

Guia para Caracterização Tecnológica- Funcional de Ingredientes Proteicos para o Mercado de Produtos de Origem Vegetal



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

DOCUMENTOS 145

Guia para Caracterização Tecnológica- Funcional de Ingredientes Proteicos para o Mercado de Produtos de Origem Vegetal

*Caroline Mellinger Silva
Ilana Felberg
Janice Ribeiro Lima
Lucas de Paiva Gouvêa
Melicia Cintia Galdeano
Rodrigo Fernandes Caldeira
Tatiana de Lima Azevedo*

***Embrapa Agroindústria de Alimentos
Rio de Janeiro, RJ
2022***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos
Avenida das Américas, 29.501 - Guaratiba
CEP 23.020-470, Rio de Janeiro, RJ
Fone: +55 (21) 3622-9600
Fax: +55 (21) 3622-9713
www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações e Editoração
da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Presidente
Karina Maria Olbrich dos Santos

Secretária-executiva
Virgínia Martins da Matta

Membros
*André Luis do Nascimento Gomes, Celma
Rivanda Machado de Araujo, Daniela De Grandi
Castro Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida
Soares, Janice Ribeiro Lima, Leda Maria Fortes
Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Melicia
Cintia Galdeano e Otniel Freitas-Silva*

Supervisão editorial
Virgínia Martins da Matta

Revisão de texto
Renata Valeriano Tonon

Normalização bibliográfica
Celma Rivanda Machado de Araujo

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
André Luis do Nascimento Gomes

Foto da capa
Sidney Pacheco

1ª edição
Publicação digital (2022): PDF

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Guia para caracterização tecnológica-funcional de ingredientes proteicos para o
mercado de produtos de origem vegetal / Caroline Mellinger Silva ... [et al.]. – Rio
de Janeiro : Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2022.

PDF (27 p.) (Documentos / Embrapa Agroindústria de Alimentos, ISSN 1516-
8247 ; 145).

1. Tecnologia de alimento. 2. Concentrado proteico. 3. Ingrediente alimentício.
4. Produto de origem vegetal. I. Silva, Caroline Mellinger. II. Felberg, Ilana. III.
Lima, Janice Ribeiro. IV. Gouvêa, Lucas de Paiva. V. Galdeano, Melicia Cintia. VI.
Caldeira, Rodrigo Fernandes. VII. Azevedo, Tatiana de Lima. VIII. Série.

CDD (23. ed.) 664.8

© Embrapa, 2022

Celma Rivanda Machado de Araujo (CRB-07/5517)

Autores

Caroline Mellinger Silva

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

Ilana Felberg

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

Janice Ribeiro Lima

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

Lucas de Paiva Gouvêa

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

Melicia Cintia Galdeano

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

Rodrigo Fernandes Caldeira

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

Tatiana de Lima Azevedo

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

Agradecimentos

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

Apresentação

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

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

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

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

Edna Maria Morais Oliveira

Chefe-Geral da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Sumário

Introdução.....	11
Etapas de definição dos métodos para caracterização tecnológica- funcional de ingredientes proteicos vegetais	11
Seleção das propriedades tecnológicas-funcionais de interesse	12
Seleção dos ingredientes a serem testados nas metodologias.....	12
Seleção dos métodos disponíveis na literatura	12
Identificação das variáveis observadas para cada método selecionado	12
Seleção dos parâmetros e ensaios laboratoriais	13
Métodos para avaliação tecnológica-funcional de ingredientes proteicos vegetais	13
Capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão.....	13
Capacidade de formação de espuma e estabilidade de espuma	16
Solubilidade em água	18
Capacidade de absorção de água e de óleo	20
Capacidade de formação de gel	23
Considerações finais	25
Referências	25

Introdução

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

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

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

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

Seleção das propriedades tecnológicas-funcionais de interesse

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

Após consulta aos documentos técnicos e científicos, a seleção foi realizada pela frequência e interesse das propriedades encontradas, bem como pela complementaridade técnica de informações que cada propriedade gera. Assim, as propriedades selecionadas foram: capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão, capacidade de formação de espuma e estabilidade de espuma, solubilidade em água, capacidade de absorção de água e de óleo e capacidade de formação de gel.

Seleção dos ingredientes a serem testados nas metodologias

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

Seleção dos métodos disponíveis na literatura

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

Identificação das variáveis observadas para cada método selecionado

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

Seleção dos parâmetros e ensaios laboratoriais

Foi realizada uma análise crítica para cada variável selecionada no item anterior. Para algumas delas foi realizada uma tomada de decisão teórica, tendo em vista os ingredientes a serem analisados e a utilidade do método para análise de ingredientes proteicos vegetais. Para outras variáveis, quando havia dúvida técnica quanto ao melhor procedimento a ser adotado, foram realizados testes laboratoriais com as variáveis apontadas pela literatura. Nesses casos, essas variáveis foram testadas com os oito ingredientes previamente mencionados, de modo a selecionar o procedimento que fosse mais reprodutível ou mais apropriado para as respostas esperadas. Por fim, os procedimentos selecionados foram utilizados para avaliação dos oito ingredientes, em três ou mais replicatas, e os resultados para cada uma das propriedades analisadas apresentaram coeficiente de variação inferior a 10%.

Métodos para avaliação tecnológica-funcional de ingredientes proteicos vegetais

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

Capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão

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

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

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

Procedimento:

- Em um béquer de 100 mL, pesar 300 mg da amostra proteica e adicionar 60 mL de água destilada para cada replicata. Homogeneizar e anotar a concentração exata em g/mL;
- Medir o pH e ajustá-lo para pH 7,0 usando NaOH 0,1 mol/L ou HCl 0,1 mol/L;
- Em seguida, adicionar 20 mL de óleo de soja comercial à amostra solubilizada e emulsionar, imediatamente, com um homogeneizador tipo Ultra-Turrax (probe S 25 KV-18 G) na rotação de 9500 rpm por um minuto à temperatura ambiente. O dispersor do Ultra-Turrax deve ficar posicionado a uma altura de 5 mm a 7 mm do fundo do béquer (Figura 1);
- Retirar uma alíquota de 50 µL entre o meio e o fundo do béquer, imediatamente após a homogeneização;
- Adicionar a alíquota de 50 µL em um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução aquosa de SDS (Dodecil sulfato de sódio) 0,1% (p/v) e homogeneizar por 30 segundos em vortex;
- Zerar o espectrofotômetro com a solução de SDS 0,1%;
- Realizar a leitura de absorbância da amostra no comprimento de onda de 500 nm. Esta amostra será considerada tempo zero (A_0);
- Após 10 minutos, pipetar 50 µL entre o meio e o fundo do béquer contendo a emulsão, adicionar em 5 mL de SDS 0,1% e homogeneizar por 30 segundos em vortex;
- Fazer a leitura no espectrofotômetro (A_{10});
- Calcular o índice de atividade emulsificante (EAI - *Emulsifying Activity Index*) em m²/g, utilizando a seguinte equação:

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

Onde:

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

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

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

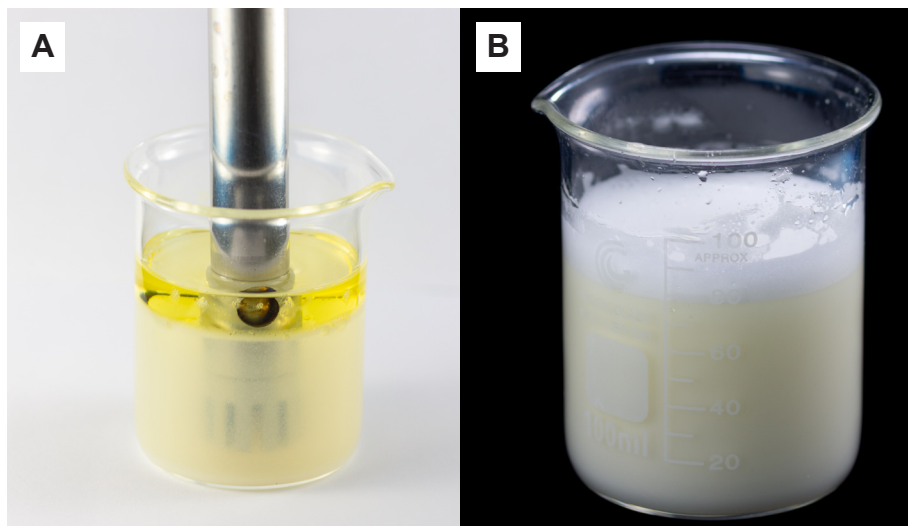
- Calcular o índice de estabilidade da emulsão (ESI - *Emulsion Stability Index*) em minutos, utilizando a seguinte equação:

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

Onde:

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

A_{10} é a absorbância da emulsão após 10 minutos.



Fotos: Sidney Pacheco

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

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

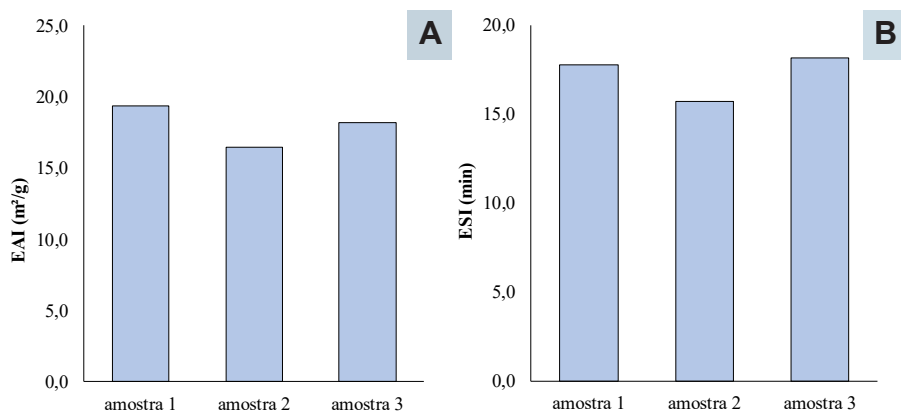


Figura 2. Modelo de representação gráfica de (A) capacidade emulsificante – EAI e (B) estabilidade de emulsão – ESI.

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

Capacidade de formação de espuma e estabilidade de espuma

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

Procedimento:

- Pesar 1,5 g da amostra proteica em um béquer de 100 mL;
- Homogeneizar a amostra com 60 mL de água destilada usando um bastão de vidro para solubilização e, em seguida, em um agitador magnético, manter a homogeneização durante a correção de pH e retirada da alíquota (esse volume de solução é suficiente para que o experimento seja realizado em triplicata);
- Ajustar o pH da dispersão para 7,0 utilizando NaOH 0,1 mol/L ou HCl 0,1 mol/L;

- Retirar 15 mL da solução e adicionar em um béquer de 100 mL (a partir daqui, o procedimento segue descrito para cada replicata);
- Homogeneizar utilizando Ultra-Turrax por 2 minutos (probe S 25 KV-18 G), seguindo a rampa de rotação/tempo, na seguinte sequência, de modo direto, sem interrupção: 6500 rpm/30 s, 9500 rpm/30 s e 13500 rpm/60 s. Observar que o dispersor deverá ficar submerso 5 mm de profundidade na amostra para que ocorra uma boa formação de espuma;
- Transferir todo o conteúdo do béquer para uma proveta de 50 mL com auxílio de uma espátula, acertando as bordas para que a espuma fique nivelada na proveta (recomenda-se que o responsável pela análise estipule um tempo máximo para passar a solução e a espuma para a proveta, minimizando o erro entre as amostras) (Figura 3);
- Medir e anotar o volume da espuma na própria proveta, nos tempos 0 minuto, 10 minutos, 30 minutos e 60 minutos;
- Calcular a capacidade de formação de espuma (FC - *Foaming Capacity*) e a estabilidade de espuma (FS - *Foaming Stability*) utilizando as seguintes equações:

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

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

Onde:

V_0 é o volume inicial da solução da amostra proteica.

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

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



Fotos: Sidney Pacheco

Figura 3. Formação de espuma.

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

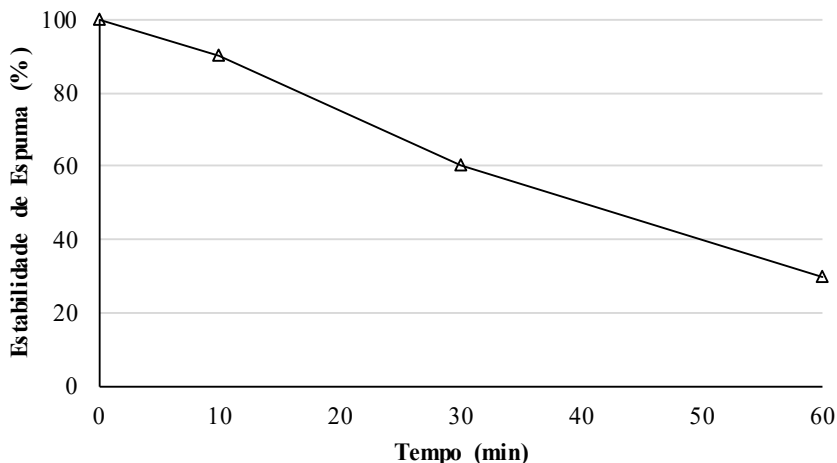


Figura 4. Modelo de gráfico para representação da estabilidade de espuma de ingredientes proteicos.

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

Solubilidade em água

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

Procedimento:

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

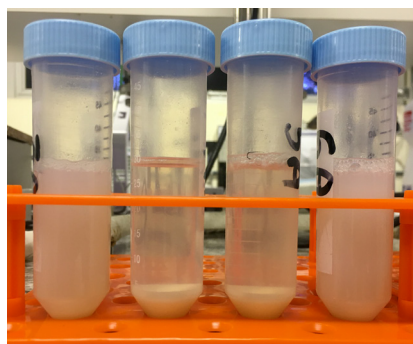
$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{C}{C_T} \times 100$$

Onde:

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

C_T é concentração total de proteína presente na amostra controle.

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



Fotos: Sidney Pacheco

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

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

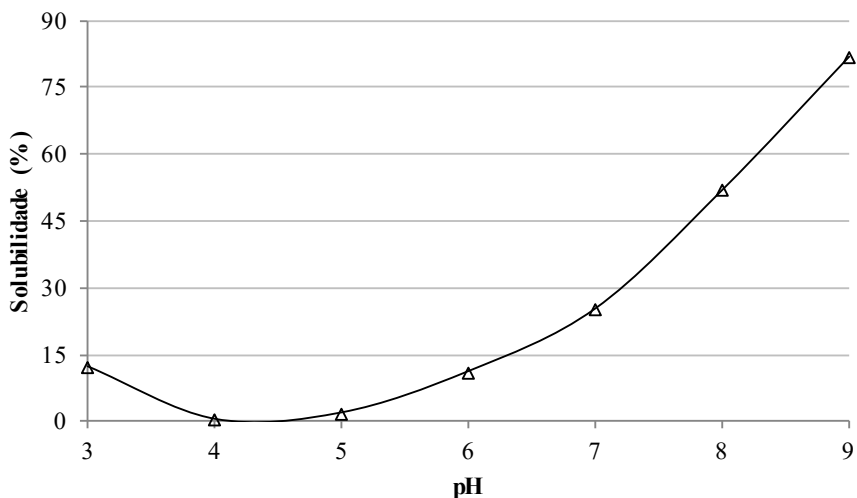


Figura 6. Modelo de gráfico para representação da solubilidade de ingredientes proteicos.

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

Capacidade de absorção de água e de óleo

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

A capacidade de absorção de água é uma propriedade muito importante nos ingredientes proteicos, pois a retenção de água é um fator a ser considerado na produção de alimentos viscosos como sopas e de algumas massas no processo de panificação. Por outro lado, a retenção de óleo por parte

dos ingredientes é importante para a aplicação na indústria de alimentos, principalmente no processo de elaboração de embutidos, pois podem formar emulsões, unindo a água e a gordura na fabricação, por exemplo, de salsichas.

Procedimento:

- Pesar e anotar a massa de um microtubo tipo Eppendorf, para cada replicata (M_t);
- Pesar, nesse microtubo, aproximadamente 100 mg do ingrediente proteico e anotar o valor exato da massa de amostra, descontando a massa do microtubo (M_0);
- Adicionar 1 mL de água destilada (para capacidade de absorção de água) ou 1 mL de óleo de soja (para capacidade de absorção de óleo) ao microtubo;
- Fechar o tubo e homogeneizar manualmente até que a amostra apresente aspecto homogêneo;
- Agitar em aparelho tipo vortex por 1 minuto;
- Deixar em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente;
- Centrifugar em centrífuga de microtubos à temperatura ambiente na rotação de 12000 rpm pelo período de 20 minutos (Figura 7A);
- Verter todo o sobrenadante e descartar;
- Em seguida, encostar a borda do microtubo em papel absorvente para drenar o sobrenadante residual (Figura 7B);
- Pesar o tubo tipo Eppendorf com o precipitado e anotar a massa (M_1).
- Calcular a capacidade de absorção de água (WHC - *Water Holding Capacity*), ou capacidade de absorção de óleo (OHC - *Oil Holding Capacity*) utilizando a seguinte equação:

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

Onde:

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

M_0 é a massa (g) inicial da amostra.

M_t é a massa (g) do microtubo tipo Eppendorf.

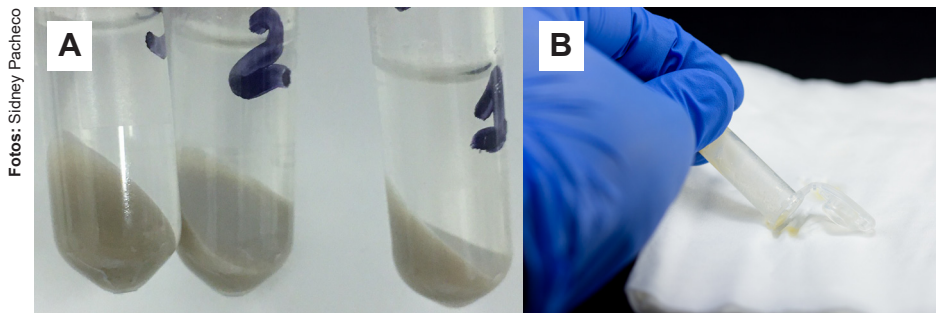


Figura 7. Análise de absorção de água (ou de óleo). (A) Microtubos, (B) Retirada de sobrenadante residual do microtubo em papel absorvente.

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

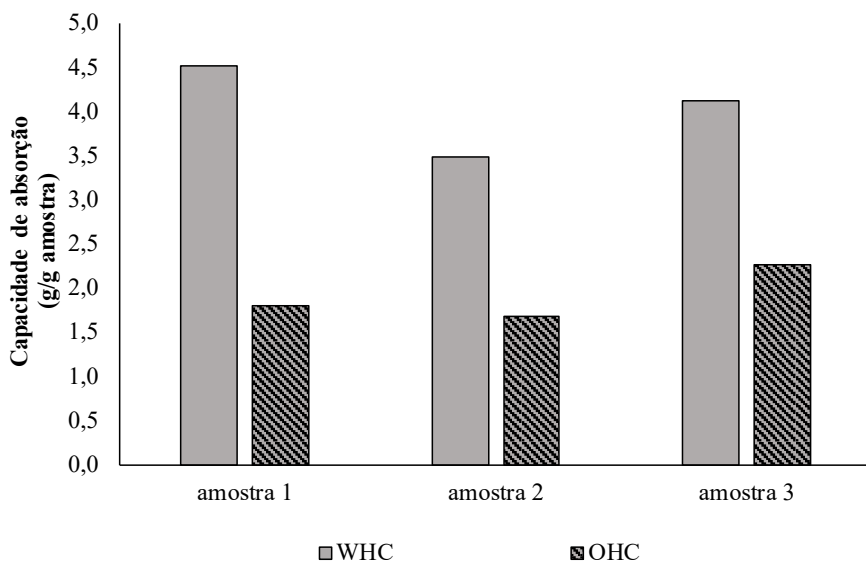


Figura 8. Exemplo de representação gráfica das análises de absorção de água (WHC) e de óleo (OHC).

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

Capacidade de formação de gel

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

Procedimento:

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

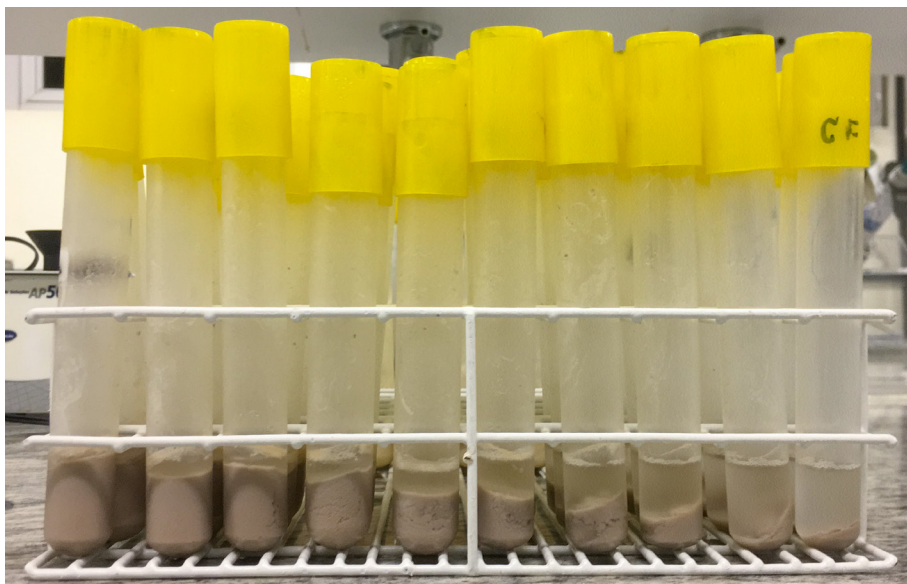


Figura 9. Teste de formação de gel com tubos em ordem decrescente de concentração. Tubos da esquerda para a direita são referentes às concentrações de 0,20; 0,18; 0,16; 0,14; 0,12; 0,10; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 g/mL.

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

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

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

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

Considerações finais

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

Referências

- ALZUWAID, N. T.; SISSONS, M.; LADDOMADA, B.; FELLOWS, C. M. Nutritional and functional properties of durum wheat bran protein concentrate. **Cereal Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 304–315, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/cche.10246>.
- AYDEMIR, L. Y.; YEMENICIOĞLU, A. Potential of Turkish Kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 686–694, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.023>.
- BOYE, J. I.; AKSAY, S.; RIBÉREAU, S. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 537–546, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>.
- BOZKURT, F.; BEKIROĞLU, H.; DOĞAN, K.; KARASU, S.; SAGDIC, O. Technological and bioactive properties of wheat glutenin hydrolysates prepared with various commercial proteases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 149, e-111787, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111787>.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248–254, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- ČAKAREVIĆ, J.; VIDOVIĆ, S.; VLADIĆ, J.; GAVARIĆ, A.; JOKIĆ, S.; PAVLOVIĆ, N.; BLAŽIĆ, M.; POPOVIĆ, L. Production of bio-functional protein through revalorization of apricot kernel cake. **Foods**, v. 8, n. 8, p. 1–12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods8080318>.
- DE LA ROSA-MILLÁN, J.; ORONA-PADILLA, J. L.; FLORES-MORENO, V. M.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Physicochemical, functional and ATR-FTIR molecular analysis of protein extracts derived from starchy pulses. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1414–1424, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13719>.
- DU, S.-K.; JIANG, H.; YU, X.; JANE, J.-L. Physicochemical and functional properties of whole legume flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 308–313, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.001>.
- GHRIBI, A. M.; GAFSI, I. M.; BLECKER, C.; DANTHINE, S.; ATTIA, H.; BESBES, S. Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 165, p. 179–188, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.021>.

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

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

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

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

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

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

LADJAL-ETTOUMI, Y.; BOUDRIES, H.; CHIBANE, M.; ROMERO, A. Pea, Chickpea and lentil protein isolates: physicochemical characterization and emulsifying properties. **Food Biophysics**, v. 11, p. 43–51, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9411-6>.

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

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

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

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

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

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 716–723, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>.

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

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

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

SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: emulsion, foaming, viscosity, and gelation properties. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 1, p. 71–81, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb14533.x>.

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

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



Agroindústria de Alimentos

