

MELHORAMENTO DE PROTEÍNA DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*) USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO

Palavras-Chave: EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA, COMPOSTOS VOLÁTEIS, PROTEÍNA VEGETAL

Autores(as):

YASMINE FERRAREZ SAOUDA, FEA – UNICAMP

ISABELA FERREIRA MORENO, FEA – UNICAMP

LUCIEDRY MATHEUS SOUZA CARVALHO, FEA – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). JULIAN MARTÍNEZ (orientador), FEA – UNICAMP

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve uma crescente demanda por alimentos constituídos apenas com ingredientes de origem vegetal (*plant based*), visando principalmente à saudabilidade do consumidor, à sustentabilidade e ao bem-estar animal (Liu, Pei e Heinonen, 2022). A formulação desses produtos é muitas vezes desafiadora pelo fato de muitas proteínas vegetais não apresentarem as mesmas propriedades tecnológicas que as proteínas de origem animal, indicando que mais estudos devem ser realizados para explorá-las, incluindo as matérias primas presentes na biodiversidade brasileira, tal como a proteína de feijão (Oliveira, Casell e Pinheiro, 2023).

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é uma leguminosa culturalmente consumida pelos brasileiros, representando a principal proteína acessível para população de baixa renda, devido ao seu baixo custo quando comparada à proteína de origem animal, destacando-se também sua importância socioeconômica. Além disso, o feijão apresenta uma excelente composição nutricional, sendo fonte de proteínas, fibras, vitaminas (principalmente as do complexo B) e minerais, como ferro, cálcio e zinco (Kusumah, Andoyo e Rialita, 2020).

Uma característica negativa apresentada pela proteína de feijão, que também aparece em outras proteínas vegetais, como a soja, é a presença de *off flavor*, causado por compostos voláteis de aroma desagradável, como cetonas e aldeídos (WANG *et al.*, 2021). Para que estas proteínas tenham melhor performance em produtos *plant based* pode-se aplicar processos de SFE (*Supercritical Fluid Extraction* - Extração com Fluidos Supercríticos) com CO₂ supercrítico para remover os compostos responsáveis pelo *off flavor*, uma vez que tais substâncias (CO₂, cetonas e aldeídos) apresentam afinidade química por serem apolares, o que indica tal potencial. Além disso, o CO₂ apresenta uma série de vantagens como ser atóxico, não inflamável, não deixar resíduos no extrato, ser reciclável e reconhecido como seguro (GRAS – *Generally Recognised As Safe* – Geralmente Reconhecido como Seguro) para o processamento de alimentos (ROH *et al.*, 2006).

Dentre as possíveis propriedades tecnológicas de proteínas vegetais para aplicação em produtos *plant based*, com o objetivo de atender aos atributos sensoriais de aparência, aroma e textura, têm-se a solubilidade, capacidade de formação de espuma e de emulsificação. Estas propriedades podem ser melhoradas nas proteínas com auxílio de tratamentos como o SFT (*Supercritical Fluid Treatment* – Tratamento com Fluido Supercrítico) com CO₂ supercrítico. O CO₂ apresenta baixa temperatura crítica (31°C) e pressão crítica moderada (7,4 MPa), o que permite modificar proteínas com o aumento da pressão, sem degradação térmica, de modo prático e econômico (Li *et al.*, 2021).

Logo, tendo em vista o potencial do CO₂ supercrítico, o objetivo do presente trabalho foi utilizá-lo para remover compostos voláteis responsáveis pelo *off-flavor* na proteína de feijão com o uso da SFE e por SFT em melhorar suas propriedades tecnológicas (solubilidade, capacidade de formação de emulsão e espuma) desta proteína para sua possível aplicação em alimentos *plant-based*. Nos dois métodos os efeitos de temperatura e pressão foram avaliados.

METODOLOGIA

Remoção de compostos voláteis por SFE

A remoção de compostos voláteis da proteína de feijão foi realizada em uma unidade de processamento com CO₂ supercrítico desenvolvida no LAPEA, combinando as pressões (15, 20 e 25 MPa) com as temperaturas (40, 50 e 60 °C). Cada combinação foi aplicada em duplicata, totalizando dezoito extrações, com 10 minutos de tempo estático e 40 minutos de tempo dinâmico. A SFE consistiu na preparação do leite de extração em uma célula de 50 mL, seguida da adição de 10,0 g de amostra de proteína de feijão. O CO₂ passava primeiramente por uma serpentina imersa em banho de refrigeração, assegurando seu estado líquido para não cavitatar a bomba. Em seguida, o CO₂ era bombeado através do leite, e aquecido por um sistema elétrico para obter a temperatura do processo. Tal sistema também aquecia a célula de extração, de modo a garantir as condições estabelecidas para extração dos compostos voláteis com CO₂ supercrítico. Os compostos solúveis no CO₂ supercrítico eram recuperados após a despressurização. Posteriormente, os extratos e a proteína de feijão submetida à SFE foram armazenados a -18 °C para análises por cromatografia gasosa.

Tratamento com CO₂ supercrítico

O tratamento da proteína de feijão por SFT foi realizado na mesma unidade do LAPEA usada na SFE, com o mesmo procedimento de preparação do leite. Foram combinadas as pressões (25, 30 e 35 MPa) com as temperaturas (40, 50 e 60 °C). Cada combinação foi aplicada em duplicata, totalizando dezoito experimentos, com tempo estático de uma hora. Finalizado o tratamento, armazenou-se a proteína de feijão a -18 °C para as análises de solubilidade, capacidade emulsificante e capacidade de formação de espuma.

Capacidade da formação e estabilidade de espuma

A capacidade da formação e estabilidade de espuma foi avaliada seguindo a metodologia descrita no guia para caracterização tecnológica-funcional de ingredientes proteicos para o mercado de produtos de origem vegetal da EMBRAPA (2022) em triplicata com adaptações. Pesou-se 3,0 g da proteína de feijão em um béquer de 250 mL e adicionou-se 120 mL de água destilada, homogeneizando a mistura com agitação magnética a 300 rpm, e 25°C, por 10 minutos. Após esse período, fez-se a correção do pH para 7,0, utilizando uma solução de NaOH (0,1M). Uma alíquota de 30 mL foi transferida para um béquer de 150 mL, e agitada em Ultra-Turrax (Modelo T25D, Ika®), por dois minutos, seguindo a sequência: 1500 rpm/30 s, 2000 rpm/30 s, 2500 rpm/1 min. Em seguida, todo conteúdo do béquer foi transferido para uma proveta de 100 mL, na qual mediu-se seu volume nos seguintes tempos: 0 min, 10 min, 30 min e 60 min.

Por fim, a capacidade de formação de espuma (FC) e a estabilidade de espuma (FS) foram calculadas pelas Equações 1 e 2, onde V₀ é o volume inicial da solução da amostra proteica, V₁ é o volume da espuma após a homogeneização e V₂ é o volume da espuma após 10 min, 30 min e 60 min.

$$FC (\%) = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \times 100 \quad (1)$$

$$FS (\%) = \frac{V_2}{V_1} \times 100 \quad (2)$$

Análise estatística

Os resultados foram estatisticamente avaliados pela análise de variância (ANOVA) pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância pelo *software* Minitab (16.1.0, Minitab Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Remoção de compostos voláteis por SFE

Os rendimentos globais (X_0) da SFE em cada condição podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimento global da SFE de proteína de feijão.

Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Densidade do CO ₂ (Kg/m ³)*	X ₀ (% m/m)**
15	40	780,23	2,29 ± 0,07 ^{Aa}
	50	699,75	2,14 ± 0,25 ^{Aa}
	60	604,09	2,17 ± 0,08 ^{Aa}
20	40	839,81	2,24 ± 0,02 ^{Aa}
	50	784,29	2,37 ± 0,16 ^{Aa}
	60	723,68	2,24 ± 0,20 ^{Aa}
25	40	879,49	2,21 ± 0,03 ^{Aa}
	50	834,19	2,26 ± 0,17 ^{Aa}
	60	786,55	2,30 ± 0,22 ^{Aa}

Fonte: Autor, 2024.

* Os valores de densidade do CO₂ foram calculados pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

** Pelo teste de Tukey, letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa a 5% ($p \leq 0,05$) de significância, onde letras maiúsculas representam a diferença significativa entre as diferentes temperaturas e as letras minúsculas representam a diferença significativa entre as pressões.

Com base nos resultados dispostos na Tabela 1, pode-se considerar a SFE a 40 °C e 15 MPa ideal para o tratamento por SFE para extração de lipídeos, com consequente remoção de compostos voláteis, uma vez que a temperatura e a pressão seriam as menores, obtendo rendimento global igual ao alcançado nas demais condições, mas reduzindo o custo energético do processo.

Assim como neste trabalho, os estudos realizados por Anggrianto *et al.* (2014) com aplicação de SFE em feijão fradinho (*Vigna unguiculata*) não encontraram diferença significativa no rendimento global em diferentes pressões (25, 30 e 35 MPa), temperaturas (40, 50 e 60°C) e vazões de CO₂ (10, 15, 20 g/min). Seus experimentos indicaram a condição ótima de rendimento a 25 MPa, 60 °C e 10 g/min para extração de óleo de feijão fradinho. Isso pode estar relacionado ao fato de o teor lipídico da matéria prima ser baixo, como analisado pelo método de Soxhlet nos trabalhos de Anggrianto *et al.* (2014), que resultaram em 2,85% de lipídeos.

Capacidade e estabilidade da formação de espuma

Os resultados de FC podem ser observados na Tabela 2. Pode-se inferir que o tratamento por SFT aumenta a capacidade de formação de espuma da proteína de feijão, o que pode contribuir para a melhora em sua performance na aplicação em produtos *plant based*, nos quais essa propriedade pode ser desejada, como sorvetes, molhos e bolos.

Além disso, a maior FC (143,33% ± 2,35) ocorreu na condição 25 MPa e 40 °C. Embora esta condição não se diferencie significativamente do tratamento a 35 MPa e 60 °C para um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), pode-se definir a condição 25 MPa e 40°C como a ideal para o tratamento por SFT para FC, uma vez que a pressão e a temperatura seriam menores, reduzindo o custo energético de operação.

Também se observa que, nas pressões 25 MPa e 30 MPa, a capacidade de formação de espuma diminui com o aumento da temperatura. Porém, o mesmo não ocorre para a pressão a 35 MPa, na qual a maior temperatura apresentou a maior FC. Tais resultados serão analisados juntamente aos de capacidade emulsificante e de solubilidade, que serão determinadas posteriormente, para verificar se há alguma tendência e elucidar os possíveis

mecanismos que levam a estes resultados.

Tabela 2. Capacidade de formação de espuma de proteína de feijão submetida ao SFT.

Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	FC (%)*
Branco	Branco	95,00 ± 2,36 ^D
25	40	143,33 ± 2,35 ^A
	50	118,34 ± 0,78 ^{BC}
	60	107,50 ± 10,61 ^{CD}
30	40	119,16 ± 8,25 ^{BC}
	50	106,11 ± 3,93 ^{CD}
	60	101,66 ± 2,35 ^{CD}
35	40	120,00 ± 2,36 ^{BC}
	50	117,22 ± 0,78 ^{BC}
	60	126,67 ± 2,35 ^{AB}

Fonte: Autor, 2024.

* Pelo teste de Tukey, letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa a 5% ($p \leq 0,05$) de significância para FC.

Tabela 3. Resultados de FS de proteína de feijão.

Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	FS (%)		
		10 min*	30 min*	60 min*
Branco	Branco	85,00 ± 2,36 ^A	83,34 ± 2,35 ^A	82,50 ± 5,00 ^A
	40	87,15 ± 2,79 ^A	84,46 ± 3,05 ^A	83,99 ± 3,07 ^A
	50	88,45 ± 7,42 ^A	85,70 ± 3,52 ^A	85,48 ± 0,11 ^A
25	60	94,84 ± 3,30 ^A	90,75 ± 1,90 ^A	85,40 ± 0,92 ^A
	40	89,63 ± 1,36 ^A	86,56 ± 3,29 ^A	85,71 ± 2,08 ^A
	50	93,69 ± 5,90 ^A	90,90 ± 3,85 ^A	86,63 ± 1,62 ^A
30	60	96,98 ± 2,69 ^A	93,13 ± 4,21 ^A	87,87 ± 1,70 ^A
	40	91,39 ± 2,45 ^A	86,56 ± 6,67 ^A	86,10 ± 7,32 ^A
	50	93,06 ± 3,19 ^A	90,65 ± 3,48 ^A	89,84 ± 3,08 ^A
35	60	88,05 ± 10,27 ^A	85,59 ± 10,25 ^A	84,87 ± 11,28 ^A

Fonte: Autor, 2024.

* Pelo teste de Tukey, letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa a 5% ($p \leq 0,05$) de significância para FC.

Sabe-se que o calor pode provocar o desdobramento das proteínas, melhorando assim suas interações intra e intermoleculares. Consequentemente, a FC aumenta desde que o calor não provoque desnaturação irreversível com perda permanente de estrutura. Tal perda na estabilidade térmica ocorre a partir de 85 °C para proteína de feijão (Tang, 2008). Desse modo, as proteínas devem ser aquecidas até conseguirem se reorganizar, formando um filme contínuo que reduz a tensão superficial e permite a formação de espuma (Espinosa-Pardo *et al.*, 2020).

O tratamento com SC-CO₂ pode ter modificado estruturalmente a proteína de feijão, resultando em um aumento na retenção de bolhas de ar na dispersão, reduzido a barreira de adsorção e melhorado a FC. A proteína de feijão sem tratamento apresenta 40,5 ± 8,4% de β-folhas do total de sua estrutura secundária, porém, quando submetida a tratamentos por calor tem sua configuração alterada com diminuição nas β-folhas intramoleculares e

aumento de β -folhas intermoleculares, indicando maior flexibilidade das proteínas, pois estabiliza a emulsão água-óleo, melhora sua solubilidade e aumenta a capacidade de formação de espuma (Navneet, Martinez e Joye, 2024; Sharafodin e Soltanizadeh, 2022).

Diferentemente da análise de FC, a FS, que pode ser observada na Tabela 3, não apresentou diferença significativa entre as proteínas de feijão submetidas ao SFT e as não tratadas, indicando que o tratamento não influenciou em uma melhoria significava de estabilidade.

Assim como no presente trabalho, nos estudos de Espinosa-Pardo *et al.* (2020) com proteína do gérmen de milho também houve diferença significativa na FC, variando de 25% a 84%, enquanto a FS variou apenas de 73% a 89%, não apresentando diferença significativa.

Embora ainda não haja eficiência comprovada do SFT para melhorar a estabilidade da espuma da proteína de feijão, a utilização desta técnica para melhorar a capacidade de formação de espuma foi promissora, obtendo FC maior que a da proteína sem tratamento, e mantendo-a estável.

CONCLUSÕES

Até o momento, o uso do CO₂ supercrítico mostrou-se interessante no processo de SFE para a remoção de *off flavor* na proteína de feijão a 40 °C e 15 MPa. Resultados mais detalhados serão apresentados após a análise dos extratos por cromatografia gasosa. A SFT foi eficaz no tratamento da proteína do feijão, melhorando sua capacidade de formação de espuma, com destaque para a condição de 40° C e 25 MPa, sem interferir na sua estabilidade. Tais condições foram escolhidas por performarem bem e apresentarem o menor custo de operação dentre as demais testadas. Os efeitos de pressão e temperatura serão avaliados a partir dos resultados das análises de emulsificação e solubilidade, que serão realizados posteriormente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGGRIANTO, K. *et al.* Application of supercritical fluid extraction on food processing: black-eyed pea (*Vigna unguiculata*) and peanut (*Arachis hypogaea*). *Procedia Chemistry* 9 265 – 272. 2014.
- EMBRAPA. Guia para caracterização tecnológica-funcional de ingredientes proteicos para o mercado de produtos de origem vegetal. 2022.
- ESPINOSA-PARDO, F. A. *et al.* Oil and protein recovery from corn germ: Extraction yield, composition and protein functionality. *Food and Bioproducts Processing*, vol. 120, p. 131-142. 2020.
- KUSUMAH, S. H.; ANDOYO, R.; RIALITA, T. Protein isolation techniques of beans using different methods: A review. *International Conference on Food and Bio-Industry. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 443 012053. 2020.
- LIU, C.; PEI, R.; HEINONEN, M. Faba bean protein: A promising plant-based emulsifier for improving physical and oxidative stabilities of oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, vol. 369, 130879, ISSN 0308-8146. 2022.
- LI, X. *et al.* Effects of pretreatments on physicochemical and structural properties of proteins isolated from canola seeds after oil extraction by supercritical-CO₂ process. *LWT – Food Science and Technology*, 2021, p. 137, p. 110415.
- NAVNEET; MARTINEZ, M. M.; JOYE, I. J. Heat-treated bean flour: Exploring techno-functionality via starch-protein structure-function analysis. *Food Hydrocolloids*, vol. 157. 2024.
- OLIVEIRA, J. A. de; CASELL, F. de T. R.; PINHEIRO, H. D. Potencial estratégico do feijão-caupi como ingrediente para alimentos plant-based. 2023.
- ROH, H. S. *et al.* Isolation of off-flavors and odors from tuna fish oil using supercritical carbon dioxide. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 11, p. 496-502. 2006.
- SHARAFODIN, H.; SOLTANIZADEH, N. Potential application of DBD Plasma Technique for modifying structural and physicochemical properties of Soy Protein Isolate. *Food Hydrocolloids*, vol. 122. 2022.
- TANG, C. H. Thermal denaturation and gelation of vicilin-rich protein isolates from three Phaseolus legumes: A comparative study. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 41, p. 1380-1388. 2008.
- WANG, B. *et al.* Insights into formation, detection and removal of the beany flavor in soybean protein. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, vol. 112, p. 336-347.