

Potencial Antioxidante de Proteínas Extraídas de Feijão Comum (*Phaseolus vulgaris*) cv. BRSMG-Madrepérola

Antioxidant Potential of Proteins Extracted from Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) cv. BRSMG-Madrepérola

Ailton Cesar Lemes^{a*}; Ladyslène Christhyns de Paula^{bc}; Karla de Aleluia Batista^d; Kátia Flávia Fernandes^e

^aInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, GO, Brasil.

^bUniversidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas, GO, Brasil.

^cUniversidade Federal de Rondônia, Departamento de Engenharia de Alimentos, RO, Brasil.

^dInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas, GO, Brasil.

^eUniversidade Federal de Goiás, Laboratório de Química de Polímeros GO, Brasil.

*E-mail: ailton.lemes@ifgoiano.edu.br

Resumo

O feijão fornece nutrientes essenciais que podem substituir parcialmente outros produtos proteicos para a população de baixa renda. No entanto, os grãos de feijão estão sujeitos aos fenômenos de escurecimento e endurecimento pós-colheita, que resultam na perda de qualidade tecnológica e sensorial, além da rejeição do produto por grande parte dos consumidores. Quando os processos que resultam nestes fenômenos não são controlados, são necessários mecanismos de aproveitamento deste grão para evitar seu descarte. Uma forma de aproveitamento compreende o fracionamento dos componentes presentes no grão para a obtenção de diversos bioprodutos com propriedades bioativas, tais como os peptídeos bioativos. O objetivo deste trabalho foi realizar a extração proteica de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cv. BRSMG-Madrepérola a partir de diferentes métodos de extração e verificar a atividade antioxidante *in vitro* por FRAP e DPPH dos extratos proteicos. O melhor método de extração proteica foi o método de extração alcalina (pH 8,0), com até 28,9 mg/mL para o feijão ETC. Já a maior atividade antioxidante, verificada pelo método FRAP, foi alcançada na extração que compreende o uso de acetato de sódio 20 mM pH 5,0. Os resultados indicam a viabilidade de obtenção de antioxidantes de ocorrência natural e a agregação de valor a substratos proteicos de baixo custo, ou que seriam descartados por serem sujeitos aos fenômenos de endurecimento.

Palavras-chave: Endurecimento. Bioatividade. Antioxidante. DPPH. FRAP.

Abstract

Common beans provide essential nutrients that can partially replace other protein products for the low-income population. However, bean grains are subject to the phenomena of darkening and post-harvest hardening, which result in the loss of technological and sensorial quality, in addition to rejection of the product by most consumers. When the processes that result in these phenomena are not controlled, mechanisms of utilization of this grain are necessary to avoid its discard. An alternative to integral use comprises the fractionation of the components present in the grain to obtain several bioproducts with bioactive properties, such as the bioactive peptides. The aim of this work was to perform the protein extraction of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cv. BRSMG- cv. BRSMG-Madrepérola from different extraction methods and to verify the antioxidant activity of the protein extracts *in vitro* by FRAP and DPPH methods. The method that resulted in higher protein extraction was the alkaline extraction method (pH 8.0), 28.9 mg / mL for ETC beans. The highest antioxidant activity, verified by the FRAP method, was achieved in the extraction method which included the use of 20 mM sodium acetate pH 5.0. The "Hard-to-cook" phenomenon did not seem to affect definitively the bioactivity of the bioactive proteins obtained, suggesting that it is possible to use these components as an alternative for the use of the grains affected by the hardening process.

Keywords: Hardening. Bioactivity. Antioxidant. DPPH, FRAP.

1 Introdução

Dentre as diversas classes de alimentos, as leguminosas representam um importante componente da dieta humana em diversas regiões do mundo, sendo o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) um dos mais consumidos pela população, principalmente no Brasil. Ele supre grande parte das necessidades proteicas diárias dos indivíduos, uma vez que 20% a 30% da massa seca das sementes é constituída por proteínas (BATISTA, 2010), podendo substituir parcialmente outros produtos proteicos para a população de baixa renda.

Além do elevado teor proteico, nutricionalmente, o feijão apresenta alto teor de ferro, cálcio, vitaminas, principalmente do complexo B, carboidratos, fibras, além de lisina, que é um

aminoácido essencial. No entanto, os grãos de feijão estão sujeitos aos fenômenos de escurecimento e endurecimento pós-colheita, que resultam na perda de qualidade tecnológica e sensorial, além da rejeição do produto por grande parte dos consumidores (SIQUEIRA *et al.*, 2016).

Quando os processos que resultam nestes fenômenos não são controlados, são necessários mecanismos de aproveitamento deste grão para evitar seu descarte. Uma forma de aproveitamento compreende o fracionamento dos componentes presentes no grão para a obtenção de diversos bioprodutos com propriedades bioativas, tais como os peptídeos bioativos (OSEGUERA-TOLEDO *et al.*, 2011). Os peptídeos bioativos são compostos que exibem efeito nas funções ou

condições do corpo e podem influenciar a saúde humana. Eles diferem amplamente em sua composição de aminoácidos, estrutura química e, portanto, em sua função biológica. Esses compostos frequentemente apresentam efeitos na redução do colesterol, além de atividades antiprotozoárias, antivirais, antitrombóticas, anti-hipertensivas, antimicrobianas e antioxidantes, o que os torna atraentes para aplicação em alimentos e fármacos (LEMES *et al.*, 2016).

Os antioxidantes podem ser aplicados em processos oxidativos, uma vez que a oxidação resulta na produção de radicais livres (O^2 , OH, H_2O_2) durante o metabolismo e a respiração em organismos aeróbicos. Quando eles são produzidos em excesso e não são eliminados, os radicais podem atacar as moléculas mais próximas, subtraindo elétrons e iniciando uma reação em cadeia na qual uma molécula sem elétron ataca outras moléculas. Os radicais livres desempenham um papel crítico em distúrbios relacionados à saúde e podem levar a doenças cardíacas, aterosclerose, diabetes, câncer e doenças neurológicas. Nos alimentos, eles podem resultar na deterioração de atributos de qualidade,

como sabor, cor e textura (LEMES *et al.*, 2016).

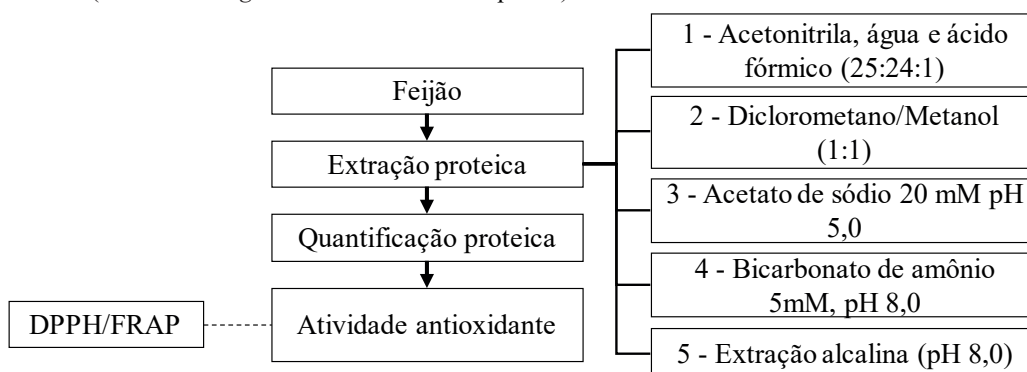
Devido à complexidade e diversidade de compostos presentes na matéria prima vegetal, com distintas características e bioatividades, se faz necessário a investigação de diferentes métodos para extração de proteínas e peptídeos, pois os solventes utilizados para extração variam e de acordo com suas propriedades e condições podem resultar em diferentes eficiências na extração das moléculas alvo (MAHATMANTO *et al.*, 2014).

O objetivo deste trabalho foi realizar a extração de proteínas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cv. BRSMG-Madrepérola a partir de diferentes métodos/solventes de extração e verificar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos proteicos.

2 Material e Métodos

A estratégia utilizada para obtenção dos extratos proteicos a partir de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e determinação das propriedades bioativas foram baseadas de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma de obtenção de proteínas com atividade antioxidante obtidas a partir de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* cv. BRSMG-Madrepérola).



Fonte: Dados da pesquisa.

2.1 Material vegetal e preparo das farinhas

Foram utilizados grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cv. BRSMG-Madrepérola submetidos a diferentes tratamentos: ETC – recém colhido; HTC - endurecido (4 meses à 40 °C e UR%: 70-75) e AUTO – feijão endurecido submetido ao processo de autoclavagem à 121 °C por 30 min. Os grãos de feijão descascados ETC, HTC e AUTO foram triturados em moinho de facas, peneirados em tamis de 35 mesh (0,425 mm), acondicionados em sacos de polietileno e armazenados sob refrigeração (4 °C) até o momento de sua utilização.

2.2 Métodos de extração e quantificação proteica

As extrações foram realizadas conforme descrito por MAHATMANTO *et al.* (2014) e OSEGUERA-TOLEDO *et al.* (2011).

Método 1: Diclorometano/Metanol (1:1): 1 g de farinha de feijão foi solubilizada em 5 mL do solvente e colocados sob

agitação, durante 1h à 25 °C. O extrato foi centrifugado a 4000 rpm durante 5 min e o sobrenadante coletado e submetido a evaporação do solvente.

Método 2: Acetonitrila/Água/Ácido fórmico (25:24:1): A mistura de 5 mL de solvente para cada 1 g de farinha foi agitada durante 1h à 25 °C. Em seguida o extrato foi centrifugado a 4000 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e foi realizada a retirada da acetonitrila.

Método 3: Acetato de sódio 20 mM pH 5,0: 1 g de amostra foi adicionado em 5 mL do solvente e agitados, durante 1 h a 4°C. O extrato foi centrifugado por 5 minutos a 4000 rpm a 4°C e o sobrenadante coletado.

Método 4: Bicarbonato de amônio 5mM, pH 8,0: 5 mL do solvente foram adicionados a 1 g de amostra e agitados durante 1 h à 25 °C. O extrato foi centrifugado a 4000 rpm durante 5min e o sobrenadante coletado.

Método 5: Extração alcalina (pH 8,0): 1 g de amostra foi adicionada em 5 mL de água e o pH da solução ajustado para

pH 8,0 (NaOH 0,2 M). A solução foi agitada durante 1 h à 25°C e em seguida centrifugada a 4000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado. O procedimento foi realizado durante 5 ciclos de extração.

O conteúdo de proteína foi determinado utilizando-se o kit Qubit® fluorometer, seguindo as instruções do fabricante. O resultado final da dosagem foi expresso em µg de proteína por mL.

2.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada por meio da redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes na amostra (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Uma alíquota de 50 µL de amostra foi misturada com 200 µL do radical DPPH (150 mM). A mistura reacional foi homogeneizada, deixada a temperatura ambiente por 15 min e analisada a 520 nm.

A atividade antioxidante pelo método de Redução do Ferro (FRAP) foi realizada de acordo com o método descrito por Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. Para o preparo do reagente FRAP, misturou-se 25 mL de tampão acetato de sódio 0,3 M (pH 3,6), 2,5 mL de uma solução 10 mM de TPTZ (2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina) preparada com

HCl 40 mM, e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Aliquotas de 50 µL de amostra foram misturadas com 150 µL de água e 1,3 mL do reagente FRAP recém-preparado. Esta mistura foi homogeneizada e mantida à 37°C. Após 30 minutos foi realizada a leitura a 595 nm. Os resultados para DPPH e FRAP foram expressos em concentração de Trolox equivalente (mM TE).

2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste Tukey, considerando o nível de significância de $p < 0,05$, para detectar diferenças significativas entre os tratamentos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata

3 Resultados e Discussão

Sabe-se que o feijão é uma importante fonte de proteínas. Para extração destas proteínas foram utilizados cinco diferentes métodos que levam em consideração fatores como o pH, temperatura e força iônica, uma vez que estes exercem influência direta na solubilidade das proteínas. O Quadro 1 apresenta o teor proteico (mg/mL) e a atividade antioxidante (mM TE/mg proteína) obtido a partir de diferentes métodos de extração para proteínas do feijão.

Quadro 1 – Teor proteico (mg/mL) e atividade antioxidante (mM TE/mg proteína) obtido a partir de diferentes métodos de extração para proteínas de feijão Madrepérola.

Método	Feijão	Proteína (mg/mL)	FRAP (mM TE/mg proteína)	DPPH (mM TE/mg proteína)
1	AUTO	0,46 ± 0,01 ^{cB}	14,70±0,92 ^{aB}	2,47±0,10 ^c
	HTC	0,47 ± 0,01 ^{bB}	16,39±0,51 ^{aA}	n.d
	ETC	0,82 ± 0,02 ^{cA}	4,20±0,17 ^{cC}	n.d
2	AUTO	0,97 ± 0,01 ^{bcA}	16,03±0,88 ^{aA}	8,88±0,16 ^a
	HTC	0,98 ± 0,01 ^{bA}	9,45±0,54 ^{bB}	n.d
	ETC	0,98 ± 0,01 ^{cA}	15,98±1,32 ^{bA}	n.d
3	AUTO	2,2 ± 0,1 ^{bcA}	5,81±0,08 ^{bC}	5,03±0,15 ^b
	HTC	0,8 ± 0,01 ^{bB}	14,98±0,95 ^{aB}	n.d
	ETC	0,76 ± 0,01 ^{cB}	21,67±0,55 ^{aA}	n.d
4	AUTO	3,1 ± 0,1 ^{bB}	3,67±0,34 ^{cB}	4,59±0,12 ^c
	HTC	0,9 ± 0,0 ^{bC}	9,84±0,41 ^{bA}	n.d
	ETC	11,4 ± 0,3 ^{cA}	1,17±0,35 ^{dC}	n.d
5	AUTO	19,5 ± 1,9 ^{aB}	0,89±0,14 ^{dA}	3,70±0,03 ^d
	HTC	21,3 ± 2,1 ^{aB}	0,31±0,00 ^{cB}	n.d
	ETC	28,9 ± 2,1 ^{cA}	0,31±0,00 ^{dB}	n.d

*Letras minúsculas iguais na mesma coluna representa que não há diferença significativa entre os diferentes tratamentos para o mesmo tipo de feijão. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna representa que não há diferença significativa entre os diferentes tipos de feijão para o mesmo método de extração. n.d – não detectado.

Fonte: Dados da pesquisa.

Amiação extração proteica foi verificada, independentemente do tratamento aplicado aos grãos de feijão, através da extração alcalina (Método 5), atingindo 28,9 mg/mL para o feijão ETC. Já a maior atividade antioxidante foi verificada no extrato obtido através da extração proteica com acetato de sódio 20 mM pH 5,0 (Método 3), com 21,6 mM TE/mg proteína para o feijão ETC, determinada pelo método de FRAP.

Para o feijão HTC os métodos de extração 1 (Diclorometano/

Metanol) e 3 (Acetato de sódio 20 mM pH 5,0) foram os que resultaram em mais componentes com atividade antioxidante. Já para o extrato proteico obtido a partir do feijão AUTO a extração com Acetonitrila/Água/Ácido fórmico (Método 2) resultou na maior atividade antioxidante determinada pelo método de FRAP, 16,03 mM TE/mg proteína.

O método 2, extração com acetonitrila/água/ácido fórmico, foi a extração que resultou em maior atividade antioxidante,

quando determinado pelo método de DPPH, 8,88 mM TE/mg proteína.

Sabe-se que os métodos para determinação da atividade antioxidante possuem diferentes estereoseletividade, onde aminoácidos e peptídeos encontrados na amostra são capazes de reagir e estabilizar diferentes radicais (ZHU *et al.*, 2008). Sabe-se também que os métodos apresentam diferentes reações estequiométricas que ocorrem entre os compostos antioxidantes encontrados na fonte proteica e os radicais DPPH e Fe³⁺, dependendo da natureza dos radicais e de sua solubilidade e difusividade no sistema (ZHU *et al.*, 2008; LEMES *et al.*, 2016).

As diferenças no teor de proteínas entre os ETC, HTC e AUTO são devidas a solubilidade de proteínas destes feijões. As diferenças podem ser explicadas em virtude da alteração estrutural das proteínas ao serem submetidas aos processos de endurecimento e autoclavagem (BATISTA *et al.*, 2010a; BATISTA *et al.*, 2010b). É sabido que o processo de endurecimento reduz a solubilidade de proteínas, provavelmente por formação de complexos destas moléculas com outras moléculas presentes no feijão (VALLE *et al.*, 1992; NJORGE *et al.*, 2015).

Por outro lado, as mudanças de temperatura, umidade e pressão utilizadas no processo de autoclavagem podem ter afetado as ligações covalentes e não covalentes da molécula, ocasionando em um novo rearranjo da estrutura, acarretando na exposição de diferentes resíduos de aminoácidos com diferentes graus de solubilidade (KESSEL, 2011).

Além disso, a polaridade de cada um dos solventes utilizados contribui para a extração proteica das amostras, além da polaridade dos resíduos de aminoácidos que constituem as proteínas, que interagem com mais facilidade com determinados solventes e, conseqüentemente, favorece com que essa seja extraída (MAHATMANTO *et al.*, 2014).

A diferença de atividade antioxidante verificada, comparando-se os diferentes métodos de extração, pode ser associada a diversos fatores, tais como o posicionamento dos aminoácidos que pode influenciar de forma efetiva a atividade antioxidante das proteínas e peptídeos (SARMADIA; ISMAILA, 2011), presença de cadeias proteicas contendo os aminoácidos aromáticos e polares tais como histidina e arginina que são capazes de potencializar a atividade antioxidante (LUNA-VITAL *et al.*, 2014).

Outros fatores que também interferem diretamente na extração de proteínas e, conseqüentemente, na atividade antioxidante podem estar relacionados à diferença observada na estrutura molecular dos solventes, seus grupos funcionais e tipo de aminoácidos da superfície da proteína (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2016; UNGCHAROENWIWAT; H-KITTIKUN, 2015), além das condições operacionais aplicadas ao isolamento dessas moléculas (HERNANDEZ-LEDESMA *et al.*, 2009; VERNAZA *et al.*, 2012).

É importante notar que a quantidade de proteína extraída parece não ser responsável pela atividade antioxidante, mas

sim o tipo de aminoácido obtido, que atua como doador de prótons para estabilizar os radicais livres (MAHATMANTO *et al.*, 2014).

4 Conclusão

Os resultados indicam a viabilidade de obtenção de antioxidantes de ocorrência natural a partir de substratos proteicos de baixo custo, o feijão, ou que seriam descartados por serem sujeitos aos fenômenos de endurecimento, como forma de agregação de valor. Os extratos proteicos obtidos a partir de diferentes métodos de extração apresentaram atividade antioxidante e, portanto, possuem potencial como antioxidantes naturais.

A maior extração proteica foi verificada através de extração alcalina (pH 8,0) para o feijão ETC, 28,9 mg/mL. Já a maior atividade antioxidante foi verificada no extrato obtido através da extração proteica com acetato de sódio 20 mM pH 5,0, com 21,6 mg/mL para o feijão ETC. Os resultados mostraram que a extração de proteínas/peptídeos de feijões AUTO, ETC e HTC são bastante diferentes dependendo do solvente usado, em relação ao teor proteico e atividade antioxidante devido, principalmente, a polaridade e interação solvente/proteína.

Agradecimentos

A CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior, FAPEG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás e CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Referências

- BATISTA, K. A., PRUDÊNCIO, S. H., FERNANDES, K. F. Changes in the biochemical and functional properties of the extruded hard-to-cook cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Int. J. Food Sci.*, v. 45, 794-799, 2010a.
- BATISTA, K.A.; PRUDÊNCIO, S.H., FERNANDES, K.F. Changes in the functional properties and antinutritional factors of extruded hard-to-cook common beans. *J. Food Sci.*, v.75, p.286-290, 2010b.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.*, v.239, p.70-76, 1996.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, v.28, p.25-30, 1995.
- HERNANDEZ-LEDESMA, B.; HSIEH, C.C.; LUMEN, B.O. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.390, n.3, p.803-808, 2009.
- KESSEL, A.; BEM-TAL, N. Introduction to proteins. Structure, function, and motion. London: CRC, 2011.
- LEMES, A.C. *et al.* A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *Int. J. Mol. Sci.*, v.17, n.950, p.1-24, 2016.
- LUNA-VITAL, D.A. *et al.* Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): a review. *Food Res. Int.*, v.10, p.1010-1016, 2014.

- MAHATMANTO, T. *et al.* A comparative study of extraction methods reveals preferred solvents for cysteine knot peptide isolation from *Momordica cochinchinensis* seeds. *Fitoterapia*, v.95, p.22-33, 2014.
- NJOROGE, D.M. *et al.* Effect of storage conditions on pectic polysaccharides in common beans (*Phaseolus vulgaris*) in relation to the hard-to-cook defect. *Food Res. Int.*, v.76, 105-113, 2015.
- OSEGUERA-TOLEDO, M.E. *et al.* Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- κ B pathways. *Food Chem.*, v.127, p.1175-1185, 2011.
- RAMAKRISHNAN, V. *et al.* Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, v.6, p.19-27, 2016.
- SARMADIA, B.H.; ISMAILA, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, v.31, p.1949-1956, 2010.
- SIQUEIRA, B.S. *et al.* Analyses of technological and biochemical parameters related to the HTC phenomenon in carioca bean genotypes by the use of PCA. *LWT-Food Sci. Technol.*, v.65, p.939-945, 2016.
- UNGCHAROENWIWAT, P.; H-KITTIKUN, A. Purification and characterization of lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 isolated from wastewater from a canned fish factory and its application for the synthesis of wax esters. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, v.11, p.96-104, 2015.
- VALLE, J.M. *et al.* Hard-To-Cook defect in black beans: the contribution of proteins to salt soaking effects. *Food Res. Int.*, v.25, p.429-436, 1992.
- VERNAZA, M.G. *et al.* Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chem.*, v.134, n.4, p.2217-2225, 2012.
- ZHU, Y. P. *et al.* Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. *Food Control.*, v.19, p.654-661, 2008.