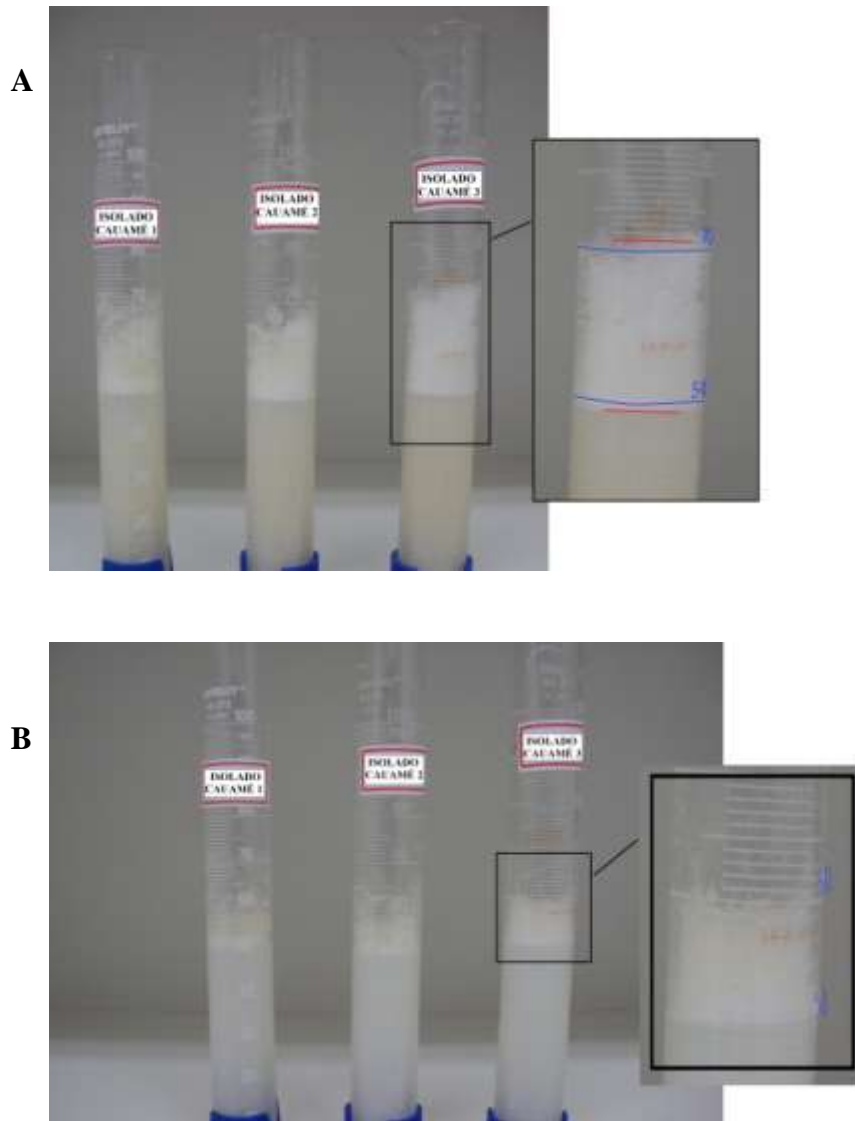
Letras diferentes na horizontal indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$), pelo teste estatístico Tukey
Valores são médias \pm desvio padrão de triplicatas;

Figura 6 - Formação de espuma (A) e estabilidade da espuma (B) da semente do genótipo Cauamé de feijão- caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]. Formação de espuma (mL) das amostras em triplicada do genótipo Cauamé (A) e a estabilidade (mL) (B) após 120 min



Fonte: Jackeline Medeiros

Figura 7 - Formação de espuma (A) e estabilidade da espuma (B) do isolado proteico do genótipo Cauamé de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]. Formação de espuma (mL) das amostras em triplicada do isolado proteico Cauamé (A) e a estabilidade (mL) (B) após 120 min

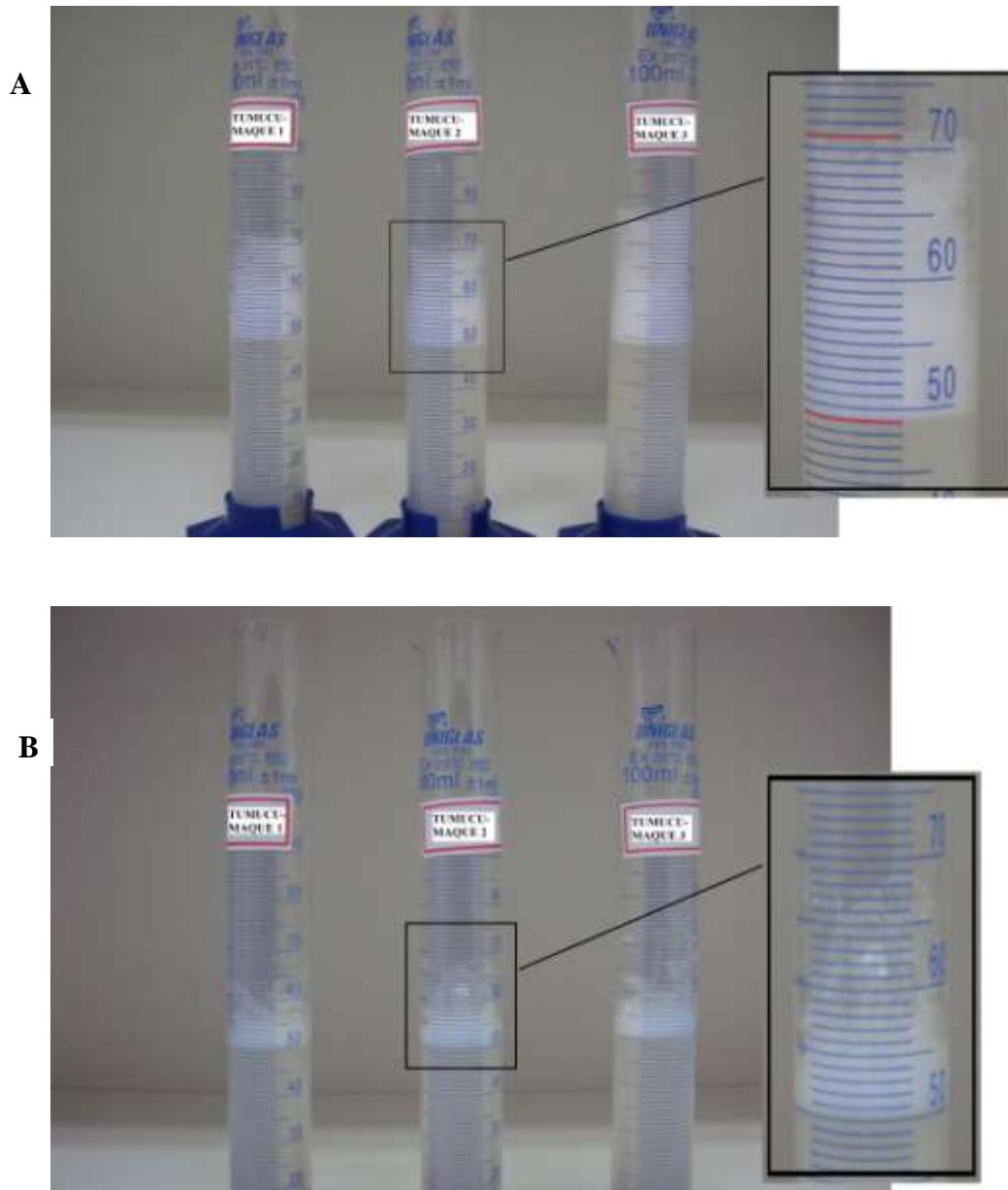


Fonte:

Jackeline

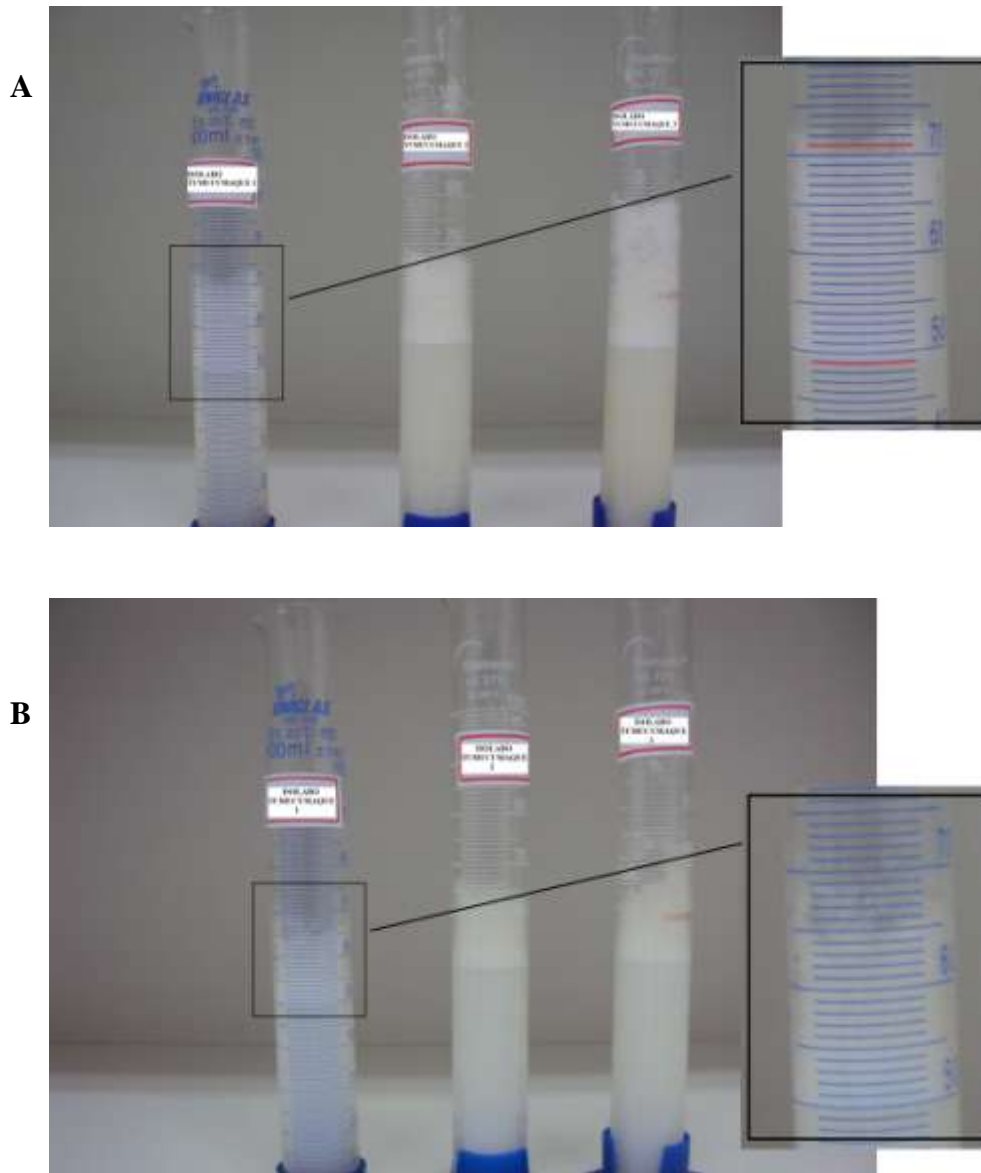
Medeiros

Figura 8 - Formação de espuma (A) e estabilidade da espuma (B) da semente do genótipo Tumucumaque de feijão- caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]. Formação de espuma (mL) das amostras em triplicada do genótipo Tumucumaque (A) e a estabilidade (mL) (B) após 120 min



Fonte: Jackeline Medeiros

Figura 9 - Formação de espuma (A) e estabilidade da espuma (B) do isolado proteico do genótipo Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]. Formação de espuma (mL) das amostras em triplicada do isolado proteico Tumucumaque (A) e a estabilidade (mL) (B), após 120 min



Fonte: Jackeline Medeiros

Tabela 13 - Formação de gel de sementes e dos isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp].

Sementes e Isolados	Concentração do gel (%)*									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Cauamé							x	X	x	x
Tumucumaque							x	X	x	x
Isolados Cauamé				x	x	x	x	X	x	x
Isolado Tumucumaque					x	x	x	X	x	x

*As farinhas dos genótipos e isolados foram dispersas em água em diferentes concentrações (g/ml).

A geleificação foi considerada a menor concentração em que se formou gel, ou seja, foi aquela em que os tubos foram invertidos e as amostras não caíram ou deslizaram na parede do tubo.

Ensaio realizado em duplicata.

6 DISCUSSÃO

As sementes de ambos os genótipos estudados de feijão-caupi (Caumé e Tumucumaque) possuem valores habituais dos nutrientes que caracterizam o alto valor nutricional do feijão-caupi, como altos teores de proteínas e fibras (cerca de 20%), além de baixo teor de lipídeos (< 5%). Os valores de proteína foram semelhantes ao relatado na literatura, como por exemplo: 19,5 a 26,1% (MAIA *et al.*, 2000), 24,5% (FROTA *et al.* 2008a), 22,3 a 26,30% (KHALID *et al.*, 2012). Quanto aos teores de fibra alimentar, os valores foram semelhantes aos encontrados por Frota (2007), de 19,4 a 20,2% e Salgado *et al.* (2005), de 18,00 a 20,14%. Entretanto, outros autores que estudaram o feijão-caupi, obtiveram maiores variações de 19,48 a 35,57% (SOUSA, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012).

O baixo teor de lipídeo é uma característica de destaque do feijão-caupi, o presente estudo apresentou resultados bem semelhantes nos genótipos estudados, não mostrando diferença estatística. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura, com variações de 1,0 a 1,4g/100g (CARVALHO *et al.*, 2012; EL-JASSER, 2010). Outros autores encontraram maiores variações, como por exemplo: 1,2 a 3,5g/100g (MAIA *et al.*, 2000) e 2,50 a 3,99 g/100g (APPIAH *et al.*, 2011).

No que se refere à obtenção dos isolados proteicos, a extração da farinha delipidada, utilizando-se, em seguida, o tampão tris-HCl na proporção de 1:10 e extração adicional do resíduo foram as melhores condições para obter maior rendimento (>40%) e maior teor proteico (>90%). O teor proteico dos isolados variou de 92,44 a 95,19%. Vários testes foram realizados com o objetivo de se extrair o maior teor proteico, com um bom rendimento e baixo custo. Dentre as variáveis que se testou, destaca-se a concentração, a re-extração e delipidação, que possivelmente contribuíram com o resultado obtido. Estudos realizados para a obtenção de isolados proteicos com farinha de feijão-caupi, sem delipidar, resultaram em produtos de baixa pureza, mostrando que a delipidação se faz necessária mesmo o feijão apresentando baixo teor lipídico (ABBOT *et al.*, 1991; SATHE *et al.*, 2002; FROTA, 2008a). Ao se isolar a proteína dos genótipos Caumé e Tumucumaque, sem a realizar a delipidação, o teor de proteína dos isolados obtidos variaram de 73,74 a 74,62% sem re-extração e chegaram a 84,10%, com re-extração, ambos os resultados foram obtidos na concentração de 1/10, mostrando que a delipidação influenciou de forma positiva no resultado obtido.

Estudos realizados com isolados proteicos de feijão-caupi, apresentaram ampla variação em seu teor proteico. Os resultados encontrados variaram de 78,6 a 92,9% (MWASARU *et al.* 1999; CASTILLO *et al.* 2007; FROTA *et al.*, 2008b; FONTANARI, 2010; KHALID *et al.* 2012). O rendimento encontrado neste estudo ficou sempre ao redor de 40% (35,11 a 38,12%). Segundo FROTA (2007), o rendimento dos isolados proteicos varia com o pH de solubilização das proteínas. Ao analisar o rendimento de isolados proteicos de feijão caupi em diferentes pHs, constatou-se que com o aumento do pH de solubilização, aumentava-se o rendimento dos isolados, obtendo-se 41,8% em pH 8,5 e 50,0% em pH 11,5. Entretanto, observou-se que quanto menor o pH de solubilização, obtinha-se um isolado mais puro. FONTANARI (2010) observou uma variação de 35,30 a 66,70% no rendimento de isolados proteicos de tremoço branco (*Lupinus albus*) em diferentes pHs, apresentando no pH de solubilização de 8,0 a 9,0, rendimento semelhante ao presente estudo.

Ao verificar os fatores tóxicos e/ou antinutricionais, tanto os isolados proteicos como os extratos brutos não se mostraram tóxicos, sendo um fator positivo do ponto de vista nutricional. Estudo recente realizado com trinta genótipos diferentes de feijão caupi, também mostrou ausência de toxicidade (SOUSA, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012). Por outro lado, verificou-se a presença de inibidores de proteases tanto nas sementes como nos isolados dos genótipos estudados. A variação de inibidores de tripsina foi de 24,2 a 28,6 UI/ μg de proteína; os isolados não apresentaram diferença significativa entre si, já as sementes, mostraram diferença, tendo o genótipo Cauamé a menor inibição. Apesar de apresentar inibição de tripsina, o presente estudo mostrou melhor resultado que outros autores, como: 32,49 UI/ μg de proteína em isolados proteicos de feijão-caupi (FROTA, 2007); 31,67 a 32,2 UI/ μg de proteína em sementes de feijão- caupi e 29,23 a 31,6 UI/ μg de proteína em isolados proteicos de feijão-caupi (El-JASSER, 2010); 49,6 UI/ μg de proteína em sementes de feijão caupi (UWAEGBUTE *et al.*, 2000). No que se refere aos inibidores de quimiotripsina, a variação encontrada entre os genótipos e isolados foi maior (de 26,66 a 32,17 UI/ μg de proteína). Melhor resultado foi encontrado por El Jasser (2010), obtendo uma variação de 2,73a 15,07 UI/ μg de proteína, a possível redução do inibidor de quimotripsina pelo referido autor deve-se ao aquecimento realizado em suas amostras, que em contrapartida resultou em redução do teor proteico de seus isolados. Outros autores corroboram com os resultados encontrados no presente estudo (SOUSA, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012).

A presença de lectina, indicada pela atividade hemaglutinante em sangue de coelho, estava presente em isolados e sementes dos genótipos Cauamé e Tumucaumaque na

ordem de 80.000 a 320.000 UH. Kg⁻¹ farinha, resultado semelhante ao de outros estudos que foi de 40.000 a 320.000 UH Kg⁻¹ farinha (SOUSA, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012).

A qualidade de uma proteína está relacionada principalmente a seu conteúdo de aminoácidos essenciais e digestibilidade. As proteínas de alta qualidade são aquelas que contêm todos os aminoácidos essenciais em níveis maiores que os de referência para crianças em diferentes faixas etárias estabelecidas pela FAO/OMS/ONU (1985). Ao analisar os aminogramas das sementes e isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque, nota-se que as sementes são deficientes em isoleucina, metionina e cisteína. Os isolados proteicos mostraram-se diferentes em relação a seus aminoácidos limitantes. O isolado proteico Cauamé, apresentou a treonina, a isoleucina e o triptofano como aminoácidos limitantes; já o isolado proteico Tumucumaque, foi deficiente em treonina, isoleucina, metionina e cisteína. A deficiência de aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) em feijão caupi, já é conhecido, sendo necessário a combinação com cereais para que se obtenha uma dieta com conteúdo de aminoácido adequado aos requisitos nutricionais da espécie humana. (RIBEIRO *et al.*, 2007; SOUSA, 2010)

Estudos de aminogramas em feijão-caupi apresentaram resultados semelhantes ao presente estudo (MAIA *et al.*, 2000; FROTA, 2007; SOUSA, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012). Em contrapartida, IQBAL *et al.*, (2006) obtiveram o triptofano como aminoácido limitante, provavelmente, decorrente de diferenças metodológicas. No que diz respeito aos isolados proteicos, vários autores encontraram resultados similares, como, Castillo *et al.* (2007), obtiveram lisina e triptofano como aminoácidos limitantes, Rangel *et al.* (2003), Horax *et al.* (2004) e Frota (2007), cisteína, metionina e triptofano.

Embora o conteúdo dos aminoácidos essenciais seja o indicador primário da qualidade proteica, é de grande importância a utilização desses aminoácidos no organismo, sendo assim, a digestibilidade de aminoácidos afeta em demasia a qualidade proteica. Uma proteína pode apresentar boa composição aminoacídica, mas não ter boa digestibilidade, tendo assim a sua qualidade diminuída. O alimento é considerado de alta digestibilidade quando é comparável ou melhor que as proteínas da clara do ovo ou leite. As proteínas de origem vegetal apresentam menor digestibilidade que as de origem animal, em parte por está ligada aos carboidratos das paredes das células, estando menos disponível. Além disso, a maioria das proteínas vegetais contém inibidores de tripsina, quimotripsina e lectina, os quais prejudicam a hidrólise completa de proteínas de leguminosas pelas proteases pancreáticas. A presença de

compostos fenólicos e fibras também afetam a digestibilidade das proteínas (SGARBIERI, 1996a; PHILLIPS *et al.*, 2003; ETTINGER, 2005; DAMADORAM, 2010).

A digestibilidade *in vitro* das sementes e isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque variaram de 50,07 a 63,81%. A maior digestibilidade foi verificada nos isolados proteicos, e entre eles não houve diferença estatística. Os resultados encontrados condizem com a literatura, visto que a digestibilidade normalmente encontrada para feijões, situa-se de 40 a 70% (MENDONÇA *et al.*, 2003). Segundo Gomes *et al.* (1997), os isolados proteicos das sementes apresentam maior digestibilidade que a farinha da semente, indicando uma possível interação das proteínas com outras substâncias presentes na semente.

Estudo realizado por El-Jasser (2010) com sementes, concentrados e isolados proteicos de feijão caupi mostrou resultados superiores ao usualmente relatado pela literatura, obtendo respectivamente, 75,03; 78,64 e 91,43%, de digestibilidade. O fato deste autor ter realizado o tratamento térmico e reduzido teor de inibidores de proteases pode ter contribuído para o aumento da digestibilidade proteica. Já Sousa (2010) encontrou valores de digestibilidade inferiores ao do presente estudo, com uma variação de 29,9 a 44,05%. Neste estudo a baixa digestibilidade foi associada à concentração de globulinas, pois esta fração tem resistência à digestão e os genótipos que apresentaram menor digestibilidade foram os que mostraram maior concentração desta fração. Não foi observada associação de digestibilidade *in vitro* com inibidores de proteases e lectinas (PHILLIPS *et al.*, 2003). O estudo realizado por Mesquita *et al.* (2007), com 21 genótipos de feijão-caupi, também apresentou resultados de baixa digestibilidade proteica com uma variação de 18,03 a 48,32%.

Os perfis eletroforéticos obtidos para as proteínas das sementes e isolados proteicos dos genótipos Cauamé e Tumucumaque mostraram-se semelhantes, apresentando pelo menos 15 bandas com massa molecular relativamente variada de 14,4 a 97,0 kDa, com predominância das bandas entre 45 a 66 kDa, aparecendo de forma mais intensa nos isolados proteicos. Segundo Grangeiro *et al.* (2005), as globulinas representam as proteínas de reserva do feijão-caupi, sendo composta de duas subunidades, uma com 52,58 e 63kDa e outra com 52 e 58 kDa, o que nos leva a concluir que tanto nas sementes como nos isolados, a globulina é a fração proteica mais representativa. Resultados de outros autores corroboram com os resultados encontrados neste estudo. Vasconcelos *et al.* (2010) encontraram padrão de bandas mais proeminentes entre as massas moleculares 44 a 63 kDa estudando três cultivares de feijão caupi. Carvalho *et al.* (2012), ao estudarem trinta genótipos de feijão caupi, encontraram bandas com variadas massas moleculares, de 21,4 a 212 kDa, com destaque para

as bandas de 45 a 66,2 kDa. Avanza *et al.* (2013) encontraram bandas de 28 a 94 kDa, com bandas mais proeminentes de 44 a 67kDa.

Na separação de proteínas de acordo com a solubilidade, a fração globulina foi a mais representativa, em relação ao teor total de proteínas (Cauamé 53,81% e Tumucumaque 48,62%). As globulinas são as principais proteínas de reserva das sementes de leguminosas, perfazendo até 70% ou mais do conteúdo total de nitrogênio da semente (GRANGEIRO *et al.*, 2005). Estudo realizado com sementes de *Amburana cearensis* e *Vicia faba*, a globulina também foi a classe proteica mais representativa (ALGHAMBI, 2009; FARIAS, 2009). Maia (1996) determinou a classe de proteína em três cultivares de *Vigna unguiculata*, apresentando resultado semelhante ao presente estudo no que se refere à fração globulina (49,8 a 53,1%). Outros autores encontraram valores inferiores de globulina (35 a 45%), apesar de ser a proteína mais significativa (ARAÚJO, 1997). A albumina foi a segunda fração mais abundante (22,76 a 24,71%). A proporção de globulina e albumina está na faixa de 2:1 a 3:1. (SGARBIERE, 1996a). Outros autores também obtiveram a mesma proporção (CASTELLÓN, 1996; MAIA, 1996; ARAÚJO, 1997; MATOS, 1997; VASCONCELOS *et al.*, 2010). As demais classes proteicas foram menos representativas, glutelinas básicas (14,62 a 14,64%), glutelinas ácidas (7,11 a 10,22%) e prolamina (1,70 a 1,80%) em baixíssima quantidade quando comparada com as outras frações proteicas.

Em relação às propriedades funcionais (tecnológicas) dos ingredientes de produtos alimentícios, a solubilidade é considerada uma das mais importantes, em função de muitas propriedades funcionais apresentarem dependência na interação da água com a proteína, tais como, a emulsão, a formação de espuma e a geleificação (DAMADORAM, 2010; AVANZA *et al.*, 2012). O gráfico de solubilidade das sementes e isolados proteicos apresentaram um formato de U, indicando uma menor solubilidade no pH 4-6, ponto isoelétrico, corroborando com a literatura, pois no ponto isoelétrico ou próximo a ele, a diferença de carga entre as moléculas das proteínas diminui, quando chega a ser suficientemente pequena, elas formam agregados e precipitam, é o ponto que se tem a menor solubilidade (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). A solubilidade das sementes e isolados dos genótipos Cauamé e Tumucumaque apresentaram maior solubilidade no pH 8,0 (Cauamé 88,74%; Tumucumaque, 86,27%, isolado Cauamé, 92,16% e isolado Tumucumaque, 90,57%), se estabilizando no pH 10, não observando diferença significativa. As proteínas em pH distinto do ponto isoelétrico possuem cargas líquidas e repelem-se entre si, podendo interagir com as moléculas de água, sendo portanto, mais solúveis (DAMADORAM, 2010). No pH 2, distante do ponto isoelétrico, as sementes e isolados também apresentaram boa solubilidade (Cauamé 81,04%; Tumucumaque, 79,26%,

isolado Cauamé, 87,09% e isolado Tumucumaque, 84,56%), mas inferior ao pH 8,0. Em função de a solubilidade exercer influência positiva nas demais propriedades funcionais, ajustou-se o pH dos isolados proteicos e sementes dos genótipos Cauamé e Tumucumaque.

Várias proteínas são utilizadas como ingredientes em um número grande de alimentos formulados, dentre elas se destacam as proteínas do leite, principalmente a caseína, e proteínas da soja (SWAISGOOD, 2010). Wolf (1970) propõe a utilização da farinha da soja em diferentes alimentos em função da solubilidade proteica que apresenta, por exemplo: solubilidade entre 50-60%, em pães, bolos, massas doces e macarrão; solubilidade entre 25-35%, em panquecas, waffles, molhos, salsichas e sopas; solubilidade de 10 a 20%, em biscoitos, bebidas, fórmulas infantis. Estudo realizado com a soja, também apresentou menor solubilidade entre os pHs 4-5, e maior solubilidade a partir de pH 8,0 (acima de 90%) (PEDNEKAR *et al.* 2010). A caseína, mostrou resultado semelhante, com menor solubilidade entre os pHs 3,5-4,5, aumentando para mais de 90%, a partir do pH 5,5 (MURPHY e FOX, 1991).

Outros autores estudando feijão-caupi também encontraram a menor solubilidade das proteínas no pH de 4,0 a 6,0 (HORAX *et al.* 2004; AVANZA *et al.*, 2012; SREERAMA *et al.*, 2012). Avanza *et al.* (2012), estudando a solubilidade com três cultivares de feijão-caupi também encontraram maior solubilidade em pH alcalino do que em pH ácido, havendo um aumento significativo em pH 7,0, mantendo-se a estabilidade a partir do pH 9,0. Estudos realizados com arroz (PINCRIOLI *et al.*, 2009), sementes de goiaba (FONTANARI *et al.*, 2007), concentrados e isolados de castanha de caju (OGUNWOLU *et al.*, 2009), também apresentaram a menor solubilidade entre os pH 4,0 e 6,0, isto ocorre pelo fato da maioria das proteínas alimentares serem ácidas e apresentarem ponto isoelétrico entre 4 e 5.

Observou-se no ponto isoelétrico que as proteínas apresentam baixa solubilidade, apresentando, neste ponto, pouca aplicabilidade na indústria de alimentos, sendo necessário, ao se estudar a solubilidade das proteínas verificar em que pH o alimento apresenta maior solubilidade. A principal vantagem da boa solubilidade é que permite a dispersão rápida e completa das moléculas proteicas, o que conduz a um sistema coloidal disperso e com estrutura homogênea, que é de grande importância na elaboração de molhos, sopas desidratadas, alimentos de bebês, produtos de padaria, sopas desidratadas, sobremesas, dentre outros (ORDÓÑEZ, 2005; AVANZA *et al.*, 2012).

Quanto às capacidades de absorção de água e de óleo, os isolados proteicos do presente estudo apresentaram melhor resultado quando comparados às sementes. Entre os isolados não houve diferença significativa na absorção de água (isolado Cauamé 2,44 mL/g de amostra; isolado Tumucumaque, 2,41 mL/g de amostra), já na absorção de óleo, eles mostraram-se diferentes (isolado Cauamé 2,81 mL/g de amostra; isolado Tumucumaque, 2,38 mL/g de amostra). As sementes também não apresentaram diferença na absorção de água (Cauamé, 1,5 mL/g de amostra; Tumucumaque, 1,21 mL/g de amostra), mas apresentaram na absorção de óleo (Cauamé, 0,92 mL/g de amostra; Tumucumaque, 0,68 mL/g de amostra). O fato dos isolados proteicos apresentarem maior capacidade de absorção de água está correlacionado com a maior solubilidade apresentada por eles. Além disso, o aumento da concentração de proteína parece estar relacionado com o aumento da absorção de água, pois há uma maior interação proteína-água, e conseqüentemente maior capacidade de absorção (CAVALCANTE *et al.*, 2009; KHALID *et al.*, 2012). Já a capacidade de absorção de óleo parece estar relacionada com o número de grupos hidrofóbicos expostos na proteína, assim, as cadeias laterais não polares das proteínas têm estrita afinidade com as cadeias hidrofóbicas da molécula de gordura e contribuem para a sua absorção (FONTANARI *et al.*, 2007).

Estudo realizado por Pednekar *et al.* (2010), com soja mostraram resultados próximos aos encontrados pelos isolados proteicos do presente estudo, tanto na absorção de água (2,57 e 3,08 mL/g de amostra) e de óleo (1,58 e 1,97 mL/g de amostra, respectivamente na soja e no isolado proteico). Estudos realizados com feijão-caupi apresentaram uma variação de 1,25 a 2,15 mL/g de amostra na absorção de água e 0,39 a 2,31 mL/g de amostra na absorção de óleo; com isolados proteicos, a absorção de água variou de 1,27 a 2,30 mL/g de amostra e de óleo, 0,81 a 2,37 mL/g de amostra (CHINMA *et al.* 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009; OGUEKE *et al.* 2010; APPIAH *et al.*, 2011; DARFOUR *et al.*, 2012; KHALID *et al.*, 2012). Dentre os fatores que podem influenciar na variação da absorção de água pode-se destacar: a concentração de proteína, que está relacionada com a maior capacidade de absorção, bem como as características conformacionais, que relacionam-se com o período de armazenamento do feijão, podendo alterar a estrutura da proteína, expondo mais sítios para ligação com as moléculas de água (RIBEIRO *et al.*, 2009). O tempo de armazenamento mais prolongado também parece influenciar na capacidade de absorção de óleo, pois ocorre afrouxamento na estrutura das proteínas, provocando maior exposição dos sítios hidrofóbicos anteriormente ocultos (DONADEL; PRUDENCIO-FERREIRA, 1999).

A absorção de água e de óleo é de grande importância em alimentos viscosos, como sopas, molhos, massas e produtos de panificação, mas também exercem importante

papel na qualidade da textura de diversos alimentos, sendo bastante utilizado em produtos cárneos, como salsichas e análogos de carne. Além de se destacarem na retenção de sabor e palatabilidade dos alimentos (MIZUBUTI *et al.*, 2000; AVANZA *et al.*, 2012).

A capacidade de formação de espuma variou de 46,40 a 57,89%, tendo o genótipo Cauamé (57,89%) apresentado melhor resultado. Não houve diferença estatística das sementes entre si, nem dos isolados, e a formação de espuma do genótipo Tumucumaque (52,66%), foi bem próximo ao do isolado proteico do genótipo Cauamé (51,51%), não apresentando diferença estatística, sendo assim, não foi possível inferir uma associação entre sementes e melhor capacidade de formação de espuma. Entretanto, em relação à estabilidade, constatou-se que as sementes apresentaram melhor resultado. Apesar da solubilidade estar associada à maior formação de espuma, no ponto isoelétrico (PI) em que se tem a menor solubilidade, as espumas estabilizadas por proteínas são mais estáveis, contanto que não haja insolubilização da proteína no PI. Isto ocorre devido à falta de interações repulsivas promovendo interações favoráveis de proteína-proteína e a formação de uma película viscosa na interface. Ademais, ocorre aumento da quantidade de proteína adsorvida à interface e às moléculas em adsorção. Esses fatores são responsáveis tanto pelo aumento da espumabilidade como pela sua estabilidade (DAMADORAM, 2010).

Estudo realizado com três genótipos de feijão caupi mostrou a formação de espuma de 17 a 21 mL e a estabilidade após 60 min de 4 a 10 mL, melhor resultado foi obtido pelos genótipos Cauamé e Tumucumaque, tanto na formação de espuma (27 mL e 25 mL, respectivamente), como na estabilidade (20 mL e 18 mL, respectivamente) (APPIAH *et al.*, 2011). Darfour *et al.* (2012) encontrou baixa espumabilidade (17,65 a 21,57%), entretanto alta estabilidade (15,40 a 83,70%), possivelmente por ter utilizado pH próximo ao pI, evitando a repulsão eletrostática e aumentando a estabilidade. Resultados de outros autores corroboram com os resultados encontrados no presente estudo (HORAX *et al.*, 2004; SREERAMA *et al.*, 2012).

No que se refere à atividade emulsificante houve diferença estatística entre os genótipos e entre os isolados, apesar da variação dos valores ser pequena, de 47,50 a 50%. Dentre as sementes, o genótipo Cauamé apresentou melhor resultado (50%), e dentre os isolados, o genótipo Tumucumaque se destacou (50,0%). Em relação à estabilidade, melhor resultado foi obtido pelas sementes. A menor estabilidade dos isolados pode ter ocorrido pelo fato deles apresentarem maior solubilidade e conseqüentemente, maior repulsão de cargas, o que resultaria em uma menor estabilidade. Segundo Damadoram (2010), a falta de carga líquida e interações repulsivas eletrostáticas, ajudam a maximizar a carga proteica na

interface, promovendo a formação de uma película altamente viscoelástica e contribuindo para a estabilidade da emulsão.

Outros autores também estudaram a atividade emulsificante com concentrado de feijão e corroboram com os resultados obtidos, apresentando valores de atividade emulsificante variando de 44,83 a 53,16 % e valores de estabilidade de 35,16 a 39,66% (DONADEL; PRUDENCIO-FERREIRA, 1999; LAWAL, 2004; RADAG *et al.*, 2004).

Em relação à formação de gel, os isolados proteicos Cauamé (8%) e Tumucumaque (10%) apresentaram melhor resultado que as sementes (ambas 14%). Segundo Ordóñez *et al.* (2005), qualquer fator que potencialize o contato entre as proteínas favorecerá a geleificação, mesmo havendo condições pouco favoráveis, justificando, assim, o melhor resultado obtido pelos isolados proteicos.

Outros autores estudando formação de gel em sementes e isolados proteicos de feijão-caupi corroboram com os resultados encontrados neste estudo, apresentando a formação do gel em concentrações que variam de 6 a 13% (g/mL) (MWANGWELA *et al.*, 2007; SIDDIQ *et al.*, 2010; DARFOUR *et al.*, 2012; KHALID *et al.*, 2012).

A formação de gel desempenha papel fundamental em produtos de carne cozida, gelatinas, massa de pão, produtos lácteos, dentre outros. Esta propriedade vem sendo estudada em diversos alimentos, tais como: soja, inhame, arroz e isolados proteicos de castanha de caju, os quais também apresentaram formação de gel na concentração de 6 a 12%, sendo considerados excelentes formadores de géis, podendo ter aplicações em tecnologia de alimentos. A importância dessa propriedade, não é apenas a formação de géis, mas também a sua utilização para melhorar a absorção de água, viscosidade, adesão entre partículas e para estabilizar espumas e emulsões (ORDÓÑEZ, 2005; OGUNWOLU *et al.*, 2009; PEDNEKAR *et al.*, 2010; KAUSHAL *et al.*, 2012).

7 CONCLUSÃO

As conclusões deste trabalho são:

- As sementes de ambos os genótipos estudados de feijão-caupi (Caumé e Tumucumaque) possuem valores habituais dos nutrientes que caracterizam o alto valor nutricional do feijão-caupi, como alto teor de proteínas (cerca de 20%) e fibras (cerca de 20%), além de baixo teor de lipídeos (< 5%);

- O protocolo para obtenção dos isolados proteicos, onde se utilizou semente delipidada e extração com tampão Tris-HCl na proporção 1:10, seguida de re-extração do resíduo foi eficaz para produzir rendimento aproximado de 40% e alto teor proteico (>90%).

- Os isolados proteicos obtidos a partir desses genótipos são promissores para aplicação nutricional, uma vez que apresentam elevado teor proteico (>90%), com proteína de razoáveis digestibilidade (>60%), perfil de aminoácidos e presença de alguns fatores antinutricionais de fácil inativação e/ou eliminação;

- Da mesma forma, esses isolados proteicos são promissores para aplicação tecnológica, uma vez que se destacaram nas propriedades de solubilidade (importante na elaboração de molhos, sopas desidratadas, alimentos de bebês, produtos de padaria, sopas desidratadas, sobremesas, dentre outros), de capacidade de absorção de água e de óleo (importante para a qualidade da textura de diversos alimentos e retenção de sabor) e de formação de gel (importante para produtos de carne cozida, gelatinas, massa de pão, produtos lácteos, dentre outros, além de melhorar a absorção de água, viscosidade, adesão entre partículas e para estabilizar espumas e emulsões).

- Os isolados proteicos podem ser utilizados como ingredientes de produtos alimentícios, contribuindo com o aumento do valor nutricional dos alimentos e agregando valor aos genótipos melhorados do feijão-caupi.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, T.; NAKAMURA, L. K.; BUCHOLZ, G.; WOLF, W. J.; PALMER, D. M.; GASDORF, H. J.; NELSEN, T. C.; KLEIMAN, R. Processes for making animal feed and protein isolate from jojoba meal. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 39, p. 1488-1493, 1991.

ADEBOWWALE, K. O.; OLU, O. B. I.; OLAWUMI, E. K.; LAWAL, O. S. Functional properties of native, physically and chemically modified breadfruit (*Artocarpus altilis*) starch. **Industrial Crops and Products**. v.21, p. 343-351, 2005.

ALGHAMDI, S.S. Chemical composition of faba bean (*Vicia faba* L) genotypes under various water regimes. **Pakistan Journal of Nutrition**. v. 8, n. 4, p. 477- 482, 2009.

ALLEONI, A. C. C. Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. **Scientia Agricola**. v. 63, p. 291-298, 2006.

ANDRADE, C. T.; NASSER, R. O. Estudo reológico da geleificação induzida pelo calor do soro do leite e dos géis resultante sob condições variadas de pH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.25, 2005.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**.16th ed. Gaitheersburgh, 1997.

APPIAH, F.; ASIBUO, J. Y.; KUMAH, P. Physicochemical and functional properties of bean flours of three cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) varieties in Ghana. **African Journal of Food Science**. v. 5, n. 2, p. 100-104, 2011.

ARAÚJO, F.M.M. **Caracterização bioquímica de sementes de cultivares de caupi *Vigna unguiculata* (L) Walp**. Dissertação de mestrado em bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997, 84p.

AREMU, M. O.; OLAOFE, O.; AKINTAYO, E. T. Functional properties of some nigerian varieties of legume seed flours and flour concentration effect on foaming and gelation properties. **Journal of Food Technology**, v. 2, n. 5, p. 109-115, 2007.

AVANZA, M. V.; CHAVES, M. G.; ACEVEDO, B. A.; AÑÓN, M. C. Functional properties and microstructure of cowpea cultivated in north-east Argentina. **Food Science and Technology**. v.49, p.123-130, 2012.

AVANZA, M.; ACEVEDO, B.; CHAVES, M.; AÑÓN, M. Nutritional and antinutritional components of four cowpeas varieties under thermal treatments: principal component analysis. **Food Science and Technology**. v. 51, p. 148-157, 2013.

BAETHGEN, W. E.; ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**. v. 20, n. 9 e10, p. 961-96, 1989.

BEUCHAT, L. R. Functional and eletrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 25, n. 2, 1977.

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, p. 248-254, 1976.

CÂNDIDO, L. M. B. **Obtenção de concentrados e hidrolisados proteicos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP, 1998, 207p.

CANO-MEDINA, A.; JIMENEZ-ISLA, H.; DENDOOVEN, L; HERRERA, R. P.; GONZÁLEZ-ALATORRE, G.; ESCAMILLA-SILVA, E. M. Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. **Food Research International**. v. 44, p. 684-692, 2011.

CARVALHO, A. F. U.; SOUSA, N. M.; FARIAS, D. F.; BEZERRA, L. C.B. R.; SILVA, R. M. P.; VIANA, M. P.; GOUVEIA, S. T.; SAMPAIO, S. S.; SOUZA, M. B.; LIMA, G. P. G.; MORAIS, S. M.; BARROS, C. C.; FREIRE, F. R. Nutrition ranking of 30 brasilian genotypes of cowpeas including determination of antioxidant capacity and vitamins. **Journal of Food Composition and Analysis**. 2012.

CASTELLÓN, R.E.R. **Caracterização bioquímica de sementes de 6 variedades de feijão-de-corda *Vigna unguiculata* (L) Walp**. Dissertação de mestrado em bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996, 78p.

CASTILLO, L. C; PACHECO, F. P.; LUGO, E. P.; NOVOA, M. O.; BURGOS, J. R.; GRANT, G. Composition and bioactive factor content of cowpea (*Vigna unguiculata* L Walp) raw meal and protein concetrates. **Journal of the science of food and agriculture**. v. 87, p. 112-119, 2007.

CAVALCANTE, M. T.; BORA, P. S.; CARVASAL, J. C. L. Propriedades funcionais das proteínas de amêndoa da faveleira (*Cnidosculus phyllacanthus* (Mart) Pax. et K. Hoffman) com e sem espinho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 29, n. 3, p. 597-602, 2009.

CHANGI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of Rice bran protein concentrates. **Journal Food Engineering**, v. 79, p. 592-597, 2007.

CHINMA, C. E.; ALEMEDE, I. C.; EMELIFE, I. G. Physicochemical and functional properties of some nigerian cowpea varieties. **Pakistan Journal of Nutrition**. v. 7, n. 1, p. 186-190, 2008.

COFFEMAN, C.; GARCÍA, V.V.; Functional properties and amino acid content of protein isolate from mung bean flour. **Journal of Food Technology**. v. 12, p. 473-484, 1977.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. Brasília, p. 14-19, 2011.

CANO-MEDINA, A; JOMÉNEZ-ISLA, H; DENDOOVEN, L; HERRERA, R. P.; GONZÁLEZ-ALATORRE, G; ESCAMILLA-SILVA, E. M. Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrate. **Food Research International**. v.44, p. 684-692, 2011.

DARFOUR, B.; WILSON, D. D.; OFOSU, D. O.; OCLOO, F. C. K. Physical and pasting properties of flour produced cowpea (*Vigna unguiculata*, L. Walp). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, p. 450-457, 2012.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. *In*: DAMODARA, S.; PARKIN, K. L; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: 2010, p. 180-260.

DONADEL, M. E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de concentrado proteico de feijão envelhecido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 19, n.3, 1999.

DONATTO, F. F.; PALLANCH, A.; CAVAGLIERI, C. R. Fibras dietéticas: efeitos terapêuticos e no exercício. **Revista Saúde**. v. 8, n. 20, p. 65-71, 2006.

EFITA, INTERNATIONAL DIRECTORY OF AGRICULTURE, FOOD AND THE ENVIRONMENT. **Cowpea, a versatile legume for hot, dry conditions**. Março/1999. Disponível: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/articles/ji-cowpea.html>. Acesso em : 09 jul. 2012.

EL-JASSER, A. S. H. Chemical and biological properties of local cowpea seed protein grown in gizan region. **International Journal of Agriculture and Biological Science**. v. 1, n. 2, 2010.

EMBRAPA MEIO NORTE. **Cultivo de feijão-caupi**. Jul/2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/importancia.htm>. Sistemas de produção, 2 ISSN 1678-8818. Acesso em: 13 jul 2012.

EMBRAPA. **Estatística de produção**. Nov/2009 Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijaocaupi/arvore/CONTAG01_16_510200683536.html. Acesso: jan/2012

ERLANGER, B. F; KOLOWSKY, N; COHEN,W. The action of chymotrypsin on two chromogenic substrates. **Archives of Biochemistry**, v. 95, p. 271-278, 1961.

ETTINGER, S. Macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos. *In*: MAHAN, K. L.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2005, p. 35-71.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Vigna unguiculata (L) walp**. <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/yearbook2012/en/>. Acesso Nov. 2012.

FAO/WHO/UNU. Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU. **Technical Report Series**. WHO, Geneva, 1985. 724p.

FARIAS, D. F. **Proteínas de sementes de Amburana cearensis (Allemao) A. C. Smith: valor nutricional e bioatividade contra patógenos e vetores de doenças**. Dissertação de mestrado em bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009, 186p.

FIGUEIRAS, G. C.; SANTOS, M. A. S S.; HOMMA, A. K. O.; REBELLO, F. K.; CRAVO, M. S. Aspectos Socioeconômicos. *In*: MARSARO JÚNIOR, A. L.; BOARI, A. J.; HOMMA, A.K. O.; VILARINHO, A. A.; LOPES, A. M.; BENDAHAN, A. B.; CORDEIRO, A. C. C.; FREITAS, A. C. R.; LIMA, A. C. S.; SILVA, A. J.; SOUZA, B. D. L.; HALFELD-VIEIRA, B. **A Cultura do Feijão-Caupi na Amazônia Brasileira**. Roraima-RR: EMBRAPA Roraima, 2009. cap. 1. p. 23-57.

FONTANARI, G. G. **Efeito do consumo de tremoço branco (*Lupinus albus*) e seu isolado proteico no metabolismo do colesterol em hamsters hipercolesterolemizados**. Tese de doutorado em alimentos e nutrição, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010, 117p.

FONTANARI, G. G.; JACON, M. C.; PASTRE, I. A.; FERTONARI, F. L., NEVES, V. A.; BATISTUTI, J. P. Isolado proteico de semente de goiaba (*Psidium guajava*): caracterização e propriedades funcionais. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, p. 73-79, 2007.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. Melhoramento Genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. ad. **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Brasília – DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. Cap. 1, p. 29-92.

FROTA, K. M. G. **Efeito do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) e da proteína isolada no metabolismo lipídico em hamsters hipercolesterolemizado**. Dissertação de mestrado em nutrição humana, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007, 135p.

FROTA, K. M. G.; MENDONÇA, S.; SALDIVA, P. H. N.; CRUZ, R. J.; ARÊAS, J. A. G. Cholesterol-Lowering Properties of Whole Cowpea Seed and Its Protein Isolate in Hamsters. **Journal of Food Science**. v. 73, n.9. 2008a.

FROTA, K. M. G, SOARES, R. A., ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, 2008b.

FURTADO, M. A. M; GOMES, J. C.; SILVA, C. A. S.; ORNELLAS, C. B. P. SILVESTRE, M. P. C. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína láctea precipitada. **Ciência Agrotécnica**. v.25, n. 3, p. 625-639, 2001.

GOMES, A. M. O; MENDEZ, M. H. M.; DERIVI, S. C. N. Digestibilidade *in vitro* de proteínas de feijões: comprometimento de aminoácidos com componentes da fração fibra da dieta. **Revista de Alimentos e Nutrição**. V. 8, p. 93-103, 1997.

GÓMEZ, C. Cowpea: Post-Harvest Operations. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**. Rome: 2004, p. 5-31.

GRANGEIRO, T. B.; CASTELLÓN, R. E. R.; ARAÚJO, F. M. C.; SILVA, S. M. S.; FREIRE, E. A.; CAJAZEIRAS, J. B.; ANDRADE NETO, M.; GRANGEIRO, M. B; CAVADA, B. S.. Composição Bioquímica da Semente. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. Ed. **Feijão-Caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília – DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. Cap. 9. P. 337-365.

HEKKEN, V. D. L.; STRANGE, E. D. Functional properties of dephosphorylated bovine whole casein. **Journal of Dairy Science**. v. 76, n.5, p. 3384-3391, 1993.

HOFFMAN, J. R.; FALVO, M. J. Protein – which is best?. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 3, p. 118-130, 2004.

HORAX, R.; HETTLARACHCHY, N. S.; CHEN, P.; JALALUDDIN, M. Functional properties of protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Food chemistry and toxicology**. v. 69, n 2, 2004.

HORAX, R.; HETTLARACHCHY, N.; KANNAN, A.; CHEN, P. Protein extraction optimisation, characterisation, and functionalities of protein isolate from bitter melon (*Momordica charantia*) seed. **Food Chemistry**. v.124, p.545-550, 2011.

IITA, INSTITUTO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Cowpea**. Disponível em: http://old.iita.org/cms/details/cowpea_project_details.aspx?zoneid=63&articleid=269 Acesso em: 09 jul. 2012.

IQBAL, A; KHALIL, I. A.; ATEEQ, N; KHAN, M. S. Nutrition quality of important food legumes. **Food Chemistry**. v. 97, p. 331 – 335, 2006.

KAUSHAL, P.; KUMAR, V.; SHARMA, H. K. Comparative study of physicochemical, functional, antinutritional and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta*), rice (*Oryza Sativa*) flour, pigeonpea (*cajanus cajan*) flour and their blends. **Food Science and Technology**. v. 48, p. 59-68, 2012.

KHALID, I. I; ELHAR DALLOU, S. B.; ELKHALIFA, E. A. Composition and functional properties of Cowpea (*Viga unguiculata* L Walp) flour and protein isolates. **American Journal Food Technology**. v. 7 , n. 3, p. 113-122. 2012.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 689-695, 1970.

LAWAL, O. S. Functionality of African locust bean (*Parkia biglobassa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. **Food Chemistry**, v. 86, p. 345-355, 2004.

LOMAKINA, K.; MIKOVA, K. A study of the factors affecting the foaming properties of egg white. **Czech Journal of Food Science**. v.24, p. 110-118, 2006.

MAIA, F. M. M. **Composição e caracterização nutricional de três cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. EPACE 10, OLHO DE OVELHA E IPA-206.** Dissertação de mestrado em bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996, 87p.

MAIA, F. M. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; MATOS, M. R. T.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M. Proximate composition, amino acid content and haemagglutinating activities of some Brazilian *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivars. **Journal of the Science Food and Agriculture.** v. 80, p. 453-458, 2000.

MATOS, M.R.T. **Estudos bioquímicos e nutricionais de três cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. EPACE 11, PITIÚBA e TVU 1888.** Dissertação de mestrado em bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997, 78p.

MENDONÇA, C. V. C. E.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D.; MORAIS, A. R. Quantificação de polifenóis e digestibilidade proteica de famílias de feijoeiro comum. **Ciência e Agrotecnologia.** v.27, n. 4, p. 858-864, 2003.

MESQUITA, F. R., CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, C. M. P. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L): Composição química e digestibilidade proteica. **Ciência e Agrotecnologia.** v. 31, n. 4, p. 1114-1121, 2007.

MIZUBUTI, I. Y.; JUNIOR, O. B.; SANTOS, L. W. S.; SILVA, R. S. S. R.; IDA, E. I. Propriedades funcionais da farinha e do concentrado proteico de feijão gandu [*Cajanus Cajan* (I) Millso]. **ALAN,** v.50, n.3, Caracas, set. 2000.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology.** v. 59, p. 783-787, 1977.

MURPHY, J. M. FOX, P. F. Functional properties α /k or β rich casein fractions. **Food Chemistry.** v. 39, p. 211-228, 1991.

MWANGWELA, A. M.; WANISKA, R. D.; MINNAAR, A.; Effect of micronisation temperature (130 and 170°C) and functional properties of cowpea flour. **Food Chemistry.** V. 104, p.650-657, 2007.

MWASARU, M. A.; MUHAMMAD, K.; BAKAR, J.; CHE MAN, Y. B.; Effects of isolation technique and conditions on the extractability. Physicochemical and functional properties of pigeonpean (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties. **Food Chemistry.** v. 67, p. 435-443, 1999.

OGUEKE, C. C.; OWUAMANAM, C. I.; IWOUNO, J. O. Functional properties and proximate composition of asparagus bean (*Vigna sesquipedalis*) as influenced by malting. **Journal of American Science**. v. 6, n. 9, p. 376-382, 2010.

OGUNWOLU, S. O.; HENSHAW, O. F.; MOCK, H. P.; SANTROS, A.; AWONORIN, S. O. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut. **Food Chemistry**., v. 115, p. 852-858, 2009

ONWULIRI, V. A.; OBU, J. A. Lipids and other constituents of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* grown in Northern Nigeria. **Food Chemistry**. v. 78, p. 1-7, 2002.

ONYENEKWE, P. C.; NJOKU, G. C.; AMEH, D. K. Effect of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Methods on Flatus Causing Oligosaccharides. **Nutrition Research**. v. 20, n. 3, p. 349-358. 2000.

ORDOÑEZ, J. A.; RODRIGUES, M. I. C.; ALVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MIGUILLON, G. D. G. F. **Componentes dos Alimentos e Processos: tecnologia de alimentos**. Porto Alegre-RS: Artmed, v. 1, 2005.

ORNELLAS, C. B. D.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. Efeito da adição de NaCl sobre as propriedades funcionais do plasma bovino e de seus hidrolisados trópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 20, n. 3, p. 391-397, 2000.

PEDNEKAR, M.; DAS, A. K.; RAJALAKSHMI, V.; SHARMA, A. Radiation processing and functional properties of soybean (glycine Max). **Radiation Physics and Chemistry**. V. 79, p. 490-494, 2010.

PHILLIPS, R. D.; MCWATTERS, K. H.; CHINNAN, M. S.; HUNG, Y. C.; BEUCHT, L. R.; SEFA-DEDEH, S.; SKYI-DAWSON, E.; NGODDY, P.; NNAWYELUGO, D.; ENWERE, J.; KOMEY, N. S.; LIU, K.; MENSA-WILMOT, Y.; NNANNA, I. A.; OKEKE, C.; PRINYAWIWATKUL, W.; SAALIA, F. K.; Utilization of Cowpeas for Human Food. **Field Crops Research**, v.82, p.193-213, 2003.

PINCIROLI, M. VIDAL, A. A.; AÑÓN, M. C.; MARTÍNEZ. Comparison between protein functional properties of two Rice cultivars. **Food Science and Technology**. V. 42, p. 1605-1610, 2009.

PINTÉR-SZAKÁCS, M.; MOLNÁR-PERL, H. Determination of tryptophan in unhydrolyzed food and feedstuffs by the acid ninhydrin method. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, p. 720-726, 1990.

PRINYAWIWATKUL, W.; BEUCHAT, L. R.; MCWATTERS, K. H.; PHILLIPS, R. D. Functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) flour as affected by soa king, a boiling, and fungal fermentation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 45, p. 480-486, 1997.

RAGAD, D. M.; BABIKER, E.; ELTINAY, A. H. Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. **Food Chemistry**. V. 84, p. 207 – 212, 2004.

RANGEL, A.; DOMONT, G. B.; PEDROSA, C.; FERREIRA, S. T. Functional properties of purified vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and pea (*Pisum sativum*) and cowpea isolate. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 51, p. 5792-5797, 2003.

RAPHAEL, M. L. **Recovery and Kinetics Study of Isoelectric Precipitation of Sunflower Protein in Tubular Precipitation**. 1997. Thesis – University of Saskatchewan, Saskatoon.

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

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

RODRÍGUES-AMBRIZ, S. L.; MARTÍNEZ-AYALA, A. L.; MILLÁN, F.; DÁVILA-ORTÍNEZ, G. Composition and functional properties of *Lupinus campestris* protein isolate. **Plant Food of Human Nutrition**. v. 10, p. 100-107, 2005.

ROUIMI, S.; SCHORSCH, C.; VALENTINI, C.; VASLIN, S. Foam stability and interfacial properties of milk protein-surfactant systems. **Food Hydrocolloids**. v. 19, p. 467-478, 2005.

SALGADO, S. M.; GUERRA, N. B., ANDRADE, S. A. C.; LIVERA, A. V. S. Caracterização físico-química do grânulo do amido do feijão-caupi. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n. 3, p. 525-530, 2005.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; CLEMENTE, A.; VIOQUE, J.; BAUTISTA, J.; MILLÁN, F. Protein isolate from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. **Food Chemistry**. v. 64, p. 237-243, 1999.

SÁNCHEZ, C. S.; CASTAÑEDA, J. G.; RODRÍGUEZ, A. L.; ROSA, A. P. Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two mexican varieties. **Plant Food Human Nutrition**. v.59, n. 4, p. 169-174, 2004.

SANTOS, J. B.; GAVILANTES, M. L. Botânica. *In*: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de minas**. Viçosa: UFV, 1998. p. 55-79.

SANTOS, C. T.; **Farinha da semente de jaca: caracterização físico-química e propriedades funcionais**. Dissertação de mestrado em bioquímica, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2009, 73p.

SANTOS, O. V.; LOPES, A. S.; CARDOSO, V. M. M.; SILVA, R. J. F. Avaliação de misturas proteicas com farinha desengordurada da castanha do Brasil e isolado proteico de soja: comportamento técnico e morfológico. **Sinergia**. v. 13, n. 1, p. 35-41, 2012.

SATHE, S. K.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. Functional properties of lupin seed (*Lupinus mutabilis*) protein and protein concentrates journal. **Journal Food Science**, v. 47, n 3, p. 491-497, 1982.

SATHE, S. K.; HAMAKER, B. R.; SZE-TAO, K. W. C.; VENKATACHALAM, M. Isolation, purification, and biochemical characterization of now water soluble protein from inca peanut. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 50, p. 4906-4908, 2002.

SEAB, SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Feijão-análise da conjuntura agropecuária**. Out/2012. http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/feijao_2012_13.pdf. Acesso: nov 2012

SGARBIERI, V. C. Fontes de proteínas na alimentação. *In*: _____. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações**. São Paulo: Varela, 1996a. p. 139-257.

SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais das proteínas e dos alimentos proteicos . *In*: _____. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações**. São Paulo: Varela, 1996b. p. 259-334.

SIDDIQ, M; RAVI, R.; HARTE, J. B.; DOLAN, K. D. Physical and functional characteristics of seleted dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. **Food Science and Technology**. V. 43, p. 232-237, 2010.

SILVA, L. P.; LEITE, J. R. S. A.; BLOCH JUNIOR, C.; FREITAS, S. M. Stability of a Black Eyed Pea Trypsin/Chymotrypsin Inhibitor (BTCI). **Protein and Peptide Letters**. v.8 , n.1, p. 33-38. 2001.

SILVA-SANCHÉZ, C.; GONZÁLEZ-CASTANHEDA, J.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; ROSA, A. P.B. Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two mexican varieties. **Plants foods for human nutrition**. v. 59. p. 169-174, 2004.

SOUSA, N. M.; **Classificação de trinta genótipos de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] por meio de caracterização bioquímica e nutricional**. Dissertação de mestrado em bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010, 84p.

SOUZA, M. W. S; FERREIRA, T. B. O.; VIEIRA, I. F. R. Composição centesimal e propriedades funcionais tecnológicas da farinha da casca do maracujá. **Alimentos e Nutrição**. v. 19, n. 1, p.33-36, 2008.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S.; Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids . **Analytical Chemistry**. v.30, p. 1190-1206, 1958.

SREERAMA, N. Y.; SASHIKALA, V. B.; PRATAPE, V. M.; SINGH, V. Nutrients and antinutrients in cowpea and horse flours in comparison to chickpea flour: evaluation of their flour functionality. **Food Chemistry**, v. 131, p. 462-468, 2012.

SWAISGOOD, H. E. Características do leite. *In*: DAMODARA, S.; PARKIN, K. L; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: 2010, p. 690-716.

TANG, G. H.; CHEN, L.; MA, C. Y. Thermal aggregation, amino acid composition an *in vitro* digestibility of vicilin rich protein isolates from three Phaseolus legumes: a comparative study. **Food Chemistry**. v. 113, p. 957-963, 2009.

TIMKO, M. P.; EHLERS, J. D.; ROBERTS, P. A. Cowpea. **Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants**. v. 3, p. 49-67, 2007.

TIMKO, M. P.; SINGH, B. B. Cowpea, a Multifunctional Legume. **Genome of tropical Crop Plants**. 2008

TOTOSAUS, A.; MONTEJANO, J. C.; SALAZAR, J. A.; GUERREIRO, I. A review of physical and chemical protein gel induction. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 37, p. 589-601, 2002.

UWAEGBUTE, A. C.; IROEGBU, C. V.; EKE, O.; Chemical and sensory evaluation of germinated cowpeas (*Vigna unguiculata*) and their products. **Food Chemistry**. v.68, p. 141-146, 2000.

VALLIM, A. P. S.W. **Efeitos do tratamento hidrotérmico na formação de isoflavonas agliconadas e nas propriedades funcionais do isolado proteico de soja**. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011, 136p.

VASCONCELOS, I. M.; MAIA, F. M. M.; FARIAS, D. F.; CAMPELO, C. C.; CARVALHO, A. F. U.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Protein fractions, aminoacid composition and antnutritional constituents of high-yielding cowpea cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 23, p. 54-60, 2010.

VASCONCELOS, I.M., SIEBRA, E.A., MAIA, A.A.B., MOREIRA, R.A., NETO, A.F., CAMPELO, G.J.A., OLIVEIRA, J.T.A. Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of Brazilian soybean (*Glycine max*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.75, n. 4, p. 419-426, 1997.

WALSTRA, P; VLIET, T. V. Sistemas dispersos: considerações básicas. *In*: Damodara, S.; Parkin, K. L; Fennema, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: 2010, p.611-658.

WERE, L.; HETTIARACHCHY, L; KALAPATHY, U. Modified soy protein with improve foaming and water hydratation proteins. **Journal of Food Science**. v. 62, p. 821-824, 1997.

WOLF, W. J. Soybean proteins: their functional, chemical, and physical properties. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 18, n. 6, 1970

YASUMATSU, K.; SAWABA, K; MORITAKA, S; MISAKI, M; TODA, J; WADA, T; ISHII, K. Whipping and emulsifying of soybean products. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 36, n. 5, p. 719-727, 1972.

ZAVAREZE, E. R.; SILVA, M. C.; SALAS-MELLADO, M.; HERNÁNDEZ, C. P. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**. v.32, p. 1739-1743, 2000.