

## Proteínas com Propriedades Bioativas Extraídas de Feijão-Lima (*Phaseolus lunatus L.*)

### Bioactive Properties of Proteins Extracted from Lima Bean (*Phaseolus lunatus L.*)

Renata Borges Araújo<sup>a</sup>; Karla de Aleluia Batista<sup>b\*</sup>; Ailton Cesar Lemes<sup>c</sup>; Kátia Flávia Fernandes<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas. GO, Brasil.

<sup>b</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas. GO, Brasil.

<sup>c</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano. GO, Brasil.

<sup>d</sup>Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Química de Polímeros GO, Brasil.

\*E-mail: karla-batista@hotmail.com.

---

#### Resumo

O feijão-lima é uma leguminosa anual que apresenta grãos comestíveis ricos em proteínas, carboidratos, minerais e fibras. Por proporcionar nutrientes essenciais, este alimento é utilizado como alternativa em substituição de carnes e outros produtos proteicos pela população de baixa renda. Diversos estudos comprovam que a espécie é bastante promissora, pois apresenta proteínas com propriedades bioativas. O objetivo do trabalho foi avaliar a extração proteica e bioatividade de proteínas oriundas de feijão-lima acometidos pelo processo de endurecimento. Para a extração proteica foram utilizados quatro diferentes métodos: (1) acetonitrila/água/ácido fórmico, (2) acetato de sódio, (3) bicarbonato de amônio e (4) solução aquosa com pH 8.0. Após a extração proteica, as amostras foram quantificadas e, posteriormente, determinadas as atividades antioxidante e quelantes de ferro e cobre. Os resultados mostraram que a solução aquosa com pH 8.0 foi o melhor extrator de proteínas (133,0 mg/g de farinha). No entanto, o método utilizando bicarbonato de amônio (3) foi o que apresentou os maiores valores de atividade antioxidante e maior atividade quelante, tanto para o ferro (53 %) quanto para o cobre (36 %). Isto é relacionado aos solventes utilizados na extração, uma vez que suas diferentes propriedades podem resultar em diferentes eficiências na extração das moléculas alvo. O fenômeno de endurecimento (HTC) parece não ter afetado de maneira definitiva a bioatividade das proteínas extraídas, sugerindo que é possível o uso desses componentes como uma alternativa para o uso dos grãos afetados por este processo.

**Palavras-chave:** Feijão Endurecido. Atividade Quelante. Antioxidante. Bioatividade.

#### Abstract

*Lima bean is an annual legume that features edible grains rich in proteins, carbohydrates, minerals and fibers. Due to its essential nutrients, this food is used as an alternative to replace meats and other protein products by the low income population. Several studies prove that the species is promising, because it presents proteins with bioactive properties. The aim of this work was to evaluate the bioactivity of proteins extracted from lima-bean affected by the hardening process. For the extraction of the bioactive compounds, four different methods were used: (1) acetonitrile / water / formic acid, (2) sodium acetate, (3) ammonium bicarbonate and (4) aqueous solution with pH 8.0. After protein extraction, the samples were quantified and, subsequently, determined the antioxidant and chelating activities of iron and copper. The results showed that the aqueous solution at pH 8.0 was the best protein extractor (133.0 mg / g flour). However, the method using ammonium bicarbonate (3) presented the highest values of antioxidant activity and higher chelating activity for iron (53%) and copper (36%). This is related to the solvents used in the extraction, since their different properties can result in different efficiencies in the extraction of the target molecules. The "Hard-to-cook" phenomenon did not seem to affect definitively the bioactivity of the proteins, suggesting that it is possible to use these components as an alternative for the use of the grains affected by the hardening process.*

**Keywords:** Hardened Beans. Chelating Activity. Antioxidant. Bioactivity.

---

#### 1 Introdução

As leguminosas apresentam grande diversidade de compostos com propriedades bioativas, tais como os flavonoides, antocianinas, proantocianidinas e isoflavonas, bem como alguns ácidos fenólicos (CHOUNG et al., 2003). Embora os mecanismos de ação de cada um dos componentes das leguminosas não esteja ainda completamente elucidado, é provável que as ações sinérgicas dos compostos bioativos resultem em propriedades funcionais (RAMÍREZ-CÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2013). Adicionalmente, diversos relatos têm demonstrado os efeitos protetores das leguminosas no aparecimento de vários tipos de câncer ao nível do trato gastrointestinal, carcinoma mamário, câncer da

próstata, entre outros (THOMPSON et al., 2003; LEMES et al., 2016; GARCIA et al., 2013).

Além disso, diversas outras bioatividades tem sido apontadas em diferentes espécies de feijão relacionadas à presença de proteínas e peptídeos. 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 (LEMES et al., 2016). Estas biomoléculas podem se ligar com metais e funcionarem como agentes quelantes, devido à interação do grupo doador de elétrons situado na superfície do peptídeo com o íon. Outros apresentam ação antioxidante, pois

auxiliam na manutenção do equilíbrio redox da célula. Estes compostos antioxidantes capturam radicais livres e atuam na neutralização ou eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e na ligação de íons metálicos a outros compostos, impossibilitando a produção de espécies oxidantes (GUO et al., 2013; SILVA, 2013; CARRASCO-CASTILLA et al., 2012; ROY, BOYE; SIMPSON, 2013).

O feijão-lima, assim como os demais do gênero *Phaseolus*, apresentam proteínas e peptídeos biologicamente ativos em sua composição. No entanto durante o armazenamento, os grãos podem desenvolver um processo pós-colheita conhecido como endurecimento (*hard-to-cook*). Esse fenômeno é acelerado quando ocorre a exposição dos grãos a temperaturas acima de 30 °C e umidade relativa acima de 60%. O fenômeno “*hard-to-cook*” provoca interações moleculares no interior dos grãos e esses não amolecem facilmente quando são submetidos a imersão em água. Desta forma o tempo de cocção dos grãos aumenta e ocorrem alterações no seu sabor e textura (SEGURA-CAMPOS et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2013). Apesar das modificações que ocorrem no feijão devido ao processo de endurecimento, diversas outras aplicações podem ser sugeridas para o seu aproveitamento.

Embora o consumo mais frequente de feijão-lima seja dos grãos inteiros cozidos, recentemente outras formas de uso culinário tem sido exploradas, sobretudo com o objetivo de viabilizar o uso integral de grãos endurecidos. Os grãos endurecidos convertidos em farinha, por exemplo, podem ser introduzidos na dieta de populações de diferentes grupos etários, enriquecendo produtos alimentícios, como massas, pães, biscoitos, além de sua possível utilização em alimentos já disponíveis no mercado, para elevar a qualidade da alimentação e nutrição da população (SIMPLÍCIO, 2013; MOREIRA et al., 2009; FROTA et al., 2010; BATISTA, 2014). O aproveitamento e uso do feijão endurecido nas mais diversas formas, sobretudo no aproveitamento de compostos de interesse, pode resultar na diminuição da produção de milhares de toneladas de resíduos provocada pelo descarte deste feijão.

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).

De acordo com o exposto e, considerando a necessidade de estudos relacionados ao aproveitamento de grãos de feijão-lima acometidos pelo processo de endurecimento, este trabalho tem como objetivo avaliar a extração proteica por diferentes métodos de extração e verificar a presença de proteínas com atividade antioxidante e quelante de ferro e cobre.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Material vegetal e produção das farinhas

As sementes de feijão-lima (*Phaseolus lunatus* L.) foram fornecidas pela EMBRAPA Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil). Após a remoção das impurezas, os grãos foram armazenados a 4 °C para realização dos experimentos e análises futuras. O endurecimento foi realizado pela incubação dos grãos a 40 °C  $\pm$  2 °C e umidade relativa de 75% por 120 dias (RIBEIRO; PRUDENCIO-RIBEIRO; MIYAGUI, 2005). A casca foi removida manualmente e os grãos inteiros foram moídos para produzir farinha com tamanho de partícula equivalente a 32 mesh. A farinha de feijão foi armazenada a -20 °C até utilização.

### 2.2 Extração e quantificação proteica

As extrações proteicas foram conduzidas segundo a metodologia descrita por Mahatmanto et al. (2014) para os métodos 1, 2 e 3 e Oseguera-Toledo et al. (2011), para o método 4. No método 1 a extração foi feita com uso de acetonitrila (ACN), água e ácido fórmico (AF) na proporção de 25:24:1, utilizando-se 5 mL de solvente para cada 1 g de farinha. A amostra foi submetida a agitação por 1 h a temperatura ambiente e centrifugada por 15 min. Após a extração, o solvente foi evaporado e o pellet ressuscitado em 2,5 mL de tampão acetato de sódio 0,3 mol L<sup>-1</sup> pH 3,4 e utilizado nos testes posteriores. No método 2 a extração foi feita com acetato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 5,0 utilizando-se 5 mL de solvente para cada 1 g de farinha. A amostra foi submetida a agitação por 1 h à temperatura de 4°C e centrifugada por 15 min. Após a extração, foi adicionado 5 mL de acetona ao sobrenadante da amostra e esta foi novamente submetida a agitação por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi armazenado para os testes posteriores. No método 3 a extração foi feita com bicarbonato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,0, utilizando-se 5 mL de solvente para cada 1 g de farinha. A amostra foi submetida a agitação a temperatura ambiente por 1 h e centrifugada por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e utilizado nos testes posteriores. No método 4 a extração foi feita com água destilada com pH 8,0. O ajuste do pH foi feito pela adição de NaOH na concentração de 100 mmol L<sup>-1</sup>. A amostra foi submetida a agitação a temperatura ambiente por 1 h e centrifugada por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e armazenado sob refrigeração. O precipitado foi utilizado em uma nova extração conforme metodologia citada anteriormente. Os sobrenadantes foram homogeneizados e utilizados nos testes posteriores. O teor de proteína foi determinado usando o kit Qubit® Protein Assay (ThermoFisher Scientific, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

### 2.3. Determinação da atividade antioxidante por DPPH e FRAP.

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com metodologia descrita por Nazeer *et al.* (2012) utilizando DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) como agente redutor de radicais livres. No preparo do DPPH foram usados 1,5 mg de DPPH em um volume de 25 mL de metanol 80% (v/v). Para o ensaio foram utilizados 800 µL de DPPH (0,15 mmol L<sup>-1</sup>) e 200 µL de extrato contendo 50 µg de proteína. O ensaio permaneceu em repouso a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida a leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm. A atividade foi determinada através da curva de calibração utilizando Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) como agente antioxidante padrão. Os resultados foram expressos em µmol de trolox por mg de proteína. A atividade antioxidante por FRAP utilizando TPTZ (2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina) na presença de ferro III como agente redutor, foi determinada de acordo com metodologia descrita por Rufino *et al.* (2006). No preparo do reativo de FRAP utilizou-se 25 mL de tampão acetato de sódio 0,3 mol L<sup>-1</sup> pH 3,4, 2,5 mL de solução de TPTZ (10 mmol mL<sup>-1</sup>) e 2,5 mL de FeCl<sub>3</sub> (20 mmol L<sup>-1</sup>). Para o ensaio foram utilizados 50 µL de extrato contendo 50 µg de proteína, 150 µL de H<sub>2</sub>O destilada e 1,3 mL de reativo de FRAP. Os ensaios foram incubados a 37 °C por 30 min e posteriormente realizada a leitura em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 592 nm. A atividade foi determinada através da curva de calibração usando Trolox como agente antioxidante padrão e os resultados expressos em µmol de trolox por mg de proteína.

### 2.4 Determinação da atividade quelante de ferro e cobre

A atividade quelante de ferro e de cobre foi determinada através da metodologia descrita por Carrasco-Castilla *et al.* (2012). Tanto para a atividade quelante de ferro como para a de cobre o EDTA foi utilizado como agente quelante padrão. Para a atividade quelante de ferro foi utilizado 540 µL de tampão acetato 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 4,8, 150 µL de extrato contendo 50 µg de proteína, 180 µL de solução de FeCl<sub>2</sub> (contendo 1,12 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>) e, depois de 30 min de repouso, adicionou-se 30 µL de ferrozina 40 mmol L<sup>-1</sup>. Após mais 10 min de reação a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda a 560 nm. No ensaio de quelante de cobre foi utilizado 200 µL de tampão fosfato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,0, contendo 10 µg de cobre e 50 µL de extrato contendo 50 µg de proteína. O ensaio foi deixado em repouso por 10 min. Em seguida foi adicionado 5 µL de pirocatecol violeta 4 mmol L<sup>-1</sup> e a leitura foi realizada em um leitor de placas em um comprimento de onda equivalente a 632 nm. A atividade quelante de ferro e cobre foi expressa em porcentagem, calculada de acordo com a Equação 1.

$$\text{Atividade quelante (\%)} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

### 2.5 Eletroforese

Os extratos proteicos obtidos a partir dos diferentes métodos de extração foram analisados por eletroforese. A eletroforese foi realizada através do método descrito por Laemmli, (1970) em gel de poliacrilamida (5% concentração, 15% separação) contendo SDS (Dodecil sulfato de sódio). As amostras foram misturadas com tampão contendo β-mercaptoetanol, aquecidas a 95°C por 5 min e aplicadas ao gel. A eletroforese foi realizada durante 180 minutos, 35 mA e o gel revelado utilizando nitrato de prata. Um marcador molecular (BenchMark™ Protein Ladder 10747012) com massa molar variando de 10 a 220 kDa também foi aplicado ao gel.

### 2.6 Análise estatística

As análises de atividade antioxidante por DPPH e FRAP e quelante de ferro e cobre *in vitro* foram feitas em triplicata e os resultados expressos como média e desvio padrão. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para comparação entre as médias. Os dados foram analisados no programa *Statistica* 10.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, Ok, USA), com nível de significância de 95 %.

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Extração e quantificação proteica

Sabe-se que o feijão-lima é uma importante fonte de proteínas. Para extração destas proteínas foram utilizados quatro 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 (AZEVEDO; FRANCO; ARAÚJO 2003, AMIT KESSEL; NIR BEM-TAL, 2011, p.3487). O Quadro 1 apresenta os teores de proteína obtidos nos diferentes métodos de extração analisados. Os resultados mostraram que a extração de proteínas de feijão-lima é bastante diferente dependendo do solvente usado, em relação ao teor proteico e atividade antioxidante e quelante.

**Quadro 1** - Quantificação de proteínas utilizando diferentes métodos de extração.

Métodos	(mg proteína g <sup>-1</sup> de farinha)
1 - Acetonitrila/água/ácido fórmico	12,0 <sup>d</sup> ± 0,04
2 - Acetato de sódio	56,0 <sup>b</sup> ± 0,01
3 - Bicarbonato de amônio	17,0 <sup>c</sup> ± 0,03
4 - Solubilização alcalina	133,0 <sup>a</sup> ± 0,02

Resultados expressos como médias de três determinações ± desvio padrão. Letras iguais indicam que não existem diferenças significativas no nível de 5%.

Fonte: Dados da Pesquisa.

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).

O método mais eficaz para a extração proteica foi o Método 4, solubilização alcalina, alcançando 133,0 mg de proteína por grama de farinha. Na sequência aparece o Método 2, com 56,0 mg de proteína por g de farinha e o Método 3 com 17,0 mg de proteína por g de farinha. O Método 1, que utiliza acetonitrila/água/ácido fórmico, foi o que apresentou o menor teor de extração proteica, apenas 12,0 mg de proteína por g de farinha.

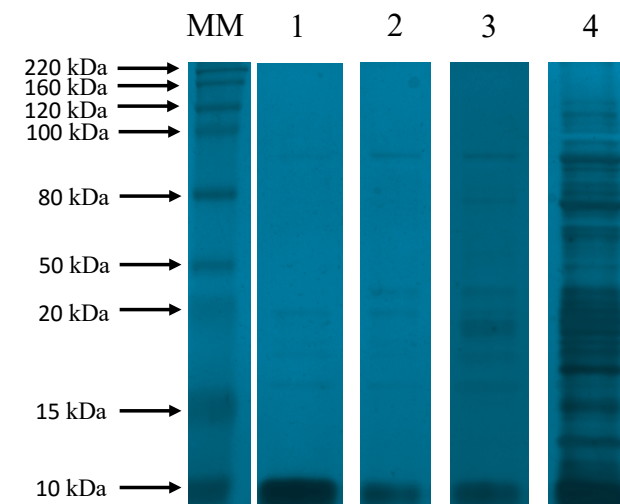
No Método 1 a adição da acetonitrila em um meio aquoso diminui a constante dielétrica do meio. Esse fator somado ao uso do ácido fórmico que altera o pH do meio, pode provocar a desnaturação e precipitação de proteínas de maior massa molecular presentes. Por outro lado, a acidez pode alterar a dinâmica do sistema, favorecendo interações entre as cargas de alguns aminoácidos com o meio. Neste caso ocorre um aumento da solubilidade de proteínas carregadas em sua superfície (RENDINA, 1971; AMIT KESSEL; NIR BEM-TAL, 2011).

Nos Métodos 2 e 3 foram utilizados os sais acetato de sódio em pH 5,0 e bicarbonato de amônio em pH 8,0. Estes sais ao serem dissociados provocam alterações na força iônica do meio. Em condições de elevada força iônica, as moléculas de água apresentam maior tendência de solvatação de partículas iônicas. As moléculas de água, desse modo, interagem mais com íons, desfazendo suas interações com a estrutura proteica. Como consequência, ocorre maior interação proteína-proteína, resultando na diminuição de solubilidade em meio aquoso (AMIT KESSEL; NIR BEM-TAL, 2011; RENDINA, 1971).

No Método 4, baseado na solubilização das proteínas por alcalinização do meio em pH 8,0, pode ocorrer a presença de hidroxilas disponíveis no meio que promovem a desprotonação das cadeias laterais de aminoácidos contendo hidrogênios ionizáveis, de forma que o ponto isoelétrico é alcançado para diferentes grupos de proteínas, promovendo a sua precipitação. Assim, o método permite a solubilização de proteínas com ponto isoelétrico abaixo de 8,0. Segundo Oseguera-Toledo et al. (2011) este método é utilizado para a extração de proteínas totais, tais como as globulinas, albuminas e gluteínas, o que explica o maior teor de proteína obtida se comparado aos demais métodos utilizados.

As análises em SDS-PAGE (Figura 1) mostraram que os extratos proteicos de feijão-lima obtidos a partir dos diferentes métodos de extração apresentaram bandas que variaram de 10 a 220 kDa.

**Figura 1** – Eletroforese dos extratos obtidos a partir dos diferentes métodos de extração proteica de feijão-lima (*Phaseolus lunatus* L.). Marcador de massa molecular (MM); (1) acetonitrila/água/ácido fórmico, (2) acetato de sódio, (3) bicarbonato de amônio e (4) solução aquosa com pH 8.0.



Fonte: Os autores.

Comparando-se os padrões das bandas, pode-se observar que a amostra obtida a partir do Método 3, utilizando bicarbonato de amônio, apresentou maior número de bandas. É, também, claramente evidenciado, que as amostras obtidas a partir deste tampão, além de um maior número de bandas, as bandas estão mais intensas que nas demais amostras, comprovando uma maior eficiência deste tampão quanto à capacidade de extração proteica. Já as amostras obtidas a partir dos demais métodos de extração, apresentaram menor número de bandas e intensidade, o que vai de acordo com os dados de extração, onde foi verificado menor teor proteico nestas amostras.

### 3.2 Atividade antioxidante determinada por DPPH e FRAP

A verificação do método mais eficiente para extração de proteínas com propriedades bioativas, em especial atividade antioxidante, foi realizada sobre as proteínas obtidas nos 4 diferentes métodos e verificadas por DPPH e FRAP (Quadro 2). **Quadro 2** - Atividade Antioxidante medida pelo método de DPPH e FRAP.

Métodos de extração	DPPH ( $\mu\text{mol}$ de trolox $\text{mg}^{-1}$ de proteína)	FRAP ( $\mu\text{mol}$ de trolox $\text{mg}^{-1}$ de proteína)
1 - Acetonitrila/água/ácido fórmico	118 <sup>b</sup> ± 14	1936 <sup>b</sup> ± 86
2 - Acetato de sódio	n.d.	n.d.
3 - Bicarbonato de amônio	422 <sup>a</sup> ± 35	5089 <sup>a</sup> ± 357
4 - Solubilização alcalina	n.d.	n.d.

Resultados expressos como médias de três determinações ± desvio padrão. Letras iguais indicam que não existem diferenças significativas no nível de 5%. Foram usados 50  $\mu\text{g}$  de proteína para todos os métodos de extração. N.d = não determinado.

Fonte: Dados da Pesquisa.

Os resultados demonstraram que as proteínas obtidas a partir da aplicação do Método 3, verificadas tanto por DPPH (422  $\mu\text{mol}$  de trolox  $\text{mg}^{-1}$  de proteína) quanto por FRAP (5089  $\mu\text{mol}$  de trolox  $\text{mg}^{-1}$  de proteína), apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante. Os métodos 2 e 4, apesar da extração de altos teores de proteínas (56,0 e 133,0  $\text{mg/g}$  de farinha), não apresentaram atividade antioxidante pelos métodos avaliados.

A diferença de atividade antioxidante verificada, comparando-se os diferentes métodos de extração, pode ser associada a diversos fatores. Sarmadía e Ismaila (2011), afirmam que o posicionamento dos aminoácidos pode influenciar de forma efetiva a atividade antioxidante das proteínas e peptídeos. Já Luna-Vital et al. (2014) descrevem que cadeias proteicas contendo os aminoácidos aromáticos e polares tais como histidina e arginina são capazes de potencializar a atividade antioxidante.

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).

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). Outro fator importante para a atividade antioxidante está relacionado às condições operacionais aplicadas ao isolamento dessas moléculas e também à estrutura dos peptídeos obtidos (HERNANDEZ-LEDESMA; HSIEH; LUMEN, 2009; VERNAZA et al., 2012).

### 3.3 Atividade quelante de ferro e de cobre

Os resultados no Quadro 3 apresentam a atividade quelante de ferro e de cobre presente nas amostras obtidas a partir dos diferentes métodos de extração proteica utilizados. O Método 3, utilizando bicarbonato de amônio, apresentou a maior atividade quelante de ferro (53,0%) e de cobre (36,0%), enquanto o Método 4, com solubilização alcalina, apresentou a menor atividade, 13,0% e 10,0%, respectivamente. Para haver atividade quelante deve ser considerada a composição de aminoácidos presentes nas proteínas extraídas. Estes aminoácidos devem possuir afinidade pelos íons de ferro e cobre. A histidina, ácido glutâmico e aspártico, cisteína e triptofano, são aminoácidos capazes de apresentar a atividade quelante, uma vez que as cadeias laterais destes aminoácidos apresentam afinidade pelos íons metálicos presentes no meio (UEDA; GOUT; MORGATI, 2003). Desta forma, pode-se inferir que o material proteico obtido a partir dos Métodos 3 e 1 apresentam maior quantidade de resíduos de histidina, cisteína, triptofano e ácidos glutâmico e aspártico superficiais, quando comparados aos Métodos 2 e 4.

**Quadro 3** - Atividade quelante de ferro e cobre das proteínas obtidas nos diferentes métodos de extração proteica.

Métodos	Ferro (%)	Cobre (%)
1 - Acetonitrila/água/ácido fórmico	47,0 <sup>b</sup> ± 0,7	26,0 <sup>b</sup> ± 0,1
2 - Acetato de sódio	4,0 <sup>c</sup> ± 0,7	2,0 <sup>c</sup> ± 0,7
3 - Bicarbonato de amônio	53,0 <sup>a</sup> ± 2,2	36,0 <sup>a</sup> ± 2,2
4 - Solubilização alcalina	3,0 <sup>d</sup> ± 2,2	n.d.

Resultados expressos como médias de três determinações  $\pm$  desvio padrão. ( $p > 0,05$ ). Foram usados 50  $\mu\text{g}$  de proteína para todos os métodos de extração. n.d. = Não determinado.

Fonte: Dados da Pesquisa.

Ao quelar íons metálicos as biomoléculas diminuem o efeito oxidativo que estes metais provocam no organismo. Além disso, o potencial quelante das proteínas e peptídeos de feijão-lima pode proporcionar um aumento na absorção destes metais no organismo e, conseqüentemente, diminuir possíveis doenças causadas pela falta deste elemento (CARRASCO-CASTILHO et al., 2012).

Carrasco-Castilho et al. (2012) testaram a atividade quelante de ferro e cobre para peptídeos obtidos por hidrólise de proteínas totais de feijão comum, fracionadas em membrana de 1 kDa. Foi verificada atividade quelante de ferro de 22,9% para a fração hidrolisada total; 16,04% para frações maiores que 1 kDa e 35,83% para as frações menores que 1 kDa. Já nos ensaios de atividade quelante de cobre foi verificado 50 % para a fração hidrolisada total; 49 % para frações maiores que 1 kDa e 79 % para as frações menores que 1 kDa.

Durak et al. (2013) trabalhando com feijão Adzuki, obtiveram o equivalente a 17% de atividade quelante de ferro e 36 % de atividade quelante de cobre, em peptídeos obtidos por hidrólise enzimática. Zhang et al. (2011) encontraram em extratos hidrolisados de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) 63,08 % de atividade quelante de ferro.

Ao comparar os resultados de feijão-lima obtidos nos métodos 1 e 3 pode se observar que os valores de atividade quelante de ferro foram superiores, exceto comparados ao estudo de Zhang et al. (2011). No entanto para a atividade quelante de cobre os resultados obtidos foram menores que os apresentados pelos demais autores.

A verificação de propriedades bioativas, antioxidante e quelante, a partir de proteínas extraídas de feijão-lima acometidos pelo processo de endurecimento abre diversas possibilidades para aproveitamento integral do grão e aplicação potencial desses compostos estudados.

### 4 Conclusão

A partir deste estudo foi possível extrair proteínas de ocorrência natural provenientes de feijão endurecido da espécie *Phaseolus lunatus* com atividade antioxidante e quelante. O método mais eficaz para a extração proteica foi o Método 4, solubilização alcalina, alcançando 133,0  $\text{mg}$  de proteína por grama de farinha. O método utilizando bicarbonato de amônio foi o que apresentou os maiores valores de atividade antioxidante

e maior atividade quelante, tanto para o ferro (53 %) quanto para o cobre (36 %). Isto é relacionado aos solventes utilizados na extração, uma vez que suas diferentes propriedades podem resultar em diferentes eficiências na extração das moléculas alvo. O fenômeno de endurecimento parece não ter afetado de maneira definitiva a bioatividade das proteínas extraídas, sugerindo que é possível o uso desses componentes como uma alternativa para o uso dos grãos afetados por este processo.

## Referências

AMIT KESSEL; NIR BEN -Tal. Introduction to Proteins Structure, Function, and Motion. London, v.13, p.3487, 2011.

AZEVEDO, J.N.; FRANCO, L.J.D.; ARAÚJO, R.O.C. Composição química de sete variedades de feijão-fava. Comunicado Técnico 4p Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2003.

BATISTA, K. A. Aplicações biotecnológicas de feijões endurecidos. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2014.

CARRASCO-CASTILLA, J. et al. Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. *Food Chem.*, v.131, p.1157-1164, 2012.

CHOUNG, M. G.; CHOI, B. R.; A, Y. N.; CHU, Y. H.; CHO, Y. S. Anthocyanin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, n.24, p.7040-7043, 2003.

DURAK, A.; BARANIAK, B.; JAKUBCZYK, A. A., WIECA, M. S. Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food Chemistry*, v.141, p.2177-2183, 2013.

FROTA, K.M.G. et al. Utilização da farinha de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) na elaboração de produtos de panificação. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.30, n.1, p.44-50, 2010.

GARCIA, M.C. et al. Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, v.103, p.328-349, 2013.

GUO, L. et al. Food protein derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. *Trends in Food Sci. Technol.*, v.37, p.92-100, 2014.

HERNANDEZ-LEDESMA, B.; HSIEH, C.C.; LUMEN, B.O. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Bio. Biophys Res Commun*, v.390, n.3, p.803-8, 2009.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.5, p.680-685, 1970.

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, 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 cystine knot peptide isolation from *Momordica cochinchinensis* seeds. *Fitoterapia*, v.95, p. 22-33, 2014.

MOREIRA, A.R.S.R. et al. Utilização de biscoito à base de farinha de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) em pré-escolares com anemia ferropriva. In: II CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI. 2009, Teresina. *Anais*, Teresina: Embrapa, 2009.

NAZEER, R.A.; KUMAR, N.S.S.; JAI, G.R. In vitro and in vivo studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. *Peptides*, v.35, p. 261-268, 2012.

OSEGUERA-TOLEDO, M. E. et al. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- $\kappa$ B pathways. *Food Chem.*, v.127, n.3, 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. Agricul. Biotechnol.*, v.6, p.19-27, 2016.

RAMÍREZ-CÁRDENAS, I.; LEONEL, A.J.; COSTA, N.M.B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.28, n.1, p.200-213, 2008.

RENDINA, G. Experimental methods in modern biochemistry. Philadelphia: Saunders Golden, 1971.

RIBEIRO, H.J.S.S.; PRUDENCIO-RIBEIRO, S.H.; MIYAGUI, D.T. Propriedades físicas e químicas de feijão comum preto, cultivar Iapar 44, após envelhecimento acelerado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.25, p.165-169, 2005.

ROY, F.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Res. Int.*, v.43, p.432-442, 2013.

RUFINO, M.S.M. et al. Metodologia científica: determinação de atividade total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Comunicado Técnico-Embrapa Ceará, 2006.

SARMADIA, B.H.; ISMAILA, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, v.31, p.1949-1956, 2010.

SEGURA-CAMPOS, M.R. et al. In vitro bioactivity, nutritional and sensory properties of semolina pasta added with hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysate. *J. Functional Foods*, v.8, p.1-8, 2014.

SILVA, M.E.C. Avaliação do potencial quelante de ferro de hidrolisados proteicos de soro de leite obtidos com diferentes enzimas. Campinas: Unicamp, 2013.

SIMPLÍCIO, A.P.M. Desenvolvimento de pão integral enriquecido com farinha de cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Teresinha: UFPI, 2013.

SIQUEIRA, B.S. et al. Hardness of carioca beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by cooking methods. *LWT. Food Sci. Technol.*, v.54, p.13-17, 2013.

THOMPSON, M.D. et al. Mechanisms associated with dose-dependent inhibition of rat mammary carcinogenesis by dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Nutr.*, v.138, n.11, p.2091-2097, 2008.

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

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. Catalysis B: Enzymatic*, v.11, p.96-104, 2015.

VERNAZA, M.G. et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chem*, v.134, n.4, p.2217-2225, 2012.

ZHANG, J. et al. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide. *Euro. Food Res. Technol.*, v.229, p.1-4, 2011.