



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FELIPE GIANASI

**AVALIAÇÃO TECNO-ESTRUTURAL DE ISOLADO PROTEICO DE
TREMÇO (*Lupinus albus*) PROCESSADO POR ALTA PRESSÃO
HIDROSTÁTICA COMBINADA COM DIFERENTES pHs**

**Campinas
2025**

FELIPE GIANASI

**AVALIAÇÃO TECNO-ESTRUTURAL DE ISOLADO PROTEICO DE TREMOÇO
(*Lupinus albus*) PROCESSADO POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA
COMBINADA COM DIFERENTES pHs**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. MARCELO CRISTIANINI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO FELIPE
GIANASI, E ORIENTADO PELO PROF.
DR. MARCELO CRISTIANINI

Campinas
2025

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

G348a Gianasi, Felipe, 1996-
Avaliação tecno-estrutural de isolado proteico de tremçoço (*Lupinus albus*)
processado por alta pressão hidrostática combinada com diferentes pHs /
Felipe Gianasi. – Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: Marcelo Cristianini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP), Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Lupinus albus*. 2. Alta Pressão Hidrostática. 3. Mudança de pH. 4.
Sustentabilidade. I. Cristianini, Marcelo. II. Universidade Estadual de
Campinas (UNICAMP). Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Techno-structural evaluation of lupin protein isolate (*Lupinus albus*) processed by high hydrostatic pressure combined with pH-shifting

Palavras-chave em inglês:

Lupinus albus

High-Pressure Processing

pH-shifting

Sustainability

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Marcelo Cristianini [Orientador]

Ruann Janser Soares de Castro

Mark Alexandrow Franchi

Data de defesa: 26-02-2025

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

ODS: 3. Saúde e bem-estar

ODS: 9. Inovação e infraestrutura

ODS: 12. Consumo e produção responsáveis

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0548-5118>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7390052532241931>

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Cristianini

Presidente

FEA – UNICAMP

Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro

Membro Titular

FEA – UNICAMP

Dr. Mark Alexandrow Franchi

Membro Titular

Empresa

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertações/Teses e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação.

À minha vó Lourdes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por ser fonte de sabedoria e guia durante toda a minha jornada acadêmica e pessoal.

Ao meu orientador, prof. Dr. Marcelo Cristianini, por enxergar meu potencial e por me oferecer a oportunidade de conhecer e aprofundar meus conhecimentos em um tema que tenho um grande apreço pessoal e que tem ganhado cada vez mais relevância e atenção de toda a sociedade (pesquisadores, empresas e sociedade civil) pela importância para as próximas gerações.

À minha mãe Simone Chemiscok Gianasi, meu pai Eduardo Gianasi Júnior e meu irmão João Paulo Gianasi, aos amigos que me acompanham desde a graduação e aos novos feitos durante a Pós-Graduação, pelo apoio e incentivo a sempre se dedicar ao máximo em tudo que for fazer na vida, a continuar aprendendo e nunca desistir diante da primeira dificuldade.

A todos os professores, pesquisadores e técnicos de laboratório que contribuíram para o sucesso desta conquista, meu profundo agradecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio do termo de outorga com processo nº 130236/2022-5, responsáveis por concederem os recursos para a realização deste projeto.

*“Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros
de gigantes.”*

Sir Isaac Newton

RESUMO

O *Lupinus albus* é uma leguminosa de grande potencial para a sociedade. No aspecto agrícola, ela possui grande capacidade de adaptação a diferentes climas e variação de temperaturas, além da habilidade de recuperação de solos degradados. No aspecto nutricional, possui alto teor de proteínas, boa quantidade de fibras e micronutrientes. Essas proteínas podem ser utilizadas como ingrediente, e o uso da tecnologia de Alta Pressão Hidrostática (HPP – High Pressure Processing) pode ser uma forma de potencializar as propriedades tecno-funcionais. Assim, esse estudo avaliou o impacto do processamento por HPP (200, 400 e 600 MPa) em isolado proteico de tremço nos pHs 2,0; 7,0 e 11,0. Alterações estruturais foram analisadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, revelando alterações secundárias relevantes induzidas pelo HPP. O uso do HPP ocasionou o desdobramento da estrutura proteica, mudando o equilíbrio entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos expostos na superfície. O tratamento por HPP também provocou alteração no tamanho médio de partícula, sendo um indicativo da formação de agregados. Como consequências, houve mudanças na Capacidade de Retenção de Água e de Óleo, nas propriedades de espuma (Capacidade de Formação e Estabilidade), no índice de atividade e estabilidade emulsificantes, solubilidade e cor instrumental. Os processamentos em pHs 7,0 e 11,0 propiciaram os maiores incrementos nas propriedades tecno-funcionais, destaque para os aumentos de 216% e 149% na estabilidade de emulsificação e na Capacidade de Retenção de Óleo da amostra em 400 MPa e pH 7,0 além do aumento de 122% na Capacidade de Retenção de Óleo da amostra em 200 MPa e pH 7,0 e do aumento significativo frente ao controle em todos os pontos da curva de solubilidade. Portanto, a aplicação de HPP combinado à mudança de pH se mostrou uma estratégia interessante para melhoria das propriedades tecno-funcionais do isolado proteico de *Lupinus albus*. Com essas melhorias, as proteínas de tremço podem ser empregadas como um novo ingrediente para a formulação de diversas categorias de alimentos.

Palavras-chave: *Lupinus albus*, Alta Pressão Hidrostática, Precipitação Isoelétrica, Sustentabilidade.

ABSTRACT

Lupinus albus is a vegetable with significant potential for society. Agriculturally, it has a high capacity for adaptation to different climates and temperature variations, as well as the ability to rehabilitate degraded soils. Nutritionally, it has a high protein content, a good amount of fiber, and micronutrients. These proteins can be used as an ingredient, and the use of High-Pressure Processing (HPP) technology can be a way to enhance its techno-functional properties. Thus, this study evaluated the impact of HPP processing (200, 400, and 600 MPa) on lupin protein isolate at pH levels 2.0, 7.0, and 11.0. Structural changes were analyzed using Fourier-transform infrared spectroscopy, revealing significant secondary alterations induced by HPP. The use of HPP caused the unfolding of the protein structure, altering the balance between hydrophilic and hydrophobic groups exposed on the surface. HPP treatment also caused changes in the average particle size, indicating the formation of aggregates. Consequently, there were changes in Water and Oil Holding Capacity, foam properties (Foaming Capacity and Stability), emulsifying activity and stability index, solubility, and instrumental color. Processing at pH levels 7.0 and 11.0 resulted in the greatest increases in techno-functional properties, with notable increases of 216% and 149% in emulsification stability and Oil Holding Capacity of the sample at 400 MPa and pH 7.0, as well as a 122% increase in Oil Holding Capacity of the sample at 200 MPa and pH 7.0, and a significant increase compared to the control at all points on the solubility curve. Therefore, the application of HPP combined with pH-shifting proved to be an interesting strategy for improving the techno-functional properties of *Lupinus albus* protein isolate. With these improvements, lupin proteins can be used as a new ingredient for the formulation of various categories of foods.

Keywords: *Lupinus albus*, High-Pressure Processing, pH-shifting, Sustainability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem tremoceiro da espécie <i>Lupinus albus</i> L.: a) flor do tremoceiro; b) tremoceiro seco.....	19
Figura 2 - Imagem das sementes de tremço da espécie <i>Lupinus albus</i> L.	19
Figura 3 - Localidade das espécies nativas e as cultivadas no Brasil.....	20
Figura 4 - Fluxograma das etapas de execução deste projeto.	27
Figura 5 - Representação esquemática posicionamento amostras no sistema L*, a*, b*.....	41
Figura 6 - Aspecto visual das amostras de tremço submetidas à HPP combinado a mudança de pH.....	41
Figura 7 - Hidrofobicidade das amostras avaliadas.	43
Figura 8 - Espectros de FTIR das amostras de isolado proteico de tremço processadas em pH 2,0.	46
Figura 9 - Espectros de FTIR das amostras de isolado proteico de tremço processadas em pH 7,0.	46
Figura 10 - Espectros de FTIR das amostras de isolado proteico de tremço processadas em pH 11,0.	47
Figura 11 - Perfil espectral médio dos isolados proteicos processados em pH 2,0.....	47
Figura 12 - Perfil espectral médio dos isolados proteicos processados em pH 7,0.....	48
Figura 13 - Perfil espectral médio dos isolados proteicos processados em pH 11,0.....	48
Figura 14 - Scores das amostras de isolado proteico tremço em pH 2,0...	53
Figura 15 - Scores das amostras de isolado proteico tremço em pH 7,0...	54
Figura 16 - Scores das amostras de isolado proteico tremço em pH 11,0.	54
Figura 17 - Gráfico de cargas (loadings) das amostras de isolado proteico de tremço em pH 2,0.....	55
Figura 18 - Gráfico de cargas (loadings) das amostras isolado proteico tremço em pH 7,0.....	55
Figura 19 - Gráfico de cargas (loadings) das amostras de isolado proteico tremço pH 11,0.....	56

Figura 20 - Distribuição Acumulada de Tamanho da Partícula amostras pH 2,0.	58
Figura 21 - Distribuição Acumulada de Tamanho da Partícula amostras pH 7,0.	59
Figura 22 - Distribuição Acumulada de Tamanho da Partícula amostras pH 11,0.	60
Figura 23 - Distribuição de Tamanho de Partícula Amostras pH 2,0 de processamento.	61
Figura 24 - Distribuição de Tamanho de Partícula Amostras pH 7,0 de processamento.	61
Figura 25 - Distribuição de Tamanho de Partícula Amostras pH 11,0 de processamento.	62
Figura 26 - Solubilidade proteica em água dos controles nos 3 diferentes pHs de processamento.	68
Figura 27 - Solubilidade proteica em água no pH 2,0 de processamento.	70
Figura 28 - Solubilidade proteica em água no pH 7,0 de processamento.	71
Figura 29 - Solubilidade proteica em água no pH 11,0 de processamento.	71
Figura 30 - Capacidade de Retenção de Óleo.	75
Figura 31 - Capacidade de Retenção de Água.	77
Figura 32 - Índice de Atividade Emulsificante.	79
Figura 33 - Índice de Estabilidade Emulsificante	82
Figura 34 - Capacidade de Formação de Espuma.	84
Figura 35 - Estabilidade de Espuma no pH 2,0 de processamento.	86
Figura 36 - Estabilidade de Espuma no pH 7,0 de processamento.	87
Figura 37 - Estabilidade de Espuma no pH 11,0 de processamento.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição centesimal de diferentes cereais e leguminosas.	21
Tabela 2: Levantamento bibliométrico.	35
Tabela 3: Valores obtidos para a composição centesimal.	35
Tabela 4: Tabela de gradação da diferença de cor.	37
Tabela 5: Parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e ΔE das amostras de isolado proteico de tremço.	38
Tabela 6: Correlação de estruturas secundárias presentes na banda Amida I.	45
Tabela 7: Composição de Estruturas Secundárias Controle pHs 2,0; 7,0 e 11,0.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11S	α -conglutina
7S	β -conglutina
ANOVA	Análise de Variância
ANS	1-anilina-9-naftalenossulfonato
AOAC	Associação Oficial de Química Analítica Internacional
ATR	Reflectância Total Atenuada
CIELAB	Comissão Internacional da Iluminação e Lab
CO ₂	Gás Carbônico
CRA	Capacidade de retenção de água
CRO	Capacidade de retenção de óleo
DSL	Varredura Dinâmica de Luz
IAE	Índice de atividade emulsificante
IEE	Índice de estabilidade emulsificante
FAO	Organização para Agricultura e Alimentos
CFE	Capacidade Formação de Espuma
FDT	Farinha Desengordurada de tremçoço
FIT	Farinha Integral de tremçoço
EE	Estabilidade espuma
FTIR	Espectroscopia por Transformada de Fourier
HCl	Ácido Clorídrico
Ho	Hidrofobicidade de Superfície
HPP	Alta Pressão Hidrostática
IPT	Isolado Proteico de tremçoço
ITIS	Sistema Integrado de Informação Taxonômica
NaOH	Hidróxido de Sódio
PCA	Análise de Componente Principal
PDI	Índice de Polidispersão
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Ponto isoeletrico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SG	Savitzky-Golay
SP	Solubilidade proteica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. TREMOÇO.....	19
3.2. PROTEÍNAS DO TREMOÇO.....	22
3.3. PROCESSO DE MODIFICAÇÃO POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA 23	
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. MATERIAIS.....	26
4.2. MÉTODOS.....	26
4.2.1. Obtenção das farinhas de tremoço.....	28
4.2.2. Extração proteínas do tremoço.....	28
4.2.3. Processamento por Alta Pressão Hidrostática (HPP).....	29
4.2.4. Análise composição centesimal.....	30
4.2.5. Análise de cor instrumental	30
4.2.6. Avaliação das propriedades funcionais	30
4.2.7. Avaliação das propriedades estruturais.....	33
4.2.8. Análise estatística.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. CARACTERIZAÇÃO CENTESIMAL E RENDIMENTO DE PROTEÍNAS ...	35
5.2. ANÁLISE DE COR INSTRUMENTAL	37
5.3. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	42
5.3.1. Hidrofobicidade Superficial (H_o)	42
5.3.2. FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	44
5.3.2.1. Análise de Componente Principal (<i>Principal Component Analysis</i> - PCA) - FTIR	53
5.3.3. Distribuição de Tamanho de Partículas.....	57
5.4. ANÁLISES FUNCIONAIS	67
5.4.1. Solubilidade em água	67
5.4.2. Capacidade de Retenção de Óleo (CRO)	74
5.4.3. Capacidade de retenção de água (CRA).....	77
5.4.4. Índice de Atividade Emulsificante (IAE) e Estabilidade Emulsificante (EEM) 79	

5.4.5. Capacidade de Formação de Espuma (CFE) e Estabilidade Espuma (EE)
83

6. CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE	101
APÊNDICE A – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA NO pH 2,0	102
APÊNDICE B – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA EM pH 3,0	103
APÊNDICE C – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA EM pH 4,0	104
APÊNDICE D – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA EM pH 5,0	105
APÊNDICE E – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA EM pH 6,0	106
APÊNDICE F – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA EM pH 7,0.....	107
APÊNDICE G – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA EM pH 8,0	108

1. INTRODUÇÃO

A relação entre homem e os alimentos tem-se transformado ao longo da história. No período contemporâneo, a globalização é um importante fator de influência no comportamento dos indivíduos, proporcionando alterações em escala global de hábitos de consumo de bens, alimentos e serviços. Essas mudanças ocorrem principalmente com a difusão de hábitos presentes nas sociedades norte-americanas, europeias e também asiática às outras culturas, como as latino-americanas, mais especificamente a brasileira (DE CASTRO; MACIEL; MACIEL, 2016; ROCHA; RIAL; HELLEBRANDT, 2013). Com isso, o desenvolvimento de novas tendências de consumo nestes países chega aos brasileiros em pouco tempo.

Dentre as tendências de consumo têm-se: a maior preocupação com a sustentabilidade da cadeia produtiva dos alimentos, a qual tem incentivado uma maior transparência das empresas com o consumidor a respeito dos ingredientes presentes nos produtos (HASSOUN et al., 2024). Além disso, há a preocupação do consumidor com o aspecto nutricional dos alimentos industrializados, o que pressionou a indústria alimentícia a rever suas formulações. Segundo estudo intitulado “Indústria de alimentos 2030”, os consumidores têm buscado por alternativas que proporcionem maiores aportes de proteínas, fibras, vitaminas e de compostos bioativos. Assim, a indústria tem substituído de forma parcial ou mesmo total os ingredientes convencionais por grãos integrais, amêndoas, frutas, sementes, e outras fontes não utilizadas atualmente (HASSOUN et al., 2024; ITAL, 2020).

Sobre essas fontes não tradicionais, têm-se, por exemplo, leguminosas como: as variedades de feijões, grão de bico, a ervilha, o tremoço, entre outras (DE LIMA FILHO, 2019).

Como características deste grupo, têm-se: elevados teores de proteínas, fibra alimentar e minerais. Aliado a isso, há o baixo conteúdo de lipídios e o conteúdo significativo de carboidratos de lenta digestão. Além dos benefícios nutricionais, há consequências positivas no aspecto ambiental, pois o cultivo de leguminosas proporciona a fixação de nitrogênio no solo, o que reduz a demanda de uso de fertilizantes (obtidos a partir de fontes fósseis) nos solos cultivados (RAWAL et al., 2019).

Pensando nestas características, o tremoço se destaca por apresentar teor elevado de proteína, semelhante ao da soja (entre 30 a 40%) e superior a

outras leguminosas (feijão – 22-26%, ervilha – 24,6%, grão-de-bico – 19,3%), sendo interessante seu uso para obtenção de ingredientes para a indústria (DAY, 2016). No entanto, na literatura ainda há muitas lacunas a respeito da modificação das propriedades das proteínas de tremço. De acordo com levantamento bibliométrico próprio (descrito na seção 4.2.1) sobre temas mais pesquisados com o tremço, dos 650 documentos encontrados, os temas mais recorrentes são: 21% atividade biológica dos diversos compostos presentes no tremço; 12% comparação com outras fontes de proteínas animais/vegetais; e 11% aplicações tecnológicas para elaboração de produtos sem glúten (panificados, massas alimentícias e snacks). Os estudos que avaliaram o uso de tecnologias emergentes (HPP, Homogeneização à Alta Pressão, Ultrassom, Campo elétrico pulsado, entre outras) para a modificação proteica representam apenas 1% dos documentos; o que evidencia muitas lacunas envolvendo a modificação das proteínas do tremço.

Além disso, as propriedades tecno-funcionais e nutricionais destas proteínas são aquém das proteínas de origem animal. Estudos anteriores mostraram que as proteínas do tremço possuem curva de solubilidade com redução da solubilidade na região próxima ao PI, assim como outras fontes proteicas de plantas, no entanto as proteínas do soro do leite bovino apresentaram alta solubilidade ao longo de toda a curva (TANG; ROOS; MIAO, 2023). Para a capacidade de gelificação, a literatura relata que os isolados de tremço formam fracas redes de gel induzidas por calor quando comparadas às proteínas isoladas de soja. Enquanto que Vogelsang-O'Dwyer e colaboradores (2020), conseguiram formar um gel fraco com concentrações mínimas de 23% de isolado de tremço Azul e 7% de tremço Branco, Wang e colaboradores (2022b) obtiveram um gel forte com 12% de isolado de soja sob condições semelhantes de preparo. Essa diferença é atribuída ao elevado número de ligações de dissulfeto, as quais aumentam a estabilidade térmica, pois dificultam o desdobramento das proteínas durante o processamento térmico (AL-ALI et al., 2021; BADER; BEZ; EISNER, 2011; WANG et al., 2022b). Por fim, para a saudabilidade, é relatado que de modo geral as proteínas de plantas têm menores valores de digestibilidade (75-80%) frente as proteínas animais (90-95%) (SHAGHAGHIAN et al., 2022), bem como o consumo dessas proteínas podem desencadear alergias (BOUKID; PASQUALONE, 2022).

Portanto, diante deste cenário, este estudo buscou aprofundar os conhecimentos acerca da modificação física das proteínas do isolado proteico de

tremoço pela aplicação da tecnologia emergente de alta pressão hidrostática combinado a mudança no pH de processamento. Além disso, avaliou-se os impactos que estas modificações proporcionaram às propriedades tecnológicas e funcionais das proteínas.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Acompanhando a tendência de consumo que preza pela produção de alimentos com maior saudabilidade e sustentabilidade, o objetivo deste trabalho foi a avaliação dos efeitos tecno-funcionais do emprego da tecnologia emergente de Alta Pressão Hidrostática combinada com a mudança de pH de processamento no isolado proteico de tremoço.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o isolado proteico de tremoço a partir das sementes integras de tremoço;
- Obter indicativos sobre a estrutura das proteínas por meio da análise de Distribuição de Tamanho de Partículas e da avaliação das características de superfície com a análise de Hidrofobicidade Superficial;
- Avaliar a estrutura das proteínas antes e após processo por HPP por meio da técnica de Espectroscopia por Transformada de *Fourier* (FTIR);
- Avaliar o efeito do processamento por HPP combinado com pH na Capacidade de Retenção de Água e de Óleo, no índice de Atividade e Estabilidade Emulsificante, Solubilidade, e na Atividade e Estabilidade Espumante.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. TREMOÇO

O tremoço é a semente da planta conhecida como tremoceiro. Esta planta pertence à família Fabaceae, também conhecida como leguminosas. Outros gêneros de plantas que fazem parte desta família são: o amendoim, a soja, a fava, os feijões, a ervilha e muitos outros gêneros (totalizando 386 gêneros diferentes catalogados). O tremoço faz parte do gênero *Lupinus*, o qual agrega 165 espécies, 87 subespécies e cerca de 105 variedades (ITIS, 2011). A Figura 1 e Figura 2 a seguir apresentam um conjunto fotografias desta planta.

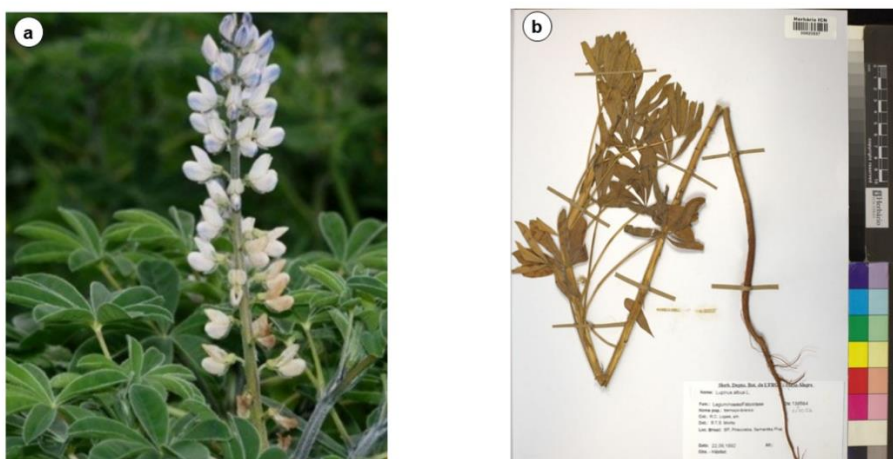


Figura 1 - Imagem tremoceiro da espécie *Lupinus albus* L.: a) flor do tremoceiro; b) tremoceiro seco. Retirado de: Iganci & Miotto 2020.



Figura 2 - Imagem das sementes de tremoço da espécie *Lupinus albus* L. Fonte: Autoria do autor.

Este gênero pode ser encontrado nativamente distribuído na região ao entorno do mar mediterrâneo, ou seja, no sul da Europa, além do norte do

continente africano. Além disso, está presente em outras regiões da África, bem como no continente Americano, situado em parte da América do Norte (México) e por diversos países da América do Sul (Peru, Chile, Brasil) e também na Oceania (Austrália) (WOLKO et al., 2011).

Em razão da grande dispersão de localidades, este gênero de plantas apresenta grande adaptação aos mais variados ambientes climáticos. Há registros de espécies presentes em regiões subárticas no Alasca, além da presença em climas de temperaturas mais elevadas como o mediterrâneo e semiárido e até mesmo em áreas montanhosas da Cordilheira dos Andes, da Serra Nevada (México) e africanas (como as nativas do domínio afromontano e no Highveld) (VAN DER MEY, 1996; WOLKO et al., 2011).

No Brasil, faz-se presente espécies nativas ou indígenas, de espécies endêmicas e de espécies introduzidas. Segundo Iganci & Miotto (2020), há catalogadas no Brasil 46 espécies de tremoço, sendo que 30 são espécies nativas e destas, 20 delas são consideradas endêmicas (IGANCI; MIOTTO, 2020). Somando-se esse número de espécies brasileiras com o do banco genético norte americano *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS), há quase 200 espécies conhecidas no mundo. A Figura 3 a seguir apresenta a localização aproximada das espécies presentes no Brasil.



Onde: Roxo - Representa os estados da região Sul que possuem espécies de tremoço catalogadas; Rosa - Representa espécies de tremoço catalogadas nos estados da região Sudeste; Laranja – representa espécies de tremoço confirmadas nos estados da região Nordeste; Amarelo e Azul - Representa os estados da região Centro-Oeste e o Distrito Federal que possuem espécies de tremoço catalogadas; Cinza – Representa estados com possíveis ocorrências de espécies tremoço; Branco – Representam estados sem informações acerca da ocorrência de espécies de tremoço.

Figura 3 - Localidade das espécies nativas e as cultivadas no Brasil.
Retirado de: Iganci & Miotto 2020.

Vale destacar que segundo Iganci & Miotto (2020), há a possibilidade de ocorrência de descoberta de novas plantas no estado do Ceará, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul. No entanto, os autores ressaltam que a destruição dos biomas brasileiros por queimadas e desmatamento é uma ameaça a biodiversidade desse gênero.

Quanto à produção desta leguminosa, segundo dados da *Food and Agriculture Organization* - FAO (2023), a produção global desta, em 2023, somando os países maiores produtores foi de 1.907.801,9 toneladas. Dentre os maiores produtores tem-se a Austrália sendo a maior produtora (1.279.707,0 ton), seguido da Polônia (275.320,0 ton), e da Federação Russa (136.384,8 ton).

Em relação ao aspecto nutricional, a Tabela 1 apresenta um comparativo de alguns grãos com o tremoço.

Tabela 1: Composição centesimal de diferentes cereais e leguminosas.

Grão	Umidade (%)	Proteínas (g)	Carboidratos (g)	Fibra alimentar (g)	Lipídios (g)	Cinzas (g)
Tremoço, cru	14,0	32,7	42,9	31,4	9,4	1,7
Feijão carioca, cru	14,0	20,0	61,2	18,4	1,3	3,5
Feijão preto, cru	14,9	21,3	58,8	21,8	1,2	3,8
Grão de bico, cru	12,3	21,2	57,9	12,4	5,4	3,2
Lentilha, crua	11,5	23,2	62,0	16,9	0,8	2,6
Milho, cru	13,0	7,0	74,3	3,9	4,5	1,4
Arroz Tipo1, cru	13,2	7,2	78,8	1,6	0,3	0,5

Fonte: NEPA (2011).

Diante dos dados apresentados na Tabela 1, pode-se perceber que o tremoço possui um teor de proteínas superior aos cereais mais consumidos, como também das leguminosas popularmente conhecidas por serem “fontes de proteínas”, caso do feijão. Além disso, o tremoço possui alto teor de fibras e importante aporte de minerais.

Ainda sobre a Tabela 1, pode-se perceber que o tremoço possui um teor de lipídios superior aos demais cereais e leguminosas listados. Esse teor maior ao ser avaliado pelo aspecto qualitativo revela uma característica nutricional interessante, pois o tremoço apresenta um perfil lipídico com prevalência de ácido graxo oleico (55,72%), seguido do ácido linoleico (19,63%) e do linolênico (10,08%)

além do ácido palmítico (6,37%) e do eicosanoico (4,53%), e por fim, o ácido esteárico (1,92%) e o erúcico (1,74%). Assim, a razão entre ω -3/ ω -6, que é um importante fator sobre a nutrição humana e segundo SCHMIDT (2001) deve ser de 1:4 a 1:1, no caso do tremoço fica próximo de 1:2. Com isso, aliado à valorização dos alimentos com maiores teores de ω -3 promovida pelas organizações de saúde ao redor do mundo, o tremoço pode ser mais consumido (Rybin'ski, 2018).

3.2. PROTEÍNAS DO TREMOÇO

Segundo a classificação de Osborne, aproximadamente 87% das proteínas de reserva são globulinas (ou congulinas) e 13% são albuminas. As frações de glutelinas e prolaminas são encontradas em baixa quantidade (MANE et al., 2018).

Com relação às globulinas, são macromoléculas de alto peso molecular com função de armazenamento quando *in vivo* na planta. As globulinas encontradas no tremoço podem ser divididas 4 grupos: α -cong lutina ou 11S (35 - 37%), β -cong lutina ou 7S (44 - 45%), γ -cong lutina (4 - 5%) e δ -cong lutina ou 2S (10 - 12%). β -cong lutinas são proteínas de estrutura complexa, contendo cerca de 15 subunidades diferentes com pesos moleculares entre 20 e 60 kDa, totalizando um peso molecular de cerca de 170 kDa. Já a α -cong lutinas são formadas por um complexo de pequenas subunidades, totalizando cerca de 315 kDa. Quanto às γ -cong lutinas e δ -cong lutinas, estas contêm elevados teores de aminoácidos sulfurados (BOUKID; PASQUALONE, 2022; CHAPLEAU; DE LAMBALLERIE-ANTON, 2003).

Quanto ao conteúdo de aminoácidos, como é característico das proteínas de leguminosas, há um baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina), os quais se concentram nas frações de γ -cong lutina e δ -cong lutina. Além disso, possuem um elevado conteúdo de lisina (MANE et al., 2018; BOUKID; PASQUALONE, 2022). Assim, para formulações de alimentos com proposta para substituir uma refeição do dia-a-dia, é interessante combinar essas proteínas com proteínas de cereais, pois possuem alto conteúdo de aminoácidos sulfurados e baixo conteúdo de lisina (SHRESTHA et al., 2021).

Em relação às propriedades tecno-funcionais das proteínas de tremoço, Vogelsang-O'Dwyer *et al.* (2020), em estudo que produziu e avaliou os isolados

proteicos de tremço Branco e de tremço Azul, observou que os isolados apresentaram composição centesimal similar, embora tenham apresentado diferença no perfil proteico. Neste estudo, os autores obtiveram bons valores de solubilidade em pH 7, sendo 76,9% para o isolado de tremço Azul e 69,8% para o tremço Branco. Ainda foram avaliadas as propriedades de espuma destes isolados. Obteve-se um perfil no qual o aumento da concentração do isolado resultou no aumento da capacidade de formação de espuma, assim, para as duas maiores concentrações avaliadas (3 e 3,3%), os autores obtiveram valor acima de 70%. Para a estabilidade de espuma, um fato interessante é que variando a concentração de 1 até 3,3% obteve-se valores próximos de 90% (VOGELSANG-O'DWYER et al., 2020).

3.3.PROCESSO DE MODIFICAÇÃO POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Dentre os diversos processos tecnológicos que podem ser utilizados para o processamento de alimentos, a Alta Pressão Hidrostática (HPP) é considerada uma tecnologia emergente devido a sua ainda recente introdução no processamento de alimentos (os primeiros produtos com esse processo foram lançados no mercado japonês nos anos 90) (YAMAMOTO, 2017).

Detalhando mais esse processo, ele consiste na aplicação de altas pressões (acima de 100 MPa até cerca de 600 MPa) por tempos de 10 a 60 min nos alimentos. Os efeitos promovidos são resultantes da existência de dois princípios básicos que governam o processo. O primeiro é o princípio de Le Chatelier, no qual postula que em reações químicas, quando há o aumento de pressão, há o favorecimento de estados biofísicos que ocupam menor volume geral. Além disso, o segundo princípio é o isostático, o qual postula que a pressão é igualmente distribuída por toda superfície de contato, sendo que esta pode ser o alimento sob pressão direta ou o alimento embalado em material flexível de qualquer forma ou tamanho de embalagem (PINTO et al., 2020).

Quanto aos efeitos promovidos por essa tecnologia, podem ser divididos em: aspecto de segurança microbiológica, alterações físicas nos compostos do alimento, e por fim, alterações na característica nutricional/funcional dos compostos no alimento (YAMAMOTO, 2017).

Para os micro-organismos, tratamentos em pressões mais baixas (de 20 a 180 MPa) proporcionam danos celulares subletais, já aplicações em médias e altas pressões (de 200 a 400 MPa) promovem danos letais para uma grande parcela de micro-organismos. Destes, bolores e leveduras têm maior sensibilidade do que as bactérias e dentro destas, as bactérias Gram-positivas são mais baro-tolerantes do que as Gram-negativas (AGANOVIC et al., 2021).

Para macromoléculas como enzimas, a modificação de sua estrutura pode reduzir a atividade e até mesmo inativá-las. Esse efeito é interessante, pois enzimas como a polifenoloxidase, peroxidases, lipoxigenases, entre outras; quando ativas no alimento, promovem modificações sensoriais (na cor, aroma, sabor e textura) que impactam na aceitação do consumidor (CHAKRABORTY et al., 2014).

Assim, como para as enzimas, as proteínas também sofrem modificações capazes de alterar as propriedades estruturais, funcionais e nutricionais (digestibilidade).

Peyarano & Speroni & Avanza (2016), avaliaram comparativamente o efeito do tratamento térmico (a 70 e a 90 °C) e do uso do HPP (200, 400 e 600 MPa) em isolados proteicos de feijão caupi extraídos em pH diferentes (8 e 10). Os autores observaram que o valor do pH de extração alterou as propriedades físico-químicas (comprimento de onda máximo, temperatura de desnaturação e hidrofobicidade), e essas diferenças foram atribuídas as mudanças irreversíveis na estrutura proteica ocorridas durante o tempo de 60 min em pH 10 de extração. Além disso, os autores observaram que os tratamentos por calor e HPP nos isolados em pH 8,0 induziram mudanças mais drásticas nas propriedades físico-químicas e funcionais que em pH 10,0. Como explicação, os autores atribuíram à estrutura das proteínas em pH 10,0 ter sido mais modificada já na etapa de extração das proteínas. Dentre os processamentos, o HPP foi o mais eficiente para modificação das propriedades funcionais (CRA e concentração mínima para formação de gel), sendo mais interessante para o uso como ferramenta técnica para desenvolvimento de soluções “*tailor made*” (PEYRANO; SPERONI; AVANZA, 2016).

Navare (2019), avaliou o efeito do HPP em soluções de proteína concentrada de lentilha amarela (com concentração de 10% m/m), tendo como fatores: o tempo de processo (5, 10 e 15 minutos), pressão utilizada (150, 350, 550 MPa) e o pH da solução de proteínas (pH 3,0; 5,0 e 7,0). O autor observou que o pH neutro e a pressão baixa (150 MPa, 10 min) foi o tratamento mais eficiente para

incremento das propriedades funcionais das proteínas. Para a solubilidade, na pressão baixa obteve-se valor de 50% frente a 40% do controle, e conforme aumentou-se a pressão a solubilidade foi impactada negativamente. Tendência similar foi observada para a capacidade emulsificante. O autor atribuiu esse comportamento ao fato de que a hidrofobicidade superficial aumentou com o aumento da pressão, o que é resultado do desenovelamento da estrutura proteica. Com isso, as proteínas formaram agregados insolúveis por interações hidrofóbicas (NAVARE, 2019).

Ahmed & Mulla & Rahman (2018) avaliaram os efeitos da aplicação de alta pressão em isolados proteicos de feijão vermelho nas pressões de 200, 400, 600 MPa por 15 minutos. Como achados desta pesquisa, tem-se que a variação da pressão utilizada resultou em alteração significativa no índice de atividade emulsificante (IAE) e no índice de estabilidade emulsificante (EEM). Para o IAE, todas as pressões apresentaram melhora nesta propriedade em relação ao controle não submetido à pressão, no entanto, as pressões de 200 e 400 MPa obtiveram os maiores valores (39,0 m²/g e 40,4 m²/g), diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) do tratamento em 600 MPa. Já para o EEM, a aplicação de pressão melhorou essa propriedade, exceto para a pressão de 600 MPa que não diferiu significativamente do controle. As pressões de 200 e 400 MPa obtiveram os valores de 123 min e 142,3 min, respectivamente, enquanto o controle apresentou 68,3 min. Os autores atribuem esse aumento da IAE e EEM até pressões intermediárias ao desdobramento das estruturas proteicas, já a redução em 600 MPa é apontada pela formação de agregados/aumento do tamanho das partículas (AHMED et al., 2018).

Wang et al. (2021), otimizaram o tratamento por HPP para melhorar as características de funcionalidade de isolados proteicos de soja visando uma aplicação em iogurtes. Os autores variaram a pressão aplicada (200, 300 e 400 MPa), o tempo de processo (10, 20 e 30 min.) e a concentração da suspensão proteica (1:4, 1:8 e 1:12). Dentre os resultados, os pesquisadores obtiveram que a capacidade de retenção de água apresentou maiores valores com a combinação de pressões de processo mais brandas (até 300 MPa), tempo de processo mais curtos (entre 10 e 20 min.) e concentrações intermediárias da solução proteica de soja (1:8). Os autores afirmam que em pressões baixas/intermediárias, a pressão causa desdobramento parcial da estrutura proteica, o que permite a formação de rede flexível pela interação entre as subunidades proteicas com água no interior, no

entanto, em alta pressão as interações proteicas se intensificam, formando agregados, o que dificulta a interação com água (WANG et al., 2021).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Para realização do projeto, adquiriu-se sementes de tremço da espécie *Lupinus albus*, também conhecido como tremço Branco de empresa especializada em sementes da cidade de Araçatuba-SP. As sementes eram da safra 2022, sendo recém colhidas na época da aquisição.

4.2. MÉTODOS

A seguir há a descrição dos métodos e processos aplicados nos grãos de tremço para a obtenção dos isolados proteicos e realização das análises de caracterização centesimal, e as tecno-funcionais.

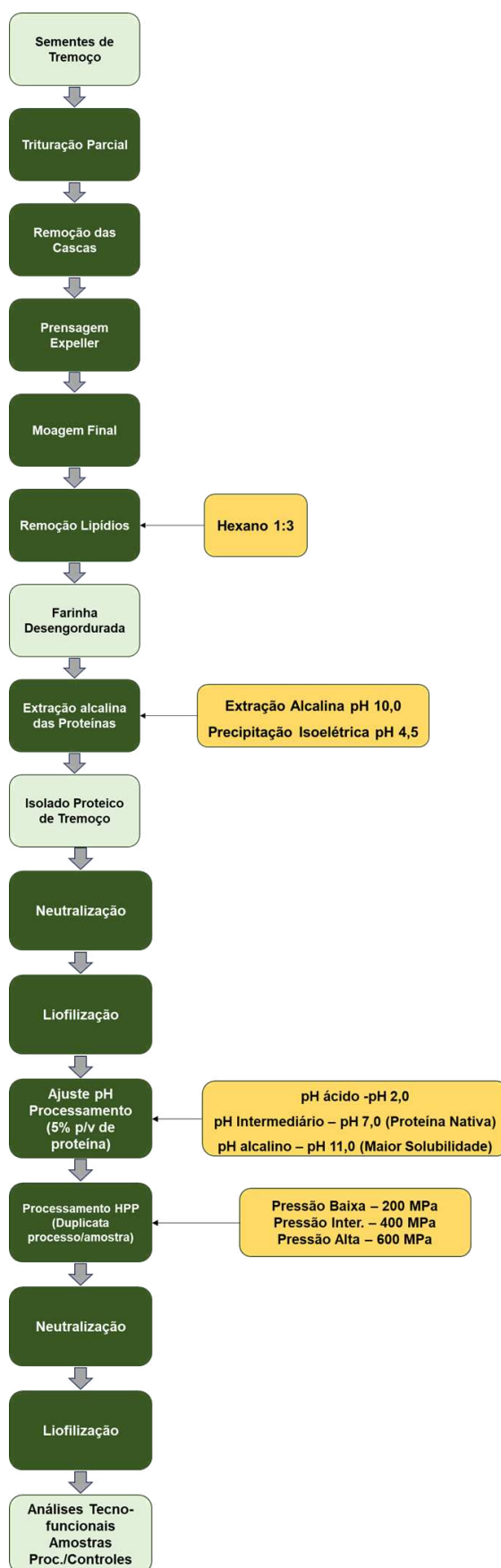


Figura 4 - Fluxograma das etapas de execução deste projeto.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor com imagens retiradas de: Miano, García, Augusto (2015).

4.2.1. Levantamento Bibliométrico

Utilizou-se a base de dados da Web of Science que foi acessada no 2º semestre de 2024. Os seguintes termos-chave e conectores foram utilizados para a pesquisa: “LUPIN*” OU “PROTEIN” E “ISOLATE” E “HPP” OU “HHP” E “pH-SHIFTING”. Além disso, aplicou-se filtros para tipo de documento para exibição apenas de artigos e/ou artigos de revisão já publicados ou em processo de publicação. Também se filtrou a área de conhecimento para: “Food Science and Technology” e realizou-se uma conferência manual dos documentos para remoção de documentos que eventualmente não atendessem os requisitos da metodologia. Após isso, os documentos foram agrupados por tema.

4.2.2. Obtenção das farinhas de tremoço

Dividiu-se o processo para a obtenção da farinha de tremoço em 3 etapas, sendo que: na primeira, triturou-se os grãos de tremoço em moinho de facas com tela circular com diâmetro de passagem de 65 mm, obtendo-se ao final uma mistura de cascas e cotilédones quebrados. Após isso, peneirou-se o material triturado em conjunto de quatro peneiras Tamis (de diâmetros de abertura: 6,35; 2,38; 1,19; 0,6 mm) para remoção das cascas. Em seguida, submeteu-se a mistura retida nas peneiras com tamanho de abertura de 2,38 e 1,19 mm a sistema de separação por diferença de densidade com uso de ar forçado adicionado ao sistema tangencialmente.

Após esta etapa, processou-se o material restante (cotilédones de tremoço com diferentes granulometrias) em equipamento tipo prensa mecânica (*Expeller*) para remoção de lipídios. Em seguida, moeu-se o material resultante em *Blender* para redução do tamanho de partícula a fim de obter a farinha de tremoço. Por fim, armazenou-se a farinha, sob refrigeração, em sacos de polietileno selados à vácuo até a realização das análises centesimais e da remoção de lipídios (etapa prévia à extração de proteínas).

4.2.3. Extração de proteínas do tremoço

Previamente à obtenção do Isolado Proteico de tremoço (IPT), realizou-se a remoção de lipídeos da farinha de tremoço. Para isso, foram realizados alguns testes para definir qual a melhor razão tremoço/solvente orgânico de modo a

otimizar tempo e quantidade de solvente. Definiu-se que a proporção de solvente orgânico (hexano) 1:3 (p/v) agitando-se constantemente por 4 horas em temperatura ambiente, seguido de repouso de 20h conforme proposto por Achouri & Boye (2013), foi a alternativa de melhor custo-benefício. (ACHOURI; BOYE, 2013).

Com o material desengordurado (FDT) iniciou-se a extração proteica. Para isso, suspendeu-se a FDT em água deionizada 1:6 (p/v) e ajustou-se o pH para 10, com NaOH 1M. A fim de solubilizar ao máximo as proteínas, fez-se a agitação da suspensão em temperatura ambiente (~23 °C) por 2 h, seguida de centrifugação por 20 minutos a 12000 g (10 °C) em centrífuga refrigerada (Allegra 25R, Beckman Coulter, USA). Após isso, descartou-se o precipitado obtido (*pellet*) e seguiu-se para a precipitação ácida do sobrenadante.

Com relação a etapa de precipitação ácida, adicionou-se HCl 1N até o pH 4,5 (valor teórico para o ponto isoelétrico da proteína de tremço) no sobrenadante. Em seguida, centrifugou-se as suspensões à 6000 RPM por 30 minutos, sendo que ao final desta etapa descartou-se o sobrenadante e fez-se a ressuspensão dos precipitados (*pellet*) com água destilada na razão 1:3 (*pellet*/água destilada), seguido de ajuste para o pH 7,0 (com adição de NaOH 1N). Por fim, utilizou-se embalagens plásticas de 15 por 25 cm para armazenamento das suspensões, as quais foram congeladas e liofilizadas. Após a liofilização, preservou-se o IPT sob armazenamento a temperatura de -15 °C em embalagens plásticas a vácuo até posterior uso (ONSAARD; POMSAMUD; AUDTUM, 2010).

4.2.4. Processamento por Alta Pressão Hidrostática (HPP)

Previamente ao processamento, os isolados foram ressuspensos a 5% (p/v) de concentração de proteínas com água destilada. Depois disso, ajustou-se o pH das suspensões para 3 condições diferentes de pH: condição ácida (pH 2,0), condição neutra (proteína no estado nativo - pH 7,0) e condição básica (ponto de maior solubilidade - pH 11,0). Após ajuste de pH acondicionou-se as suspensões em embalagens plásticas à vácuo (embalagens de polietileno).

Para o processamento por HPP do isolado proteico, utilizou-se o equipamento QFP 2L-700 (Avure Technologies, OH, USA), que possui câmara cilíndrica com capacidade de 2L. O limite operacional de pressão do equipamento é de 100.000 psi (690 MPa) e o fluido de trabalho empregado pressurizado foi água deionizada.

Submeteu-se as amostras a três condições de pressão diferentes, sendo: 200 MPa (pressão moderada), 400 MPa (pressão intermediária) e 600 MPa (pressão elevada), com o tempo de processo de 10 minutos e a temperatura do sistema de cerca de 25°C. Imediatamente após o processamento, resfriaram-se os isolados em banho de água gelada. Após isso, ajustou-se o pH das amostras processadas para o pH 7, seguido de congelamento, liofilização e armazenamento para posterior caracterização. Os experimentos foram realizados com duplicata de processo e duplicata da amostra. O controle consistiu no concentrado não processado (0,1 MPa - pressão atmosférica) sob as 3 condições de pH (2,0; 7,0 e 11,0) e de tempo (10 min). Ao todo foram caracterizadas tecno-funcionalmente 24 amostras.

4.2.5. Análise composição centesimal

Realizou-se as análises dos macronutrientes seguindo protocolo da AOAC (2005). Assim, determinaram-se os teores de umidade, proteínas e cinzas, com os carboidratos obtidos por diferença (HORWITZ, 2006). Para o cálculo de proteínas, foi empregado um fator de conversão de nitrogênio em proteína de 5,7. Para estas análises, avaliou-se o isolado proteico não processado em triplicata.

4.2.6. Análise de cor instrumental

Para a avaliação de cor, utilizou-se a medição instrumental dos isolados (antes e após processamento por HPP). O equipamento utilizado foi o colorímetro HunterLab UltraScan PRO (Hunter Associate Laboratory Inc., Reston, USA). Esta análise também foi realizada em triplicata a 25 °C, utilizando-se o iluminante D-65 com ângulo de observação de 10°. Expressou-se as medições nos parâmetros do sistema Cielab, no qual se tem a avaliação da luminosidade - L^* (variando de $L^* = 0$ preto até $L^* = 100$ branco); da cromaticidade, expressa por a^* (valores positivos de $a^* =$ vermelho e valores negativos de $a^* =$ verde) e b^* (valores positivos de $b^* =$ amarelo e valores negativos de $b^* =$ azul).

4.2.7. Avaliação das propriedades funcionais

Para a avaliação de tais propriedades realizou-se as seguintes análises:

4.2.7.1. Capacidade de retenção de óleo (CRO)

A análise do CRO seguiu conforme descrito em SILVA *et al.* (2022). Assim, pesou-se eppendorf's de 2 mL vazios, e em seguida, dispersou-se os isolados (100 mg) em 1 mL de óleo de soja, seguido de homogeneização manual até que amostra apresente aspecto homogêneo. Em seguida, agitou-se em vórtex durante 1 min e, posteriormente, foram deixadas em repouso em temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos. Centrifugaram-se as dispersões a 12000g por 20 min em temperatura ambiente. Após isso, verteu-se todo o sobrenadante que foi descartado. Com auxílio de um papel absorvente, fez-se a drenagem do sobrenadante residual ao encostá-lo na borda do microtubo. O valor em massa de óleo retido por grama de amostra foi obtido pesando-se novamente o tubo contendo o resíduo de proteína (SILVA *et al.*, 2022).

4.2.7.2. Capacidade de retenção de água (CRA)

Para as análises de CRA utilizou-se o método proposto por Rodrigues & Coelho & Carvalho (2012). Assim, realizou-se a análise de modo semelhante ao passo-a-passo detalhado no item 4.2.7.1, apenas alterando o fluido que foi adicionado para formar a dispersão, sendo para este caso água destilada (RODRIGUES; COELHO; CARVALHO, 2012).

4.2.7.3. Índice de atividade emulsificante e estabilidade emulsificante

Seguiu-se para esta avaliação o método espectrofotométrico de Saricaoglu (2020). Assim, preparou-se dispersões dos isolados após adição de 300 mg para 30 mL de água destilada (pH 7,0), seguido de agitação por 2 min à 500 rpm. A partir dessa dispersão, adicionou-se 10 ml de óleo de girassol seguido de homogeneização em Ultra-Turrax a 20000 rpm durante 1 min para formação das emulsões. Imediatamente após o preparo das emulsões, diluiu-se 50 µL destas em 10 mL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1%. Então, em espectrofotômetro a 500 nm, fez-se leitura da absorbância. Após 10 min, diluiu-se mais 50 µL da emulsão em 10 ml de SDS a 0,1% e realizou-se outra leitura (SARICAOGU, 2020). As equações (1) e (2) apresentam os parâmetros envolvidos nos cálculos de IAE e EEM.

$$IAE = \frac{2 * 2,303 * A_o * N}{10000 * L * C * \theta} \quad (1)$$

Onde: A_o é a absorbância a 500 nm medida imediatamente após o preparo; N se refere ao fator de diluição (200); θ é a proporção da fase de óleo (0,25); L é a espessura da cubeta (0,01 m); e C é a concentração da amostra proteica (g/mL).

$$EEM = \frac{A_o}{(A_o - A_{10})} * t \quad (2)$$

Onde: A_o é a absorbância a 500 nm medida imediatamente após o preparo; A_{10} se refere a absorbância a 500 nm medida 10 min após o preparo; t é o tempo (10 min).

4.2.7.4. Capacidade espumante e estabilidade espuma

Para análise da capacidade espumante, o método seguiu de acordo com o proposto por Singharaj & Onsaard (2015). As suspensões dos isolados proteicos (1% p/v, 20 mL, pH 7,0) foram homogeneizadas em Ultra-Turrax a 20000 rpm por 1 min. As suspensões então foram transferidas para uma proveta de 50 mL e o volume foi aferido. A capacidade espumante foi expressa em porcentagem de aumento do volume. Após 30 e 60 min em repouso a temperatura ambiente (25°C), o volume da espuma foi aferido novamente (SINGHARAJ; ONSAARD, 2015).

4.2.7.5. Solubilidade em água

Determinou-se a solubilidade dos isolados proteicos de acordo com a metodologia descrita por Calderón-Chiu *et al.* (2021). Inicialmente, pesou-se 20 mg de cada amostra em 8 eppendorf's. Em seguida, dissolveu-se cada eppendorf em soluções tampão (correspondentes a pHs de 2,0 a 8,0) para obtenção de uma concentração de 10 mg/mL. Então, a solução foi agitada vigorosamente por 2 min a temperatura ambiente (25°C) e em seguida deixou-se em repouso por 30 min. Por fim, centrifugou-se a 8000g por 15 min. O sobrenadante foi separado e a concentração da proteína presente nas amostras foram determinadas por Bradford (CALDERÓN-CHIU *et al.*, 2021).

4.2.8. Avaliação das propriedades estruturais

4.2.8.1. *Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)*

Para esta análise foi utilizado um espectrômetro FTIR equipado com um acessório ATR e um cristal Zn-Se que permite a coleta de espectros FTIR diretamente na amostra (Alpha-P, Bruker Optics, Milão, Itália). Os espectros FTIR foram registrados a 25 °C. Além disso, o braço de pressão do instrumento foi usado para aplicar pressão constante nas amostras posicionadas no topo do cristal Zn-Se, para garantir um bom contato entre a amostra e o feixe infravermelho incidente. A varredura de fundo do cristal Zn-Se limpo foi adquirida antes da varredura da amostra. Os espectros FTIR foram obtidos na faixa de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} em uma resolução espectral de 4 cm^{-1} e com 32 varreduras co-adicionadas usando o software OPUS (versão 7.0 para Microsoft Windows, Bruker Optics).

4.2.8.1.1. *Análise de Componente Principal (Principal Component Analysis - PCA) - FTIR*

Para realização da PCA, utilizou-se os dados dos espectros de absorção vibracional obtidos com a análise de FTIR. Empregou-se para a análise o software/ linguagem de programação Python, por meio da biblioteca Scikit learn. Esses dados foram centrados na média, seguido de pré-processamento para correção de dispersão por Variável Normal Padrão (*Standard Normal Variate* – SNV) aliado do uso de derivadas de Savitzky-Golay (SG) com 11 pontos para remoção dos efeitos aditivos e multiplicativos dos espectros (SNV+1ª derivada SG) (BRAGA, 2021).

4.2.8.2. *Hidrofobicidade de Superfície (Ho)*

A avaliação da Hidrofobicidade de Superfície seguiu metodologia descrita por Galvão *et al.* (2024) modificado. Diluiu-se as amostras em cinco concentrações diferentes de proteína, variando de 0,0004 a 0,02% (v/v) com tampão fosfato (10 mM, pH 7). Retirou-se uma alíquota de 10 μL de ANS 8 mM (1-anilina-9-naftalenossulfonato), que foi previamente preparado no mesmo tampão, e adicionou-se a tubos de ensaio com rosca de 7,5 mL de cada diluição. Cada amostra foi

analisada em triplicata. A leitura da fluorescência das amostras foi realizada em um leitor multimodo Synergy MX (Biotek Instruments Inc, Winooski, VT, EUA), sendo aferida após 15 min nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 nm e 400–650 nm, respectivamente. Devido à fotossensibilidade da sonda, a reação foi realizada no escuro. Calculou-se o valor de hidrofobicidade da superfície de cada amostra (H_0) após plotagem dos dados de intensidade de fluorescência em função da concentração proteica, seguida de obtenção do coeficiente angular, por meio de ajuste por regressão linear das curvas. Foram descontados os valores do branco e das microplacas vazias (GALVÃO et al., 2024).

4.2.8.3. *Análise de Distribuição por Tamanho de Partículas*

Para a análise de Distribuição de Tamanho de Partículas, utilizou-se metodologia descrita por Ma & Habibi & Sagis (2024) modificada. Para isso, empregou-se soluções de proteína de tremçoço à 0,5% (m/m) em tampão pH 7,0. Utilizou-se o caracterizador de nanopartículas baseado no *Dynamic Light Scattering* (DSL) Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido) com o índice de refração para a proteína de tremçoço de 1,46 e de 1,33 para o dispersante (água deionizada). Realizou-se seis medições, que consistiram em 13 varreduras por medição. Coletou-se os valores e estes foram expressos como média (MA; HABIBI; SAGIS, 2024).

4.2.9. Análise estatística

Os dados foram analisados quanto sua normalidade através do teste estatístico de Shapiro-Wilk pelo software OriginPro®. Após isso, os resultados foram submetidos à avaliação estatística, por meio da Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguido da aplicação do teste *Post-Hoc* de Tukey ao nível de 5% de significância, também com o auxílio do software OriginPro®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. LEVANTAMENTO BIBLIOMÉTRICO

A aplicação da metodologia descrita no item 4.2.1 obteve como resultados um total de 8923 documentos sem aplicar os filtros de tipo de documento e área do

conhecimento. Com o uso destes filtros, tem-se um total de 650 documentos. Após etapa de análise dos temas dos artigos, estes foram agrupados em 13 temas principais. A Tabela 2 a seguir apresenta o resultado após agrupamento dos artigos por tema.

Tabela 2: Levantamento bibliométrico.

Temas	Quantidade	Percentual
Atividade Biológica (peptídeos bioativos, hidrolisados, hipoglicêmico, colesterol, etc.)	138	21,23%
Comparação com outras fontes vegetais, animais	78	12,00%
Panificados/Massas alimentícias sem Glúten/Snacks	69	10,62%
Rafinose	50	7,69%
Estrutura (Conglutinas, albuminas, análises estruturais, etc.)	49	7,54%
Propriedades Tecnológicas (Emulsão, Espuma, CRA, etc.)	48	7,38%
Remoção de Alcaloides/Lipídios	45	6,92%
Extração Proteínas (Rendimento, Técnicas, etc.)	37	5,69%
Fermentação (Bactérias/Fungos)	16	2,46%
Gels	11	1,69%
Tec. Emergentes (HPP, HPO, Ultrassom, Campo elétrico pulsado, outras)	9	1,38%
Germinação	9	1,38%
Outros	91	14,00%
Total	650	100,00%

5.2. CARACTERIZAÇÃO CENTESIMAL E RENDIMENTO DE PROTEÍNAS

A análise dos macronutrientes presentes na farinha integral de tremçoço (FIT), bem como na farinha desengordurada de tremçoço (FDT) e no isolado proteico de tremçoço (IPT) estão dispostos na Tabela 3, a seguir.

Tabela 3: Valores obtidos para a composição centesimal.

Amostra	Teor Proteico (% b.s.)	Cinzas (% b.s.)	Lipídios (% b.s.)	Carboidratos (% b.s.) *	Umidade (% b.u.)
FIT	42,13 ± 1,66*10 ^{-2b}	2,49 ± 1,03*10 ^{-4c}	12,21 ± 5,89*10 ^{-4a}	44,21 ± 1,55*10 ^{-2b}	6,81 ± 3,08*10 ^{-3b}
FDT	44,43 ± 3,62*10 ^{-3b}	2,67 ± 9,73*10 ^{-5b}	3,56 ± 2,45*10 ^{-3b}	49,54 ± 7,14*10 ^{-3a}	7,28 ± 1,21*10 ^{-3a}
IPT	86,21 ± 2,95*10 ^{-3a}	3,46 ± 1,08*10 ^{-4a}	0,55 ± 9,96*10 ^{-6c}	10,15 ± 3,98*10 ^{-3c}	6,1 ± 1,23*10 ^{-3c}

Onde: Dados são expressos por médias ± desvio padrão. Para a análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras que apresentam letras diferentes na mesma coluna pelo teste *post hoc* de Tukey. Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

* Carboidratos obtidos por diferença

Analisando os dados obtidos na Tabela 2 com a literatura, a amostra de farinha integral de tremço obteve valores similares de proteínas ($43,20 \pm 0,86$ %) e cinzas ($3,28 \pm 0,08$ %), enquanto que o teor de lipídios ($8,41 \pm 0,05$ %) foi maior e a umidade ($8,99 \pm 0,42$ % b.u.) e os carboidratos ($45,12 \pm 0,11$ %) foram menores (TIZAZU; EMIRE, 2010).

Para a farinha desengordurada de tremço, o teor de proteínas foi comparável aos da literatura que informa valores entre 40 a 50% (VOGELSANG-O'DWYER et al., 2020). Nahimana e colaboradores (2023) obtiveram $47,84 \pm 0,28$ % de proteínas, valor similar ao obtido neste trabalho. Para os demais macronutrientes, o teor de lipídios (8,9%) foi menor que o da literatura, já o teor de cinzas ($1,9 \pm 0,11$ %) e de carboidratos ($33,1 \pm 2,50$ %) foi maior, no entanto, essas diferenças podem ser atribuídas por a amostra analisada por Carvajal-Larenas e colaboradores (2014) não ter os lipídios extraídos.

Quanto ao Isolado Proteico de tremço, o teor de proteínas obtido para o isolado proteico foi um pouco menor ao de Vogsang-O'Dwyer *et al.* (2020), que obteve 94,4%. Estes pesquisadores obtiveram valores de umidade (3,81%), lipídios (1,07%), e cinzas (4,4%). Essas diferenças podem ser atribuídas às diferenças entre os processos para obtenção dos isolados proteicos. Enquanto que etapa de extração de lipídios dos pesquisadores utilizou CO₂ supercrítico em período não explicitado, a extração deste trabalho envolveu o uso de prensa hidráulica seguido de extração por contato com solventes orgânicos durante 24 h. Para a extração proteica, este projeto seguiu a abordagem de extração por solubilização em pH alcalino, seguido de precipitação em ponto isoelétrico. Enquanto isso, os autores reduziram o pH a 4,5 para separação de substâncias de baixo peso molecular (alcaloides, oligossacarídeos, entre outros) dos compostos de alto peso molecular (proteínas e fibras) presentes no *pellet*. Em seguida, em pH neutro foi retirada as fibras residuais e por fim foi realizada a precipitação em pH 4,5 (VOGELSANG-O'DWYER et al., 2020).

Em relação ao rendimento de extração das proteínas, obteve-se $45,716 \pm 0,008$ %. Comparando-se com a literatura, este valor está ligeiramente acima do encontrado por Nahimana *et al.* (2023) que obteve valores entre 30 e 40% para amostras de tremço. Comparado a outras leguminosas, como o feijão moyashi, feijão caupi e Horse Gram (uma leguminosa típica do sul da Ásia); que obtiveram

valores por volta de 60% o rendimento foi inferior (PENCHALARAJU; JOHN DON BOSCO, 2022).

5.3. ANÁLISE DE COR INSTRUMENTAL

A análise da cor dos alimentos pela indústria faz-se importante, pois ela contribui, significativamente, na aparência global do produto e os consumidores a utilizam para a tomada de decisão de compra e ou consumo (HUTCHINGS; RONNIER LUO; JI, 2013; MACDOUGALL, 2003). Para medição da cor instrumental há o sistema espacial uniforme de cor CIELAB, que utiliza 3 componentes para quantificar a cor da amostra, sendo: Luminosidade (L^*), que varia de 0 (preto) a 100 (branco); coordenada vermelho-verde (a^*), que pode assumir valores negativos (verde) e positivos (vermelho); e coordenada amarelo-azul (b^*), que pode assumir valores negativos (azul) e positivos (amarelo).

A partir das 3 componentes de cor é possível avaliar a diferença entre a coloração de uma amostra para outra por meio da diferença de cor (ΔE) expressa na equação (3), a seguir:

$$\Delta E_{Lab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3)$$

Com a aplicação deste equacionamento, encontra-se na literatura algumas conclusões a respeito dos valores de ΔE obtidos entre amostras. A Tabela 4 a seguir apresenta essas conclusões relacionadas a percepção humana.

Tabela 4: Tabela de gradação da diferença de cor.

Intervalo de ΔE	Percepção Humana
$0 < \Delta E < 1$	Observador Não nota diferença
$1 < \Delta E < 2$	Somente observador treinado nota diferença
$2 < \Delta E < 3,5$	Observador não treinado também nota diferença
$3,5 < \Delta E < 5$	Diferença de cor é claramente notável
$5 < \Delta E$	Observador nota 2 cores diferentes

Adaptado de: Mokrzycki; Tatol (2014).

A seguir a Tabela 5 apresenta os resultados para cor instrumental das amostras processadas por HPP combinado com mudança de pH e do controle. Na Figura 5, há uma representação da localização espacial das amostras analisadas e na Figura 6 há os resultados de aspecto visual das amostras obtidos do *software online Colorizer*.

Tabela 5: Parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e ΔE das amostras de isolado proteico de tremçoço.

Amostra		L^*	a^*	b^*	ΔE
pH 2,0	Controle	$75,66 \pm 0,01^d$	$4,99 \pm 0,03^b$	$23,24 \pm 0,04^a$	-
	200 MPa	$72,51 \pm 0,01^i$	$5,13 \pm 0,02^a$	$23,07 \pm 0,02^b$	3,16
	400 MPa	$71,54 \pm 0,01^k$	$4,13 \pm 0,02^d$	$22,61 \pm 0,03^d$	4,26
	600 MPa	$70,93 \pm 0,005^j$	$4,25 \pm 0,03^c$	$21,41 \pm 0,03^g$	5,11
pH 7,0	Controle	$78,68 \pm 0,005^a$	$3,79 \pm 0,01^f$	$21,54 \pm 0,03^f$	-
	200 MPa	$75,88 \pm 0,02^c$	$4,01 \pm 0,03^e$	$20,05 \pm 0,02^k$	3,22
	400 MPa	$72,37 \pm 0,02^j$	$3,97 \pm 0,02^e$	$20,82 \pm 0,03^h$	6,36
	600 MPa	$74,88 \pm 0,02^g$	$3,24 \pm 0,05^h$	$20,68 \pm 0,02^i$	3,94
pH 11,0	Controle	$76,34 \pm 0,01^b$	$2,04 \pm 0,03^k$	$21,50 \pm 0,03^f$	-
	200 MPa	$73,22 \pm 0,01^h$	$3,33 \pm 0,04^g$	$22,92 \pm 0,03^c$	3,67
	400 MPa	$75,57 \pm 0,01^f$	$2,79 \pm 0,01^i$	$22,54 \pm 0,03^e$	1,52
	600 MPa	$75,62 \pm 0,02^e$	$2,34 \pm 0,02^j$	$20,57 \pm 0,03^j$	1,21

Onde: Dados são expressos por médias $\pm$ desvio padrão. Para a análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras que apresentam letras diferentes na mesma coluna pelo teste *post hoc* de Tukey. Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Da análise da Tabela 5 pôde-se observar que para o parâmetro L^* , as amostras do controle nos 3 pHs de processamento possuem diferença significativa ($p < 0,05$) em relação as processadas por HPP, sendo que os controles possuem os maiores valor de L^* . Assim, o processamento por HPP tornou as amostras mais escuras.

Para o parâmetro a^* , no pH 2,0 de processamento, o maior valor foi a 200 MPa ($5,13 \pm 0,02$) e diferiu estatisticamente ($p < 0,05$). Já para o pH 7,0 de processamento o ponto máximo também foi a 200 MPa ($4,01 \pm 0,03$), no entanto, não houve diferença estatística para a amostra 400 MPa ($3,97 \pm 0,02$). Por fim, o pH 11,0 de processamento, apresentou o menor conjunto de valores entre os pH analisados, ou seja, as amostras nas 3 pressões e no controle apresentaram tonalidade levemente mais esverdeada. O maior valor de a^* no pH 11,0 foi a 200 MPa ($3,33 \pm 0,04$) e diferiu significativamente para as demais amostras.

Em relação à diferença de cor (ΔE), o pH 2,0 de processo apresentou a maior diferença em 600 MPa (5,11) seguido do 400 MPa (4,26) e do 200 MPa (3,16), sendo classificados, respectivamente: observador nota 2 cores; uma diferença muito clara; observador não treinado nota diferença. Para o pH 7,0 de processo, em 400 MPa (6,36) foi o maior valor (incluindo as amostras nos demais pHs), seguido do valor em 600 MPa (3,94) e por fim em 200 MPa (3,22). Assim, são classificados, respectivamente: observador nota 2 cores; diferença de cor é notável; e observador não treinado nota diferença. E para o pH 11,0 de processo, em 200 MPa (3,67) foi a maior diferença sendo classificada como: diferença de cor é notável. Já para 400 MPa (1,52) e 600 MPa (1,21), apenas um observador treinado é capaz de notar a diferença entre amostras, conforme pode ser visualizado na Figura 6.

Observa-se pela Tabela 5, o escurecimento das amostras conforme aplicou-se alta pressão. Uma possibilidade é relacionada as modificações nos pigmentos (clorofilas, carotenoides, etc.). Para as clorofilas, estas estão presentes nos cotilédones de tremoço em teor de 100 ppm por cotilédone (MOORE; BENTLEY; LOVELL, 1972). Conforme apurou-se na literatura, o HPP tem efeito limitado na atuação direta sobre pigmentos pela compressibilidade das ligações covalentes serem insignificantes (MEDINA-MEZA et al., 2015; TIWARI et al., 2024). No entanto, há diversos estudos evidenciando o impacto do HPP na porosidade celular e, conseqüentemente, na extração de pigmentos. Medina-Meza e colaboradores (2015), em estudo aplicação de HPP (400, 500 e 650 MPa; 5 e 10 min) em molho de espinafre com base óleo, observou aumento de 56% no teor de clorofilas na amostra a 400 MPa e 5 min frente ao controle. Assim, diante dos dados da literatura aliado as observações para o parâmetro a^* das amostras de isolado proteico, supôs-se que o aumento da extração das clorofilas com a pressão justificaria o aumento do valor do parâmetro a^* .

Com relação aos carotenoides, que são encontrados nas sementes integrais de tremoço em teor de 36 ppm, há na literatura estudos que observaram destruição dos carotenoides com o tratamento por HPP (MOHAMED; RAYAS-DUARTE, 1995). Pilar Cano e colaboradores (2019), em estudo sobre o efeito do HPP (200 MPa por 6 min e $T_{proc} \sim 25^\circ C$) em pedaços de caqui, observou que o conteúdo total de carotenoides reduziu 22% com aplicação do tratamento por HPP frente ao controle (PILAR CANO et al., 2019). Além disso, Stinco e colaboradores

(2019), em estudo sobre o efeito do HPP (300, 450 e 600 MPa por 5 min e 22°C) em suco de cenoura, obtiveram redução da concentração de carotenoides, sendo de 40% na condição a 300 MPa para a maior redução e a menor redução de 25% para o tratamento a 600 MPa (STINCO et al., 2019). Assim, diante dos dados da literatura e dos dados observados para o parâmetro b^* que de modo geral sofreu redução com o tratamento por alta pressão, supôs-se que também houve a destruição dos carotenoides para os isolados proteicos de tremoço.

Por fim, outra possibilidade é em relação aos compostos fenólicos, os quais o tremoço branco possui identificados e quantificados 7 compostos, a saber: Ácido elágico, Apigenina, Miricetina, ácido clorogênico, hesperidina, quercetina, ácido cafeico (CAMMILLERI et al., 2024). Conforme estudos anteriores, o uso do HPP pode favorecer extração dos compostos fenólicos de dentro das células pela ruptura destas, e com isso, justificaria a mudança dos parâmetros de cor (GUO et al., 2024). Stübler e colaboradores (2020), em estudo que avaliou polifenóis em mix de sucos de morango e couve processados por tratamento térmico (72°C, 1 min), Campo Elétrico Pulsado (11.9 kV/cm) e HPP (600 MPa, 1 min), observaram aumento do teor de antocianinas quanto para a amostra contendo apenas morango como o mix de morango com couve, sendo que para este houve os maiores aumentos (de 36% a 96%) (STÜBLER et al., 2020). Além disso, outra explicação para mudança de cor é relacionada a possibilidade de o HPP induzir a biossíntese de compostos fenólicos. Szczepańska e colaboradores (2020), em estudo com suco de cenoura submetido à HPP (300 MPa em 3 pulsos e 15 min; 450, 600 MPa e 5 min), fez a detecção de compostos polifenólicos que não estavam presentes na amostra controle, bem como estes compostos aumentaram seu teor conforme aumentou-se a pressão. Os autores observaram redução dos parâmetros a^* e b^* conforme aumentou-se a pressão (SZCZEPAŃSKA et al., 2020). De modo similar as amostras de isolado proteico de tremoço também apresentaram redução dos parâmetros a^* e b^* .

Em resumo, as alterações de cor ocorridas com a aplicação combinada de HPP e mudança de pH podem ser resultado da destruição de carotenoides, do aumento na eficiência de extração de clorofilas/compostos polifenólicos ou o HPP pode ter induzido a formação de novos compostos fenólicos que impactaram na cor.

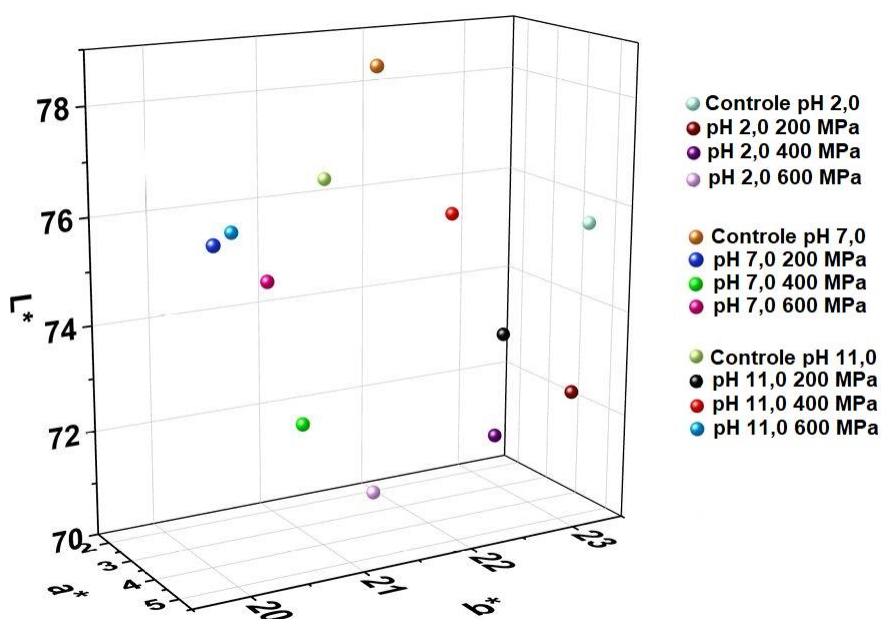


Figura 5 - Representação esquemática posicionamento amostras no sistema L^* , a^* , b^* .



Onde: Obeve-se as cores com por meio da entrada dos valores dos parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) com auxílio do software Colorizer.

Figura 6 - Aspecto visual das amostras de tremço submetidas à HPP combinado a mudança de pH.

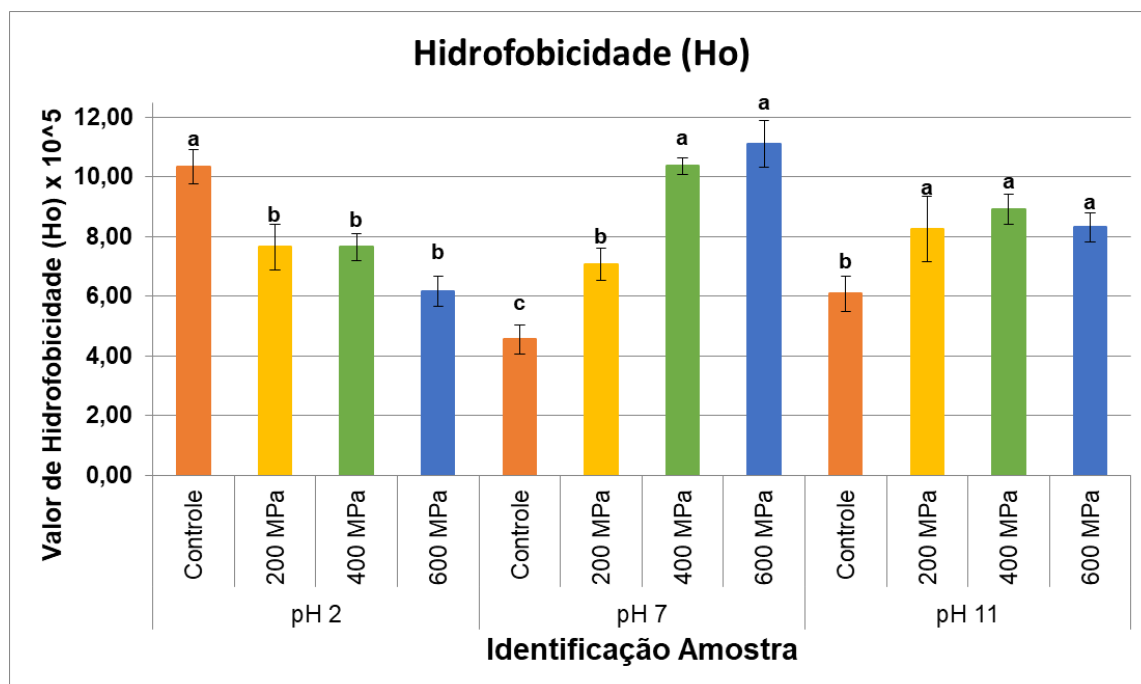
5.4. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

5.4.1. Hidrofobicidade Superficial (H_o)

A Hidrofobicidade Superficial é caracterizada pela capacidade de quantificar resíduos de aminoácidos hidrofóbicos que estão expostos na superfície das proteínas (DNYANESHWAR PATIL et al., 2024). Essa avaliação é importante, pois ela determina a capacidade de interação entre a proteína e solvente (que no caso dos alimentos, geralmente é a água). Como a interação entre água (polar) com os resíduos hidrofóbicos das proteínas é desfavorável, há a promoção de fortes interações entre moléculas de água (no lado do solvente), enquanto que há o favorecimento de várias interações inter e intramoleculares não covalentes nas proteínas, como: interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou interações de Van der Waals. Assim, há a formação de núcleos e aglomerados, em processo conhecido por Efeito Hidrofóbico (PIMENTEL, 2015; TANG et al., 2021a).

Por isso, é importante quantificar como é o equilíbrio entre grupos carregados e os grupos apolares na superfície da proteína por meio da análise de Hidrofobicidade, pois refletem como estão as estruturas terciárias e quaternárias desta e acabam afetando na tecno-funcionalidade da proteína (MULLA; SUBRAMANIAN; DAR, 2022).

A Figura 7, a seguir apresenta os valores de hidrofobicidade das amostras de isolado de tremço nos 3 pHs de processamento (2,0; 7,0 e 11,0) e nas 3 pressões (200, 400 e 600 MPa) além dos respectivos controles.



Onde: Para a análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras que apresentam letras diferentes na mesma coluna pelo teste post hoc de Tukey. Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 7 - Hidrofobicidade das amostras avaliadas.

Da análise da Figura 7, obteve-se que no pH 2,0 de processo, houve uma redução significativa no valor de hidrofobicidade para as 3 pressões avaliadas em relação ao controle, no entanto, entre as 3 pressões não houve diferença significativa. Já para os pHs 7,0 e 11,0 de processo, o comportamento das amostras apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) da hidrofobicidade frente a respectiva amostra controle. No caso do pH 7,0, as pressões de 400 e 600 MPa apresentam os maiores valores dentre as amostras analisadas (incluindo o controle no pH 2,0), mas não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre si. Já para o pH 11,0 de processo, as 3 pressões não diferiram estatisticamente dentre si.

Analisando o efeito da aplicação de pressão por HPP, no pH 2,0 de processo, houve uma redução da hidrofobicidade. Esse resultado pode ser associado ao fato de que, em pH extremo, há o desdobramento das proteínas, que aliado ao HPP ocasionou a indução de agregação das proteínas. Com isso, há formação de agregados de alto peso molecular, os quais são formados buscando uma conformação de maior estabilidade, ou seja, ocultando os resíduos hidrofóbicos do contato com a água, o que resulta na redução da hidrofobicidade superficial (LUO et al., 2022; TANG et al., 2021b; TANG; YING; SHI, 2021).

Para os pHs 7,0 e 11,0 de processo, o aumento da hidrofobicidade pode estar relacionado ao aumento de pressão. As altas pressões ocasionam mudanças na estrutura quaternária das proteínas (como a dissociação de agregados) e conforme o processo se estende, há a modificação das estruturas terciárias (DENG et al., 2025; GUO et al., 2020). Essa alteração conformacional resulta na exposição de grupos hidrofóbicos que estavam oclusos dentro da estrutura nativa da proteína. XU et al., (2024), em trabalho que avaliou o efeito do HPP em isolados proteicos de grão de bico em pH 7,0 e empregando 3 pressões (150, 300 e 450 MPa) combinado com 2 tempos de processo (10 e 20 min), também observou esse comportamento da hidrofobicidade. De modo similar, DENG et al., (2025) obteve o mesmo comportamento da hidrofobicidade para amostras de isolado proteico de semente de pimenta submetida em HPP em pHs 7,0 e 9,0 combinados com 5 pressões (100, 200, 300, 400 e 500 MPa) (DENG et al., 2025; XU et al., 2024).

Avaliando o efeito isolado do pH nas amostras, por meio da comparação entre os controles nos 3 pHs, nota-se que o pH-*shifting* provocou alteração na hidrofobicidade. O controle pH 2,0 de processo obteve o maior valor dentre os controles, seguido do controle no pH 11,0 de processo e por fim o controle no pH 7,0 apresentou o menor valor. Essas mudanças, podem ser explicadas pelo fato de que o pH-*shifting* utilizado em condições extremas (pH alcalino – 11,0 e pH ácido – 2,0) ocasiona a mudança no equilíbrio das cargas presentes nos grupos ácido carboxílico e amino das proteínas. A presença de cargas negativas ou positivas interagindo entre si produz repulsão entre os grupos, o que favorece a formação de estruturas desdobradas. Caso o pH do meio seja ajustado para o neutro, as estruturas se modificam novamente para estruturas enoveladas, pois há a redução da repulsão eletrostática (TANG; YING; SHI, 2021).

De modo geral, a mudança de pH, avaliada isoladamente, ocasionou aumento da hidrofobicidade. Já a avaliando o efeito combinado de HPP com mudança de pH, o aumento da pressão resultou em aumento da hidrofobicidade nos pHs 7,0 e 11,0, enquanto que no pH 2,0 a hidrofobicidade diminuiu.

5.4.2. FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

A análise de FTIR tem sua importância na caracterização estrutural de proteínas, pois a obtenção dos espectros vibracionais de absorção permite estimar

qualitativamente e quantitativamente as estruturas secundárias presentes nas proteínas estudadas (SHEVKANI et al., 2019). Essa técnica permite avaliar regiões específicas das proteínas como: Amida A (3300 cm^{-1}), Amida I ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$), Amida II (1540 cm^{-1}) e Amida III ($1330\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$) (RODRIGUEZ-SAONA; AYVAZ; WEHLING, 2017). Dentre as diferentes bandas que podem ser analisadas, a região da Amida I se destaca por apresentar a maior sensibilidade para as estruturas secundárias, pois é resultado da vibração de alongamento do grupo carbonila (C=O) presente no esqueleto do peptídeo. Em função da geometria molecular única e do padrão de ligações de hidrogênio, há variação na frequência de vibração, que resulta na identificação das diversas estruturas secundárias. A Tabela 6, a seguir, apresenta as estruturas mais frequentes em proteínas vegetais.

Tabela 6: Correlação de estruturas secundárias presentes na banda Amida I.

Frequência (cm^{-1})	Componente da estrutura secundária
1610-1615	Agregados e cadeias laterais aminoácidos
1618-1623	Beta-Folha Antiparalela
1629-1633	Beta-Fita
1630-1638	Beta-Folha
1643-1645	Bobinas Aleatórias
1650-1660	Alfa-Hélice
1660-1680	Beta-Volta
1680-1688	Beta-Folha Antiparalela
1690-1695	Agregados e cadeias laterais aminoácidos

Adaptado de: Shevkani *et al.* (2019).

Para obtenção das quantidades de cada estrutura secundária é necessário realizar a deconvolução dos espectros na região de $1600\text{ a }1700\text{ cm}^{-1}$. As Figuras 8 a 10, a seguir, mostram os espectros completos de FTIR das amostras de isolado proteico de tremoço. As Figuras 11, 12 e 13, apresentam os espectros médios obtidos após deconvolução dos dados na região da Amida I.

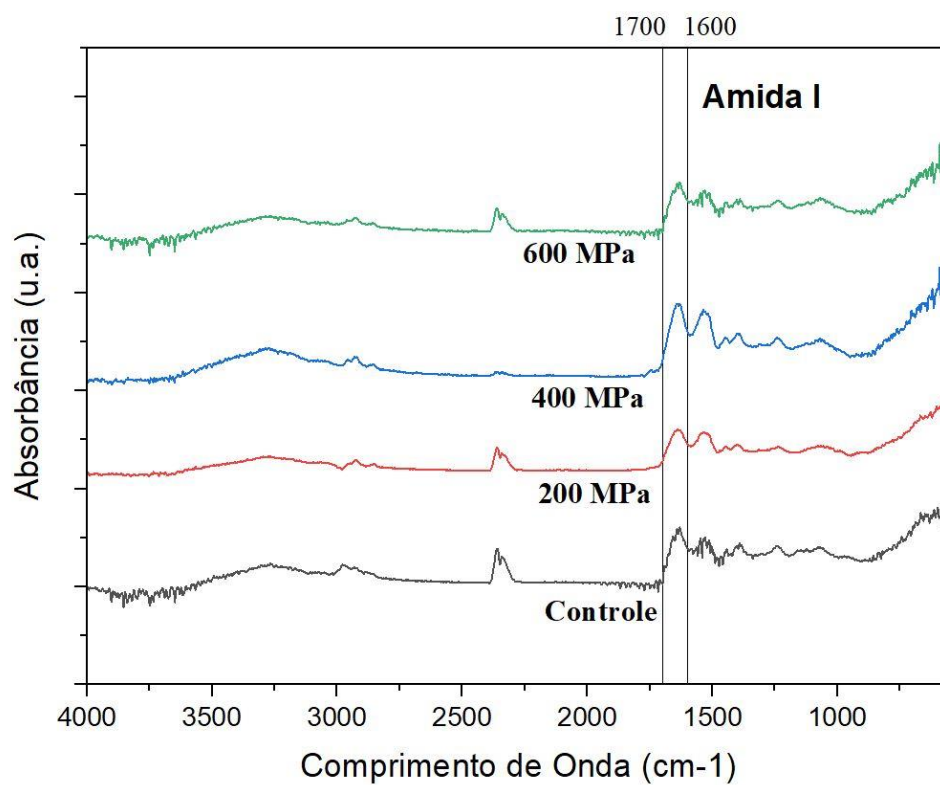


Figura 8 - Espectros de FTIR das amostras de isolado proteico de tremoço processadas em pH 2,0.

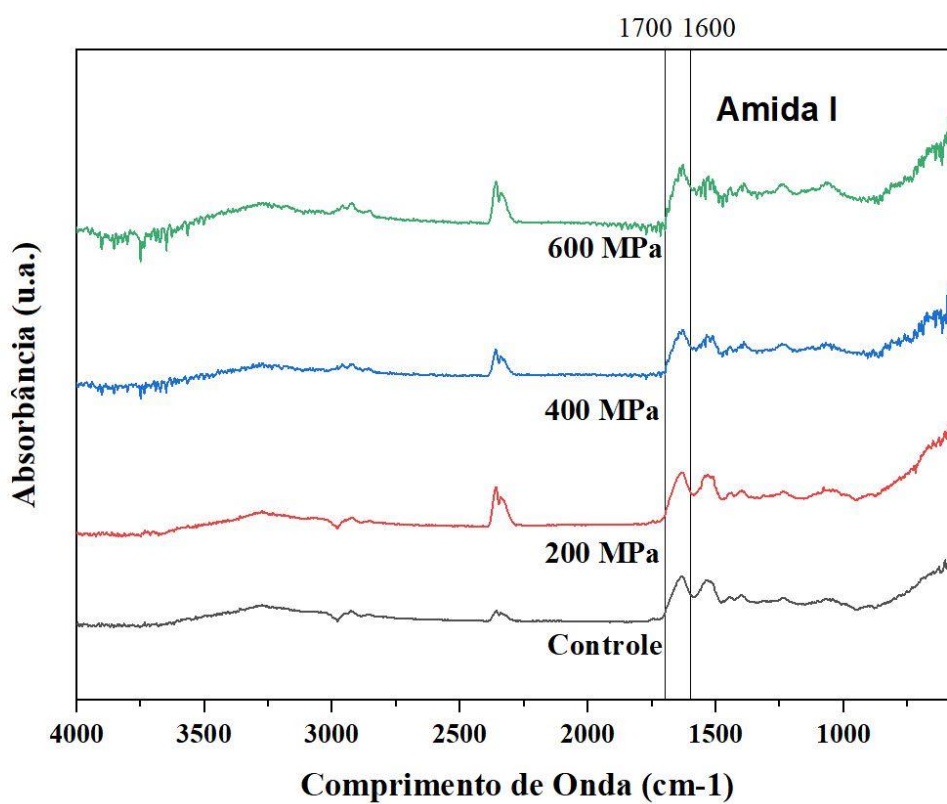


Figura 9 - Espectros de FTIR das amostras de isolado proteico de tremoço processadas em pH 7,0.

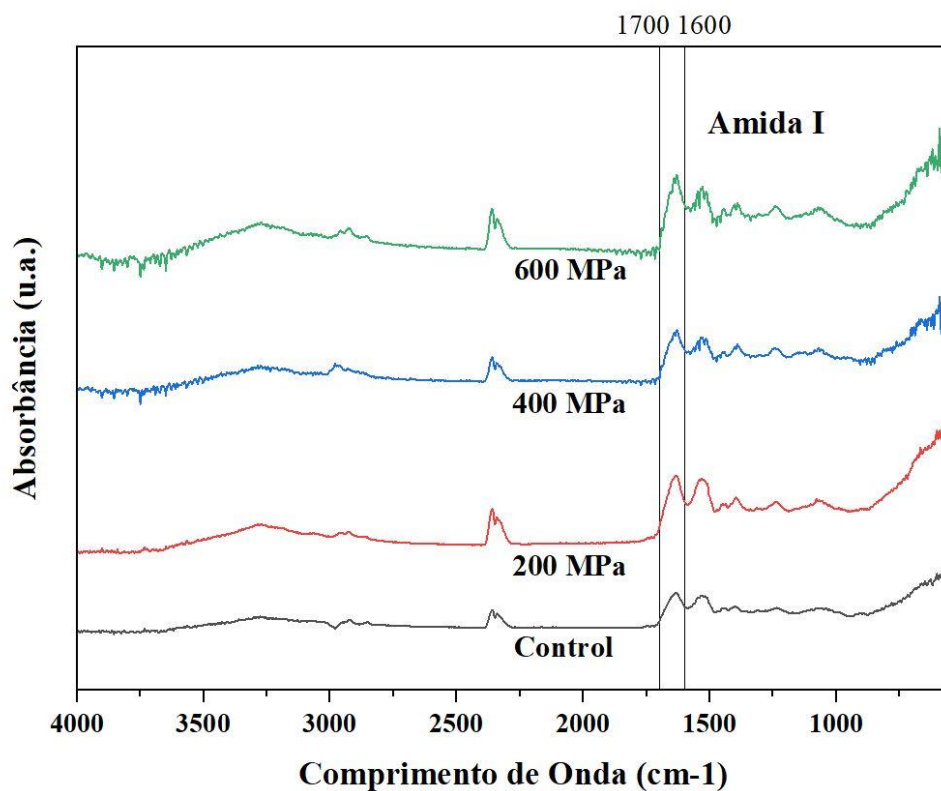


Figura 10 - Espectros de FTIR das amostras de isolado proteico de tremço processadas em pH 11,0.

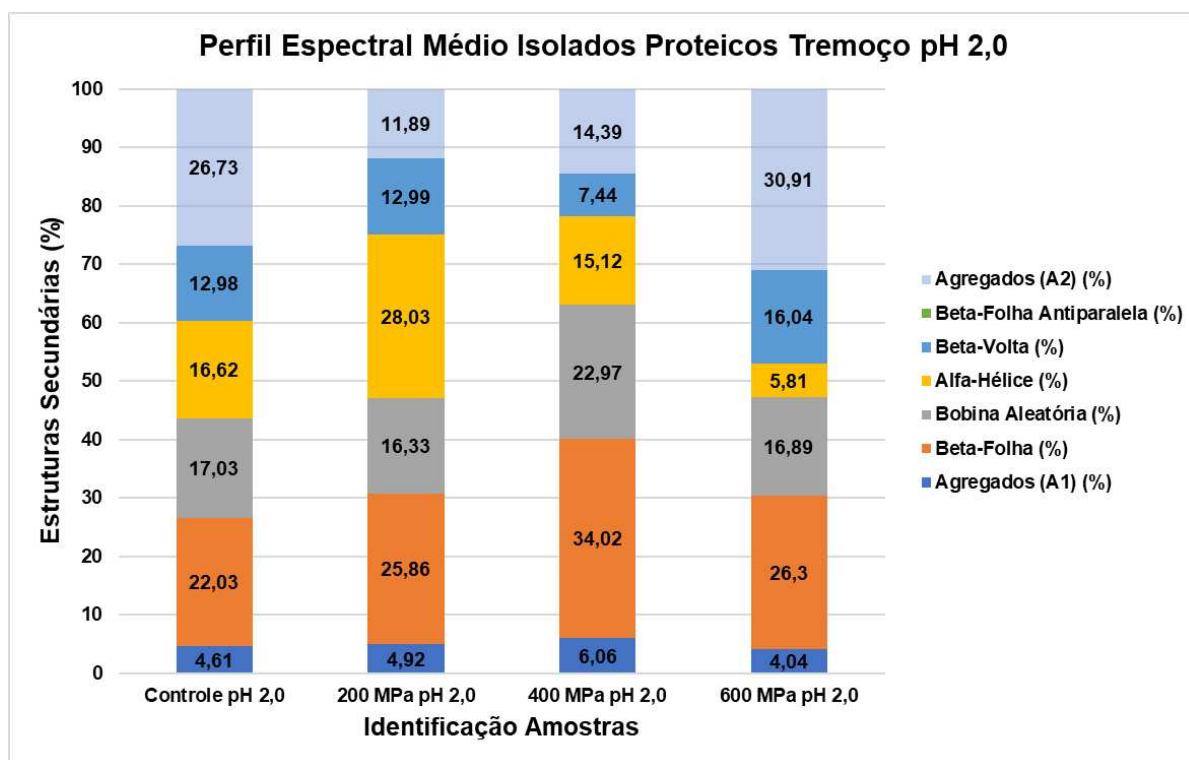


Figura 11 - Perfil espectral médio dos isolados proteicos processados em pH 2,0.

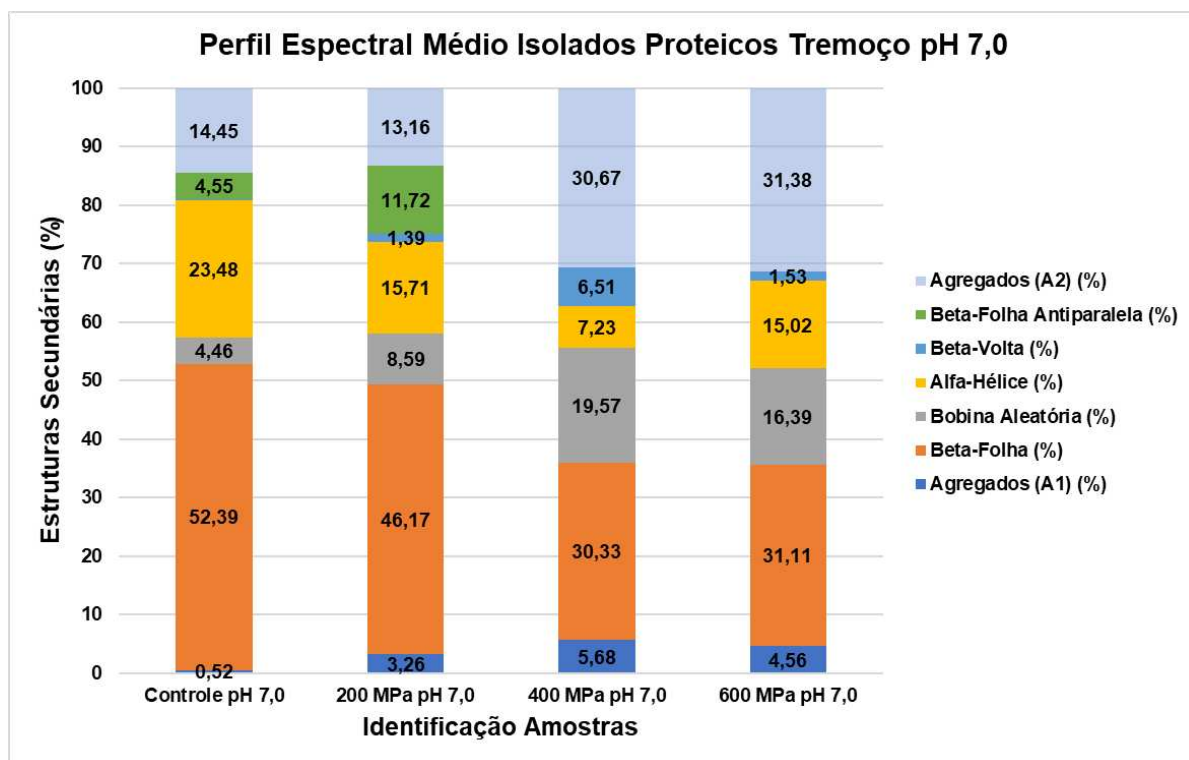


Figura 12 - Perfil espectral médio dos isolados proteicos processados em pH 7,0.

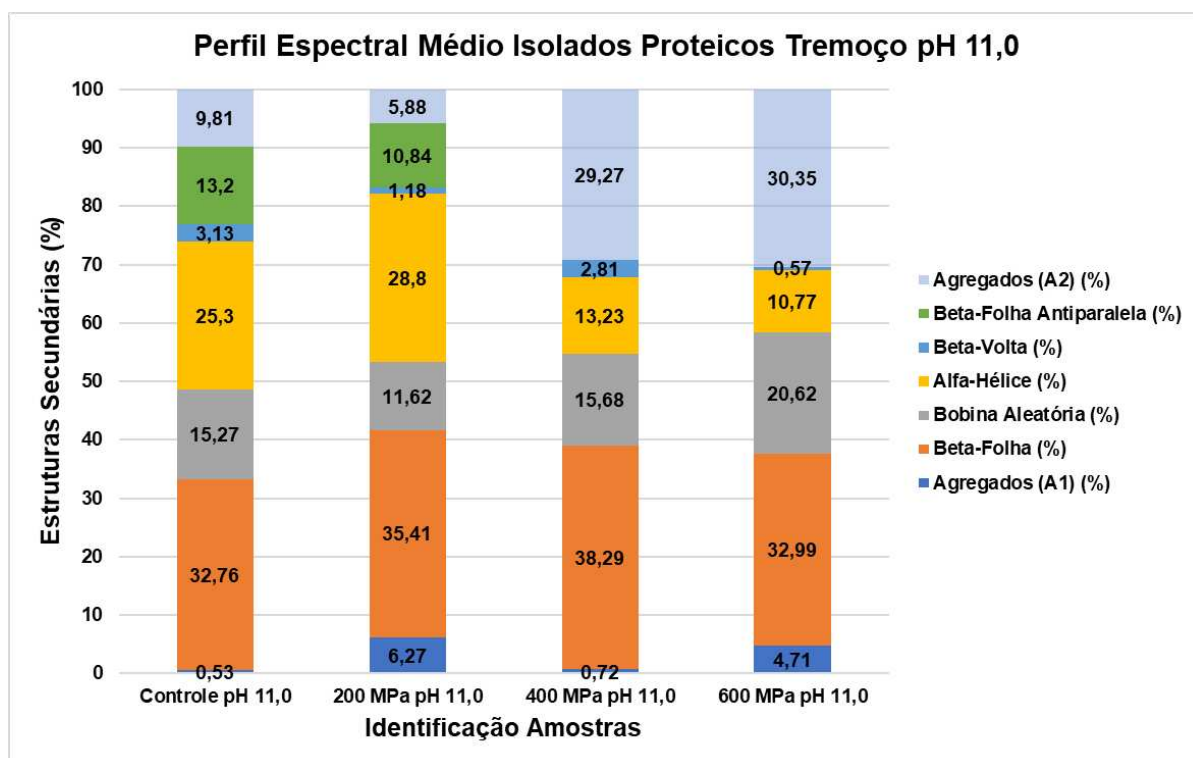


Figura 13 - Perfil espectral médio dos isolados proteicos processados em pH 11,0.

A partir da análise do perfil espectral médio, expresso nas Figuras 11, 12 e 13, pôde-se perceber que todas as amostras de isolado proteico (controles e processadas por HPP) apresentaram a maior contribuição percentual de estruturas do tipo β (β -folhas, β -voltas, β -fitas). As β -folhas foram as de maior ocorrência entre os componentes β , sendo que esta variou de 22,03% para o controle em pH 2,0 de processo até 46,17% para 200 MPa e pH 7,0 de processo. Este resultado está em conformidade com o descrito na literatura para proteínas vegetais, as quais apresentam além da grande contribuição de componentes β e uma proporção relativamente baixa de estruturas α -hélice (SHEVKANI et al., 2019).

Analisando o efeito isolado do pH de processo, tem-se a Tabela 7, a seguir, com os valores das estruturas presentes nas amostras controle pH 2,0; 7,0 e 11,0.

Tabela 7: Composição de Estruturas Secundárias Controle pHs 2,0; 7,0 e 11,0.

Amostra	Agregados (A1) (%)	Beta-Folha (%)	Bobina Aleatória (%)	Alfa-Hélice (%)	Beta-Volta (%)	Beta-Folha Antiparalela (%)	Agregados (A2) (%)
Controle pH 2,0	4,61	22,03	17,03	16,62	12,98	0	26,73
Controle pH 7,0	0,52	52,39	4,46	23,48	0,17	4,55	14,45
Controle pH 11,0	0,53	32,76	15,27	25,3	3,13	13,2	9,81

Pela Tabela 7 observa-se que houve mudança na composição de estruturas em função do pH-*shifting*. Comparando a amostra em pH 7,0 com a em pH 2,0 de processo, a redução de pH resultou em aumento da quantidade de agregados (A1 e A2), além das estruturas de bobinas aleatórias e de β -volta, enquanto que estruturas de α -hélice, β -folhas e β -folhas antiparalelas reduziram. Comparando também o pH 7,0 com o 11,0 de processo, obteve-se com o aumento do pH a manutenção da quantidade de agregados A1 e a redução dos agregados A2. Também ocorreu aumento da quantidade de estruturas de bobinas aleatórias, β -volta e β -folhas antiparalelas. Já as β -folhas reduziram e as α -hélices se mantiveram estáveis.

Essas mudanças provocadas pelo emprego da técnica do pH-*shifting* são resultado da alteração na carga líquida da proteína. Quando a proteína está em

solução com pH abaixo do PI, a carga líquida da proteína passa a ser positiva, pois há a protonação dos grupos amino ($-\text{NH}_2$). Já em pH acima do PI, a carga líquida é negativa pela desprotonação dos grupos ácido carboxílico ($-\text{COOH}$). Como consequência da presença de uma carga líquida diferente de zero, há o estabelecimento de uma repulsão eletrostática entre as partes carregadas das proteínas, e isso resulta em um desdobramento da estrutura proteica. Ao retornar à solução para pH 7,0, que é uma condição de menor repulsão eletrostática, há um reenovelamento da estrutura proteica (JIANG; WANG; XIONG, 2018).

Estes resultados estão em conformidade com a literatura, onde Yan e colaboradores, em estudo que avaliou o efeito do pH-*shifting* (em pH 2,0; 7,0 e 12,0) em amostras de isolado de soja. Os autores observaram que os conteúdos de α -hélices e β -folhas foram reduzidos nos pHs 2,0 e 12,0 em relação ao controle (pH 7,0), já o conteúdo de β -voltas e Bobinas aleatórias aumentou. A condição em pH 12,0 resultou em maiores reduções de α -hélices e β -folhas do que em pH 2,0. Os autores atribuem como consequência da redução de α -hélices uma maior flexibilidade estrutural das proteínas (YAN et al., 2021). De modo similar, Yan e colaboradores (2023), avaliaram amostras de feijão vermelho submetidas ao pH-*shifting* (2,0 e 12,0) seguido de retorno a neutralidade. Os autores observaram aumento na quantidade de Bobinas aleatórias, o que eles atribuem como consequência de uma estrutura mais esticada e desordenada. Eles apontam que a redução nas α -hélices se relaciona as ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, enquanto que o aumento das β -folhas se relaciona as interações hidrofóbicas (YAN et al., 2023).

Com relação ao efeito da aplicação do HPP nas amostras, para os 3 pHs analisados, tem-se alteração na composição estrutural das proteínas. Para as amostras processadas em pH 2,0, na Figura 11, observou-se que a amostra a 200 MPa aumentou seu conteúdo de α -hélices, enquanto que as amostras a 400 e 600 MPa houve redução. Para as β -folhas, em 200 MPa e 400 MPa houve aumento, enquanto em 600 MPa reduziu a contribuição. Para as β -voltas, não houve um comportamento claro, sendo que em 200 MPa se manteve os teores, para 400 MPa houve redução e em 600 MPa aumentou-se o conteúdo desta estrutura. Para as Bobinas aleatórias, somente em 400 MPa aumentou seu teor, em 200 e 600 MPa se manteve estável. Por fim, quanto aos agregados, estes tiveram pequena redução em

200 MPa, mas em 400 e 600 MPa aumentou-se a quantidade dessas estruturas novamente.

Em relação as amostras em pH 7,0 de processo, presentes na Figura 12, houve o estabelecimento de um padrão em função da pressão. A pressão resultou na redução do conteúdo de α -hélices e β -folhas, enquanto que as β -voltas e as Bobinas aleatórias aumentaram de quantidade. Além disso, o aumento de pressão resultou em aumento das estruturas de agregados (A1 e A2). Cabe destaque para o controle e a pressão de 200 MPa, os quais apresentaram β -folhas antiparalelas, sendo que esta aumentou com a aplicação de 200 MPa.

Para as amostras processadas em pH 11,0, exibidas na Figura 13, observa-se que a 200 MPa houve aumento do teor de α -hélices, β -folhas e dos agregados (em especial os do tipo A2), enquanto que os teores de β -voltas e Bobinas aleatórias foram reduzidos. Para 400 MPa, houve redução das α -hélices e β -voltas, enquanto que as β -folhas e os agregados (em especial os do tipo A2) aumentaram. As bobinas aleatórias mantiveram seu valor. Por fim, para 600 MPa, tem-se a redução nos teores de α -hélices e β -voltas, enquanto que houve aumento das bobinas aleatórias. O teor de β -folhas e dos agregados se manteve estável. Cabe destacar que dentre as amostras no pH 11,0 de processo, o controle e a 200 MPa foi quantificado a presença de estruturas de β -folhas antiparalelas, sendo que estas estruturas reduziram seu teor com o aumento da pressão não sendo detectadas a 400 MPa e 600 MPa.

Dentre as observações para o efeito da pressão nas amostras de isolado proteico a pH 2,0 e 11,0, na pressão de 200 MPa houve aumento do conteúdo de α -hélices e de β -folhas, enquanto que houve uma redução no conteúdo de β -voltas e Bobinas aleatórias, o que pode sinalizar uma conversão de estruturas menos organizadas em estruturas mais ordenadas. Este resultado se encontra em conformidade com a literatura, onde Yao e colaboradores (2022), em estudo com HPP em 4 pressões (200, 300, 400 e 500 MPa) e tempo variável (5, 10, 15, 20 e 25 min.) com proteínas do glúten, obteve o mesmo comportamento descrito acima em 400 MPa. Os autores também avaliaram o efeito do HPP nas ligações e interações moleculares da proteína e observaram que a aplicação de pressão resultou na redução dos grupos sulfidrilas livres bem como de ligações iônicas e no aumento das ligações de hidrogênio. Em outras palavras, houve redução dos elementos que

desestabilizam α -hélices e de β -folhas e aumento de interações que as estabilizam (BHAGAVAN; HA, 2015; YAO et al., 2022).

Para 400 MPa nos pHs 2,0 e 11,0 de processo, a redução no conteúdo de α -hélices e aumento das β -folhas está em conformidade com a literatura (ZHOU et al., 2016). Já a 600 MPa, nos referidos pHs de processo, pode ser que houve a conversão das estruturas mais organizadas (α -hélices e β -folhas) a uma estrutura menos organizada (Bobinas aleatórias). Esses resultados para as pressões de 400 e 600 MPa, também foram observados por Zhou e colaboradores (2016), em estudo com proteínas de *Ginko biloba* submetidas à HPP (100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 MPa) por 20 min.

Para as amostras processadas em pH 7,0, a pressão resultou na redução dos teores de estruturas α -hélices e de β -folhas. Essas estruturas são caracterizadas por serem mais estáveis e compactas, pois tem um alinhamento que busca minimizar ao máximo a repulsão estérica e maximizar as ligações de hidrogênio. Com isso, uma redução nessas estruturas promove a expansão da estrutura proteica, deixando-a mais aberta e flexível. Como outro efeito desta expansão tem-se a maior exposição dos grupos hidrofóbicos que estavam voltados para o interior na estrutura nativa, e esse fato pode ser observado pela hidrofobicidade crescente com a pressão para as amostras neste pH (FANG et al., 2020). Além disso, o aumento da quantidade de bobinas aleatórias é resultado do desdobramento da estrutura terciária e quaternária provocado pelo HPP (WANG et al., 2019). Também pode-se dizer para essas amostras, que o aumento da quantidade de agregados (principalmente nas amostras em 400 e 600 MPa) é resultado do processo de restauração, ou melhor, de reassociação das proteínas que foram desdobradas pela aplicação da alta pressão (TANG; MA, 2009).

Assim, de modo geral, a mudança de pH resultou em alterações estruturais das proteínas de tremçoço, principalmente, com a formação de bobinas aleatórias e agregados para a amostra em pH 2,0, enquanto que para a amostra em pH 11,0 aumentou as bobinas aleatórias, β -volta e β -folhas antiparalelas. Para a aplicação do HPP combinado com pH-*shifting*, pode ser que a pressão a 200 MPa nos pHs extremos induziu a conversão de estruturas mais desorganizadas a estruturas organizadas. A 400 MPa, possivelmente houve conversão dentre as estruturas organizadas (α -hélice para β -folha) e a 600 MPa, provavelmente as estruturas organizadas foram transformadas em estruturas desorganizadas. Por fim

no pH 7,0, pode ser que houve, novamente, a conversão de estruturas organizadas em estruturas desorganizadas conforme aumentou-se a pressão.

5.4.2.1. Análise de Componente Principal (*Principal Component Analysis* - PCA) - FTIR

A análise de componente principal tem a capacidade de fornecer informações sobre como se relacionam diversos parâmetros de estudo às variáveis independentes (DEVKOTA et al., 2023). As Figuras 14, 15 e 16 apresentam os gráficos de pontuações, para o PCA envolvendo, respectivamente, as amostras de pH 2,0, pH 7,0 e pH 11,0 de processo.

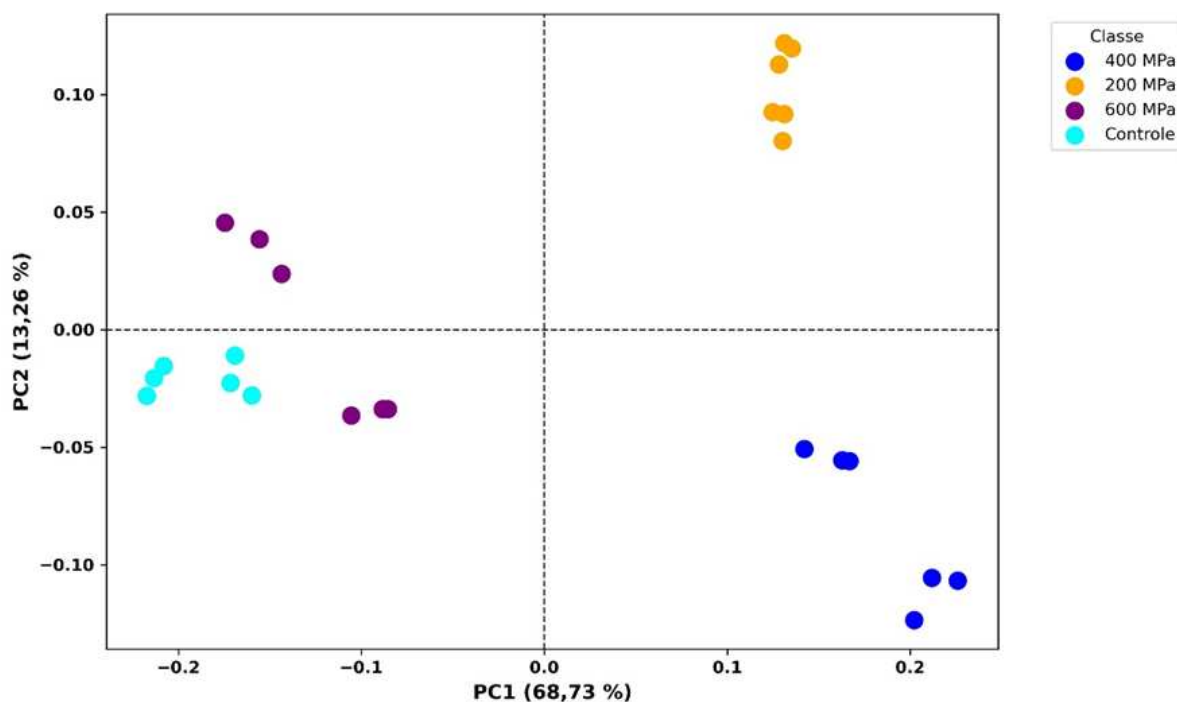


Figura 14 - Scores das amostras de isolado proteico tremçoço em pH 2,0.

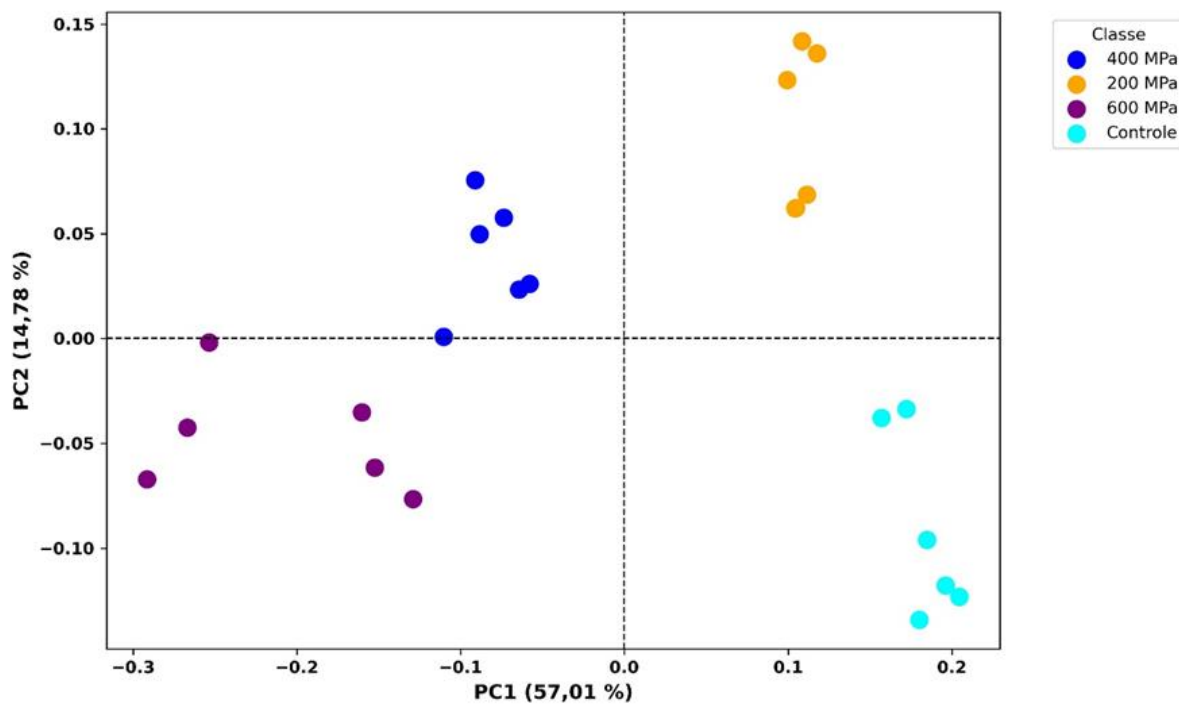


Figura 15 - Scores das amostras de isolado proteico tremço em pH 7,0.

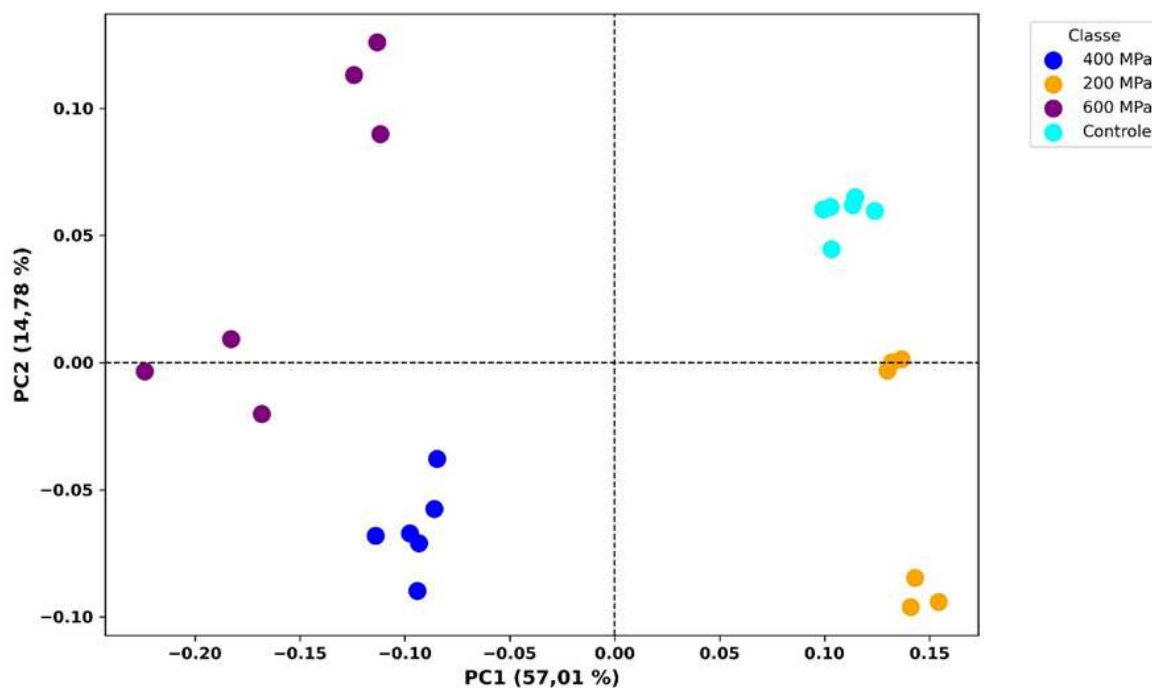


Figura 16 - Scores das amostras de isolado proteico tremço em pH 11,0.

Da análise das Figuras 14, 15 e 16, tem-se para o pH 2,0 de processo que as 2 componentes principais que explicam 81,39% da variabilidade. Já para o

pH 7,0 e 11,0 de processo, as 2 componentes explicam 71,79% da variabilidade. As Figuras 17, 18 e 19 apresentam os respectivos gráficos de cargas.

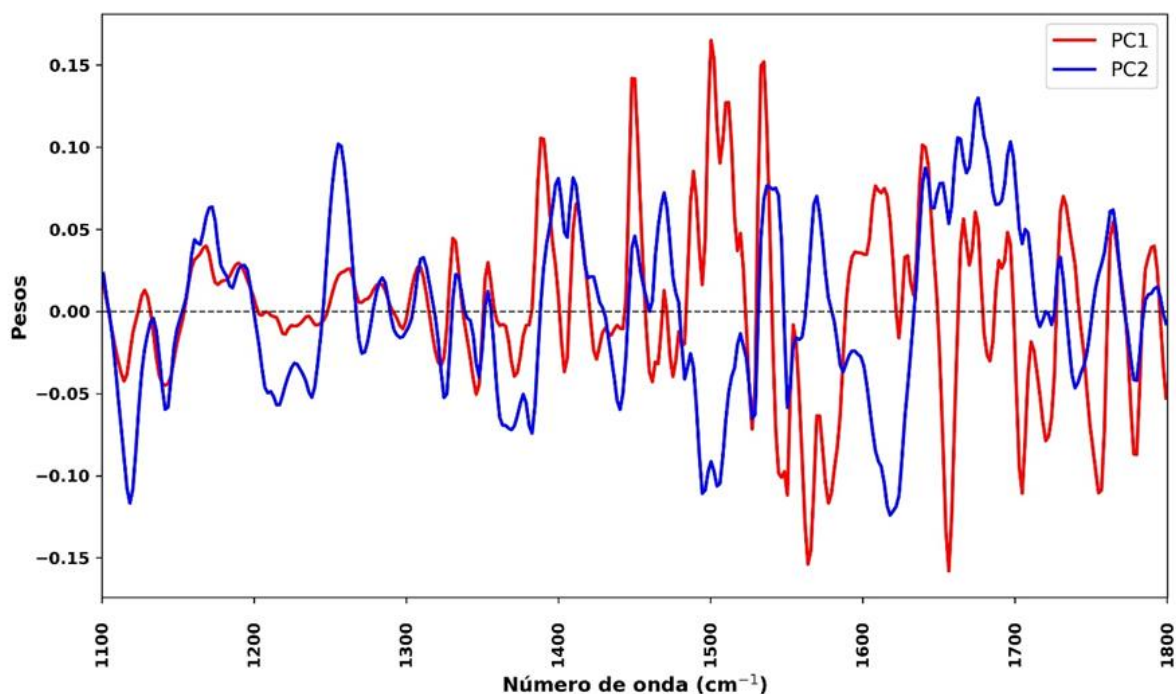


Figura 17 - Gráfico de cargas (*loadings*) das amostras de isolado proteico de tremço em pH 2,0.

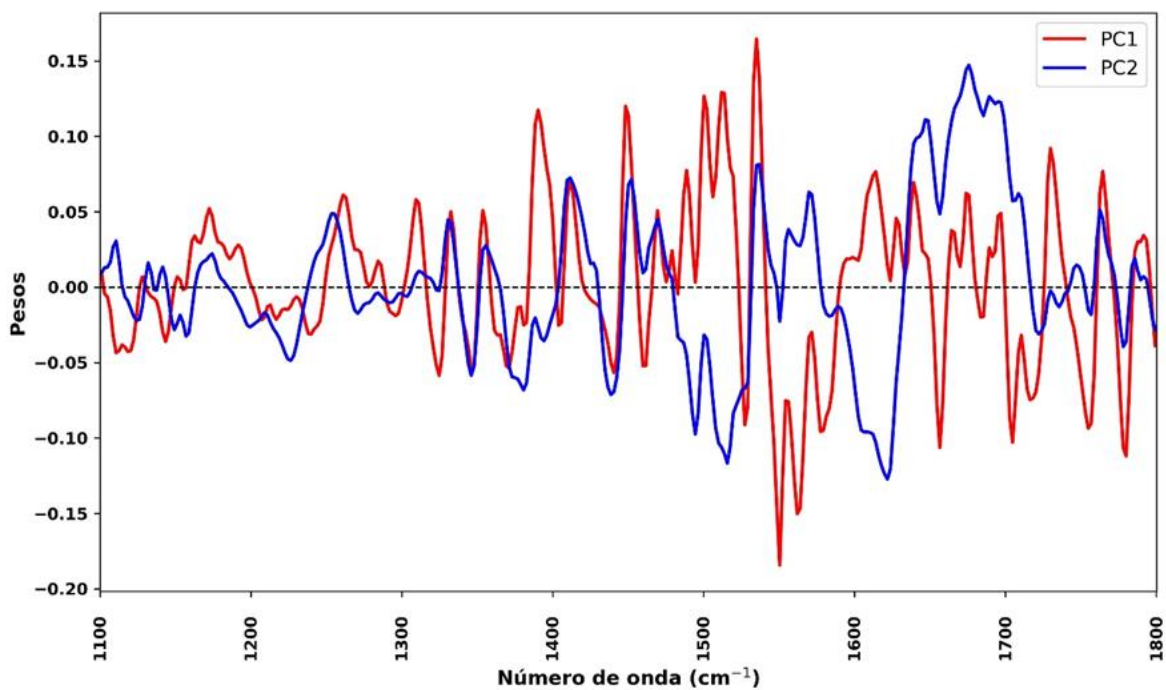


Figura 18 - Gráfico de cargas (*loadings*) das amostras isolado proteico tremço em pH 7,0.

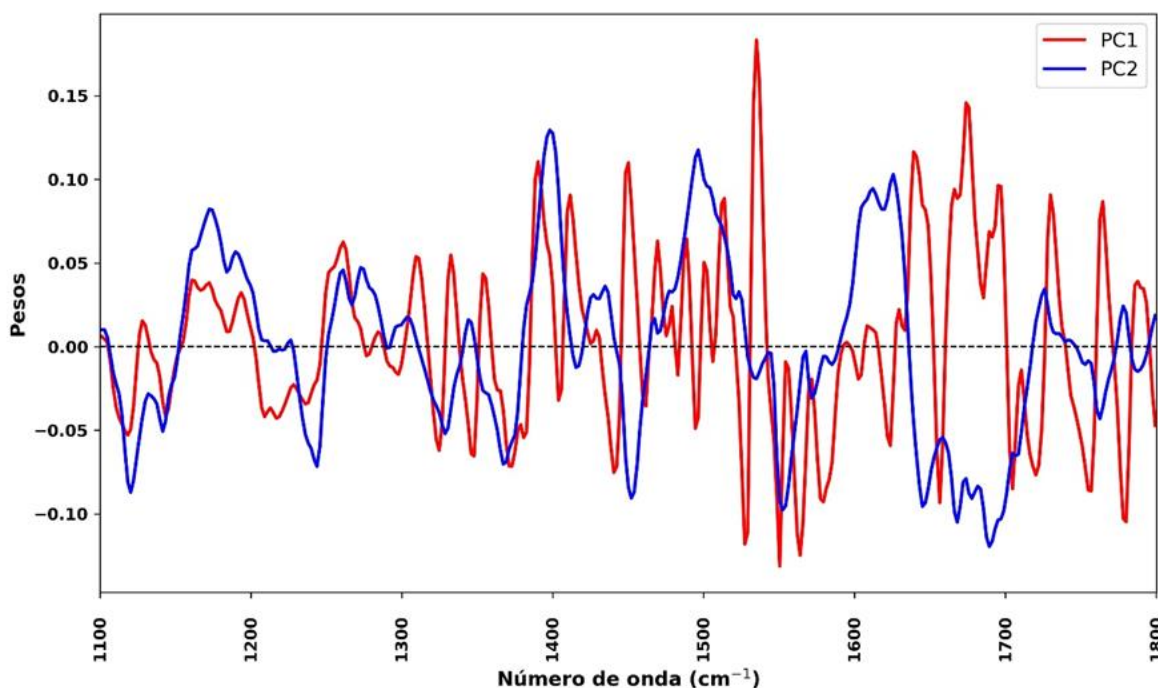


Figura 19 - Gráfico de cargas (*loadings*) das amostras de isolado proteico tremço pH 11,0.

Os gráficos de cargas ou *loadings* representam o impacto da variável no eixo x (no caso o comprimento de onda) sobre as duas componentes escolhidas. Esse impacto, ou peso, pode ser positivo ou negativo e a proporcionalidade do efeito nas componentes é dado pelo valor absoluto. Caso o peso seja próximo a zero, indica contribuição limitada do comprimento de onda no valor das PC1 e PC2.

Para o pH 2,0 de processo, as maiores contribuições foram para a PC1: região da Amida II ($\sim 1450\text{ cm}^{-1}$; $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$; $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$; $\sim 1560\text{ cm}^{-1}$); na região da Amida I em $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ (Bobinas aleatórias) a contribuição foi negativa. Para PC2, tem-se na região da Amida I influência negativa próxima de 1600 cm^{-1} , podendo ser referir ao Agregados A1 ou aos resíduos de aminoácidos laterais e influência positiva em $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ (β -volta) e em 1700 cm^{-1} (Agregados A2). Já para o pH 7,0 de processo, a maior contribuição para PC1 na região da Amida I foi negativa em $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ (α -hélice). Já para a PC2, em $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ (β -folha) a contribuição foi negativa, enquanto que em $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ (Bobinas aleatórias) e $\sim 1690\text{ cm}^{-1}$ (Agregados A2) foram positivas. Por fim, para o pH 11,0 de processo, o impacto das estruturas secundárias nos componentes se mostrou o mais intenso dentre os pHs de processo avaliados, sendo para a PC1 efeitos positivos em: $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ (Bobinas aleatórias), $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ (β -volta) e $\sim 1690\text{ cm}^{-1}$ (Agregados A2) e negativo em: $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ (α -hélice). Já a PC2 teve efeitos positivos apenas em $\sim 1610\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$,

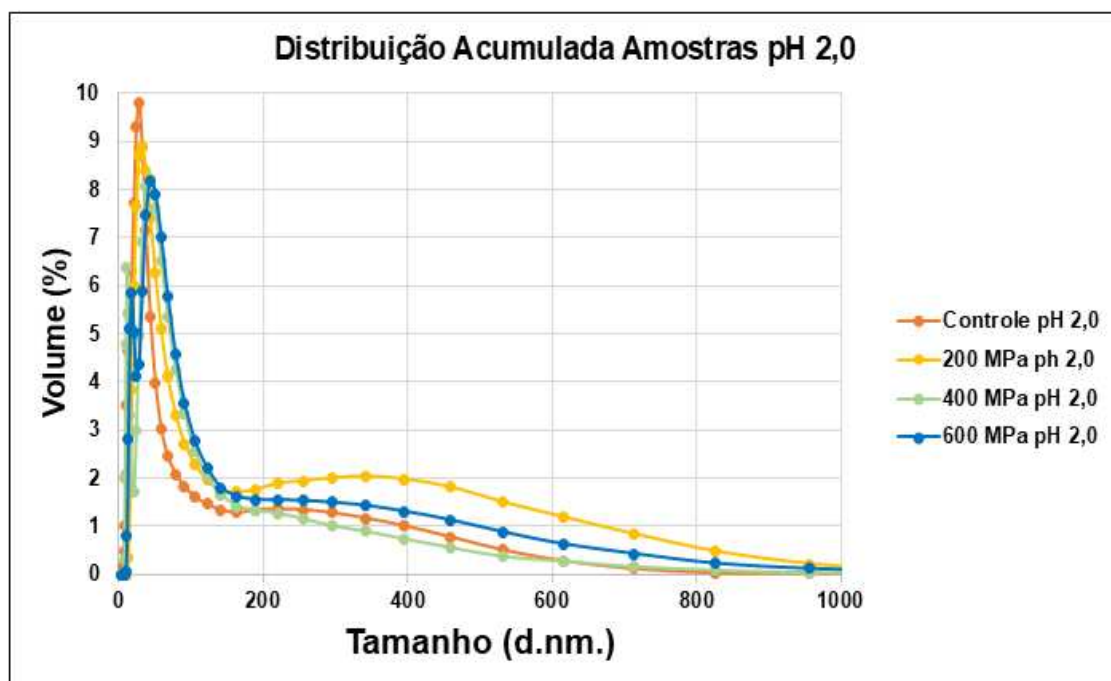
respectivamente, Agregados A1 e β -folha. Para as demais estruturas secundárias (β -volta e Agregados A2) o impacto foi negativo.

De modo geral, as amostras de cada pressão se situaram, praticamente, em quadrantes diferentes do respectivo gráfico de *scores*, isso mostra que a estratégia de aplicação combinada de HPP (em 3 níveis de pressão) com pH-*shifting* (em 3 níveis de pH) se mostrou eficiente para alteração das propriedades estruturais das amostras de isolado proteico de tremçoço.

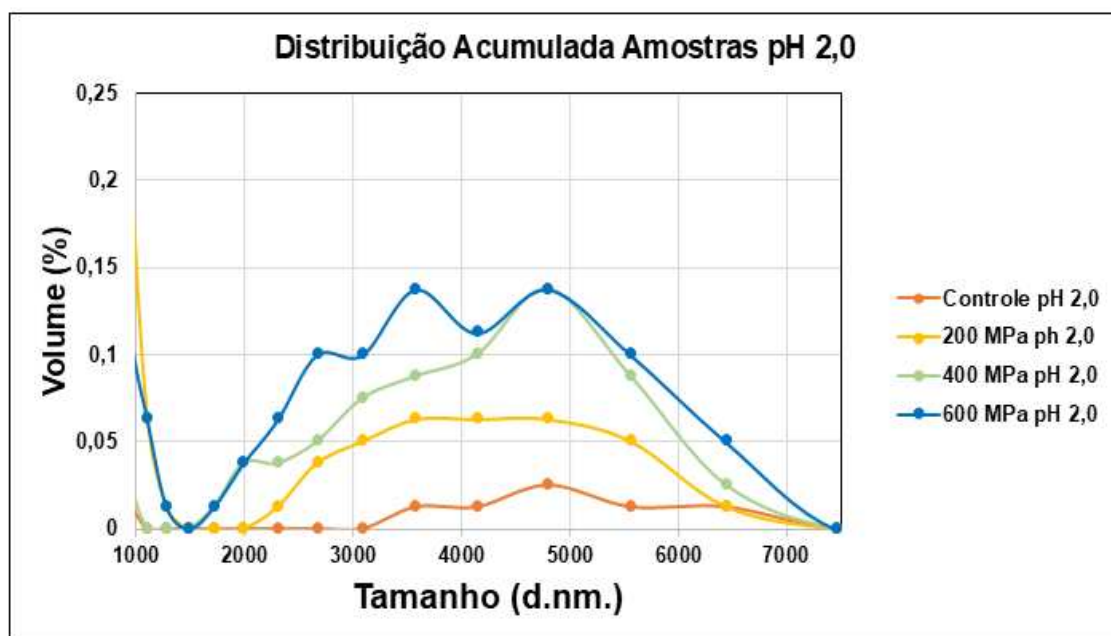
5.4.3. Distribuição de Tamanho de Partículas

A distribuição de tamanho de partículas tem sua importância no entendimento das propriedades interfaciais das proteínas, determinando até mesmo a taxa de difusão na interface ar/óleo-água e a estabilidade interfacial (MA; HABIBI; SAGIS, 2024). A partir da obtenção das distribuições de tamanho, a análise destas permite avaliar o diâmetro hidrodinâmico médio (*z-average*), o qual consiste na média harmônica do tamanho hidrodinâmico médio ponderado pela intensidade do conjunto de partículas (KRAUSE et al., 2010). Essa propriedade é importante, pois é o parâmetro mais estável obtido desta técnica, sendo interessante sua obtenção para controle de qualidade de processos. Além disso, esse parâmetro é sensível para detecção de pequenas quantidades de agregados (UCI, 2011). Os dados obtidos da análise de distribuição de tamanho de partículas estão apresentados nas Figuras 20, 21 e 22, as quais apresentam as curvas de distribuição acumulada do Volume por Tamanho de partícula. As Figuras 23, 24 e 25 apresentam os resultados em relação à propriedade Z-average.

a)



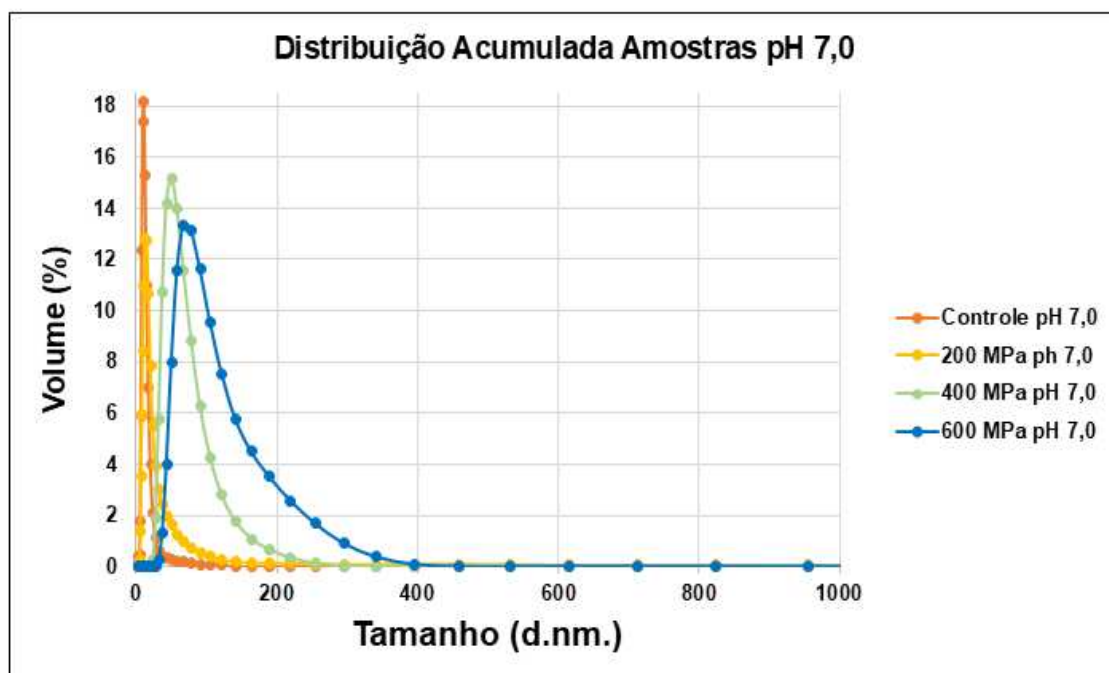
b)



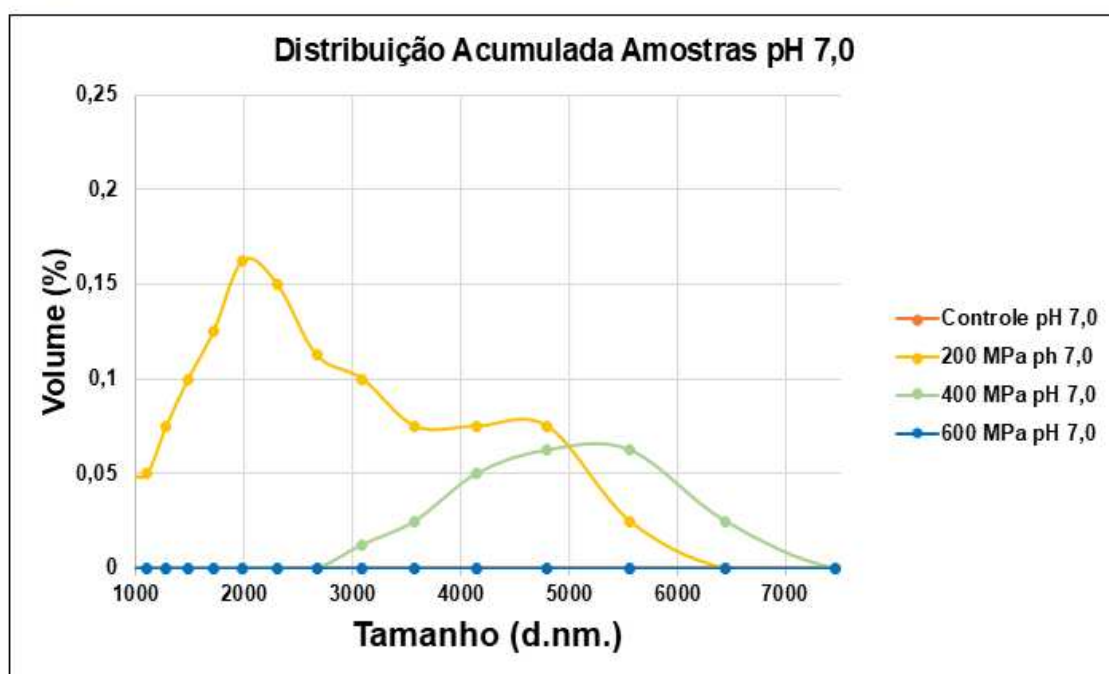
Onde: a) Refere-se à distribuição das amostras em pH 2,0 de processo entre os tamanhos de 0 nm até 1000 nm; b) Refere-se à *zoom* na distribuição das amostras em pH 2,0 de processo entre os tamanhos de 1000 a 7500 nm. Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 20 - Distribuição Acumulada de Tamanho da Partícula amostras pH 2,0.

a)



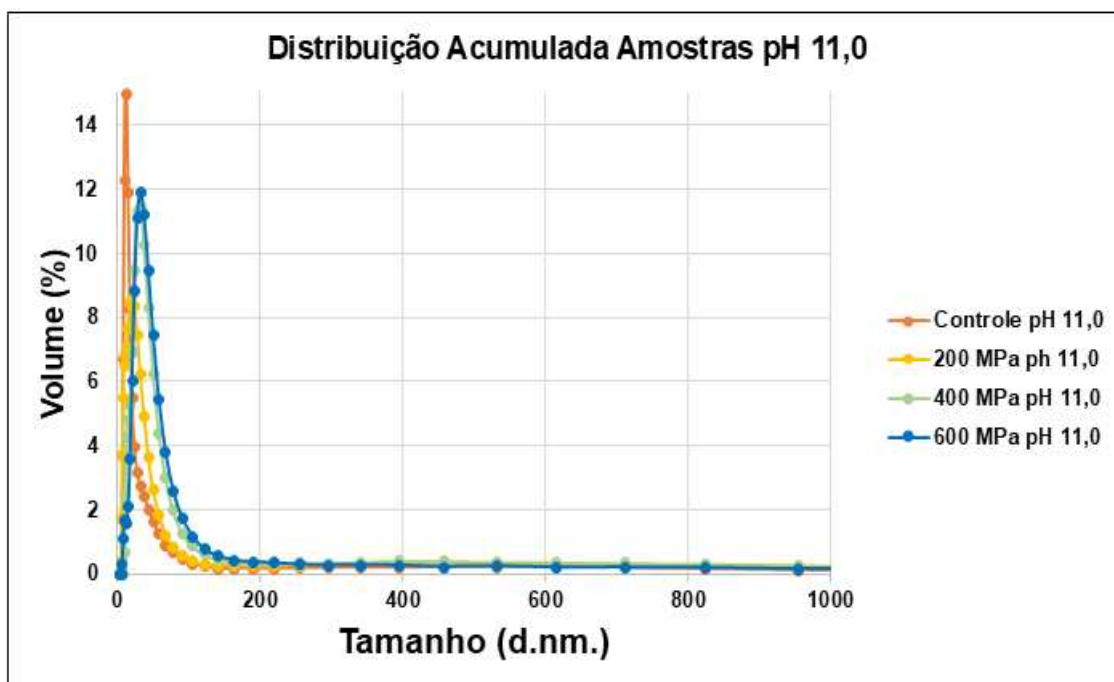
b)



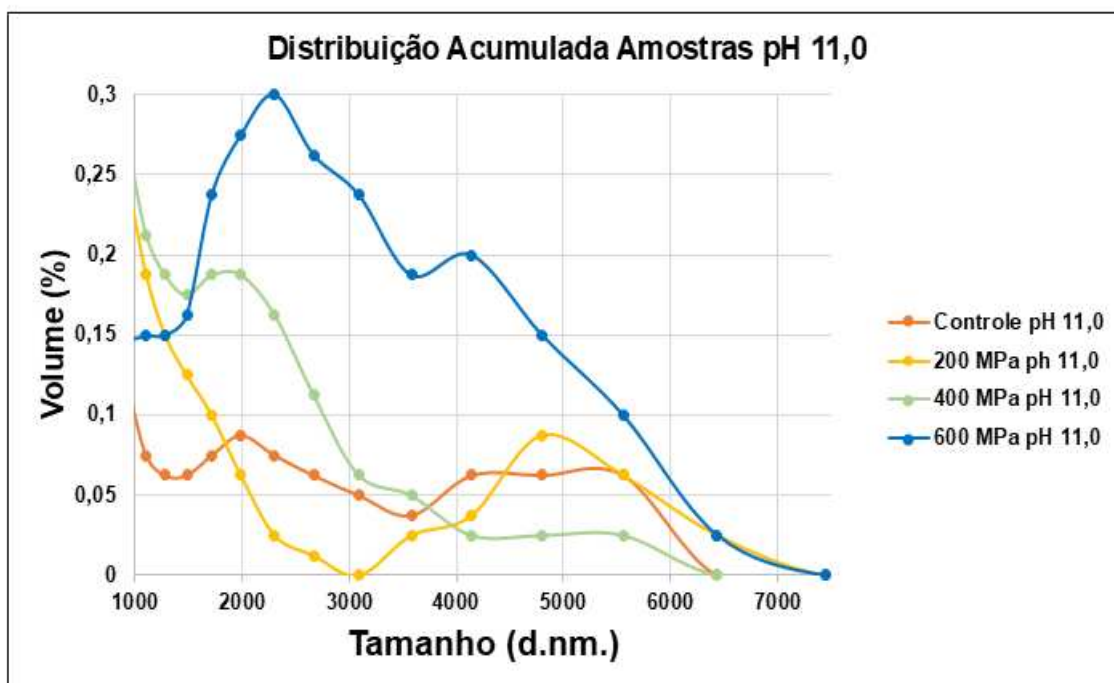
Onde: a) Refere-se à distribuição das amostras em pH 7,0 de processo entre os tamanhos de 0 nm até 1000 nm; b) Refere-se à *zoom* na distribuição das amostras em pH 7,0 de processo entre os tamanhos de 1000 a 7500 nm. Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 21 - Distribuição Acumulada de Tamanho da Partícula amostras pH 7,0.

a)

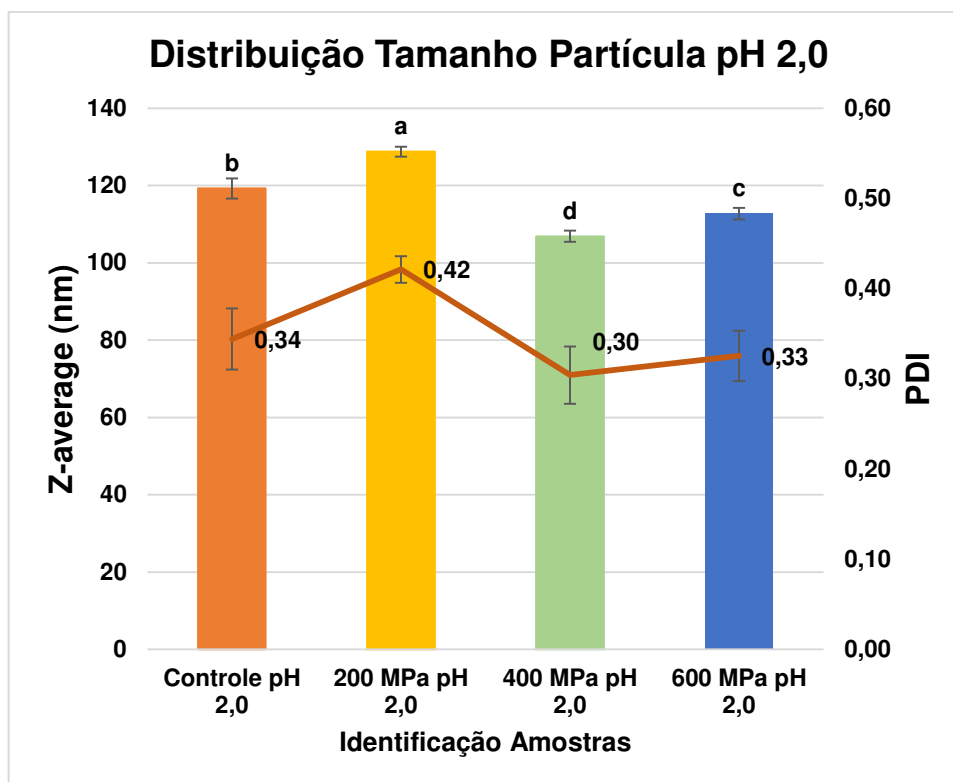


b)



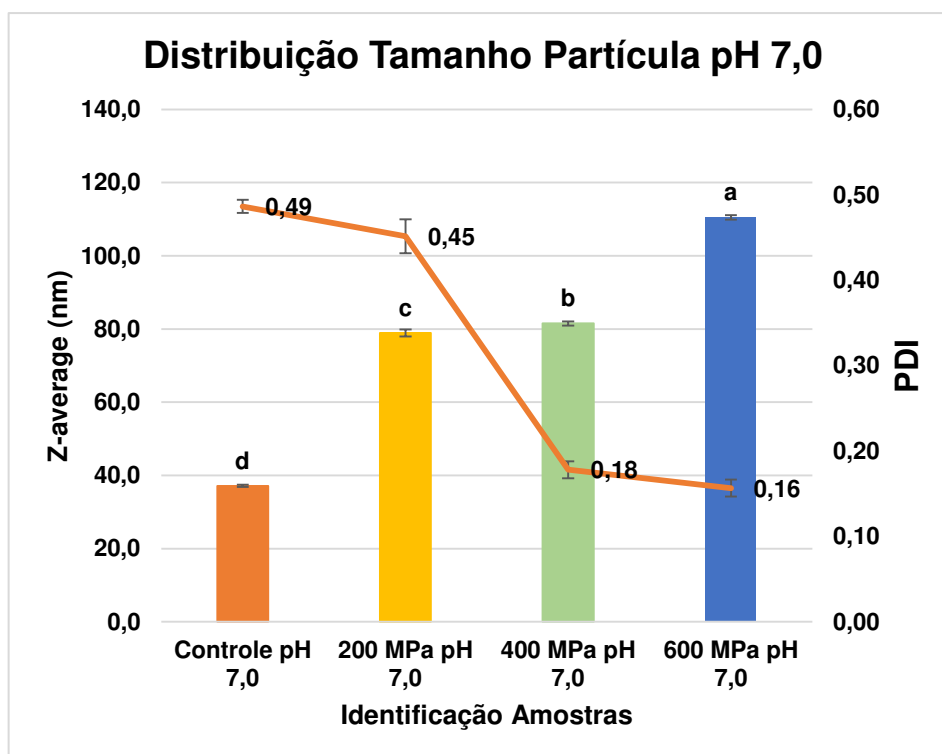
Onde: a) Refere-se à distribuição das amostras em pH 11,0 de processo entre os tamanhos de 0 nm até 1000 nm; b) Refere-se à *zoom* na distribuição das amostras em pH 11,0 de processo entre os tamanhos de 1000 a 7500 nm. Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 22 - Distribuição Acumulada de Tamanho da Partícula amostras pH 11,0.



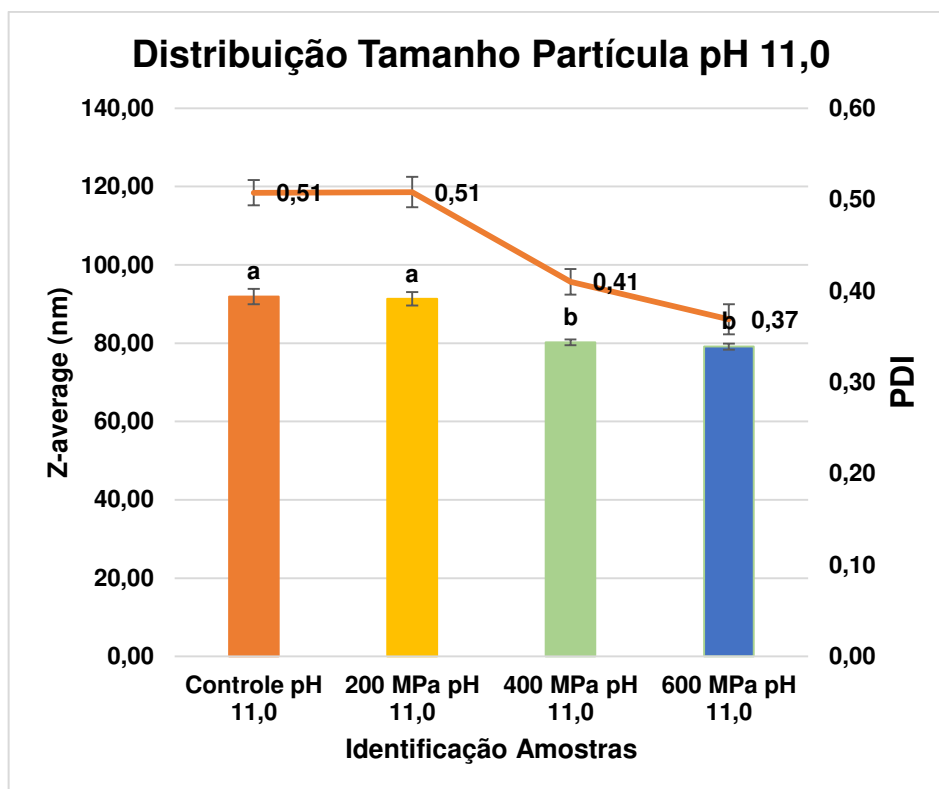
Onde: Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) para os tratamentos com letras diferentes pelo teste *post-hoc* de Tukey. Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 23 - Distribuição de Tamanho de Partícula Amostras pH 2,0 de processamento.



Onde: Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) para os tratamentos com letras diferentes pelo teste *post-hoc* de Tukey. Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 24 - Distribuição de Tamanho de Partícula Amostras pH 7,0 de processamento.



Onde: Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) para os tratamentos com letras diferentes pelo teste *post-hoc* de Tukey. Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 25 - Distribuição de Tamanho de Partícula Amostras pH 11,0 de processamento.

Com a análise das Figuras 20 a 25, tem-se que para as amostras em pH 2,0 de processo, uma redução nos valores máximos de volume conforme há o aumento da pressão. Aliado a isso, tem-se o efeito na distribuição de valores, a qual pôde ser avaliada observando a Figura 20a e o valor do Índice de Polidispersão (PDI) expresso no eixo secundário da Figura 23. Assim, o uso de pressão baixa (200 MPa) fez aumentar significativamente ($p < 0,05$) o PDI de 0,34 para 0,42, o qual quanto mais próximo de 0, mais uniforme é a amostra. Já nas demais pressões o PDI voltou a ser 0,30 e 0,33, respectivamente, para 400 e 600 MPa. Quanto ao *z-average*, em 200 MPa ($129,9 \pm 1,28$ nm) houve aumento significativo ($p < 0,05$) para o controle ($122,3 \pm 2,61$ nm), já em 400 MPa ($105,6 \pm 1,45$ nm) e 600 MPa ($115,3 \pm 1,50$ nm), estas amostras foram significativamente menores que o controle, mas a 600 MPa foi maior que 400 MPa.

Analisando também o intervalo de tamanho entre 1000 e 7500 nm ilustrado na Figura 20b, tem-se a presença de agregados de grandes tamanhos em todas as amostras. Em 600 e 400 MPa, esses agregados se concentraram de 1500

a 7500 nm, sendo que em 600 MPa obteve o maior pico e em 400 MPa o segundo maior dentre as amostras neste pH. Em 200 MPa, os grandes agregados se situaram na faixa de 2000 a 7500 nm e no controle eles ficaram entre 3000 e 7500 nm, sendo que em 200 MPa apresentou o terceiro maior pico.

Para as amostras em pH 7,0 de processo, representadas nas Figuras 21 e 24 tem-se uma redução no valor máximo de volume com a aplicação de pressão. No entanto, a 400 MPa há um aumento do valor máximo de volume frente as amostras a 200 e 600 MPa, mas não suficiente para superar o controle. Para a distribuição dos tamanhos, de modo similar ao pH 2,0 de processo, na região centrada no pico máximo de volume houve aumento da variância (maior amplitude da base do pico). Além disso, também aumentou a extensão e os valores presentes no “ombro” da distribuição como pode ser visto na Figura 21a. Quanto ao PDI, o aumento da pressão o reduziu significativamente ($p < 0,05$), saindo de 0,49 para o controle e indo para 0,45 a 200 MPa, 0,18 a 400 MPa e 0,16 a 600 MPa. Para o z-average, houve um aumento significativo com a pressão, sendo o controle ($37,2 \pm 0,31$ nm) bem menor que os demais tratamentos, 200 MPa ($78,9 \pm 0,95$ nm), 400 MPa ($81,5 \pm 0,54$ nm) e 600 MPa ($110,5 \pm 0,61$ nm).

Analisando o intervalo de tamanho entre 1000 e 7500 nm ilustrado na Figura 21b, tem-se que o controle assim como em 600 MPa não apresentou partículas nesta faixa de tamanho. Em 200 MPa, a distribuição se concentra entre 1000 e 6500 nm tendo pico maior que em 400 MPa no tamanho de 2000 nm. Para a amostra em 400 MPa, a distribuição se concentra entre 2700 e 7500 nm, com pico máximo entorno de 4800 e 5600 nm.

Em relação as amostras em pH 11,0 de processo, observa-se pelas Figuras 22 e 25 que de modo similar ao pH 7,0, houve redução do pico máximo conforme aumento da pressão, sendo que a 200 MPa ocasionou-se a maior redução. Para a distribuição de tamanhos, houve o efeito de ampliação na base do pico de distribuição e de aumento dos valores na região lateral (ombro), ilustrado na Figura 22a. Para o PDI, este reduziu significativamente ($p < 0,05$) a partir da pressão 400 MPa (0,41) atingindo o valor mínimo de 0,37 em 600 MPa. O controle e em 200 MPa o valor foi de 0,51. Quanto ao z-average, este reduziu significativamente a partir de 400 MPa ($80,22 \pm 0,71$ nm), mas não apresentou diferença para o valor em

600 MPa ($79,13 \pm 0,78$ nm). Os valores do controle ($91,91 \pm 2,00$ nm) e 200 MPa ($91,32 \pm 1,70$ nm) não diferiram entre si.

Avaliando o intervalo de tamanho entre 1000 e 7500 nm ilustrado na Figura 22b, tem-se que os picos máximos de volume dos agregados apresentaram os maiores volumes de proteínas nesta faixa de tamanho dentre os 3 pHs analisados, sendo em 600 MPa o maior pico em 2300 nm. Para esta pressão, a distribuição de valores se fez presente por todo o intervalo, assim como para a pressão de 200 MPa. Já para as amostras 400 MPa e o controle os valores se concentraram de 1000 a 6500 nm.

Analisando apenas o efeito da mudança de pH nas amostras de isolado proteico, como já comentado ao longo deste trabalho, nos extremos de pH a carga líquida total da proteína é diferente de zero. Isso ocasiona a abertura da estrutura proteica, pela repulsão entre cargas de mesmo sinal. Com a estrutura proteica mais exposta, ao realizar a redução da repulsão entre essas cargas, por meio da neutralização do pH, há o favorecimento das interações entre proteína-proteína (JIANG; XIONG; CHEN, 2010). Conforme já exposto no tópico 5.4.2 - FTIR, as amostras pré-condicionadas nos pHs extremos (2,0 e 11,0) apresentaram formação de agregados A1 e A2, o que confirmou esse favorecimento das interações entre proteína-proteína. Para a amostra condicionada em pH 7,0 (controle pH 7,0), como não houve mudança para um pH extremo, a estrutura proteica não foi exposta, consequentemente, as interações entre proteínas não foram favorecidas, conforme observado no resultado de tamanho de partículas desta amostra que não foi detectado a formação de agregados grandes (entre 1000 e 7500 d. nm), além de a distribuição de tamanho ter se concentrado no pico máximo de volume.

Estes resultados estão em conformidade com a literatura. Tian e colaboradores (2020), em estudo com β -conglutina de soja na concentração de 10 mg/ml submetida à pH-*shifting* em pHs 2,0 e 12,0, obtiveram que o diâmetro hidrodinâmico (nm) aumentou significativamente ($p < 0,05$) na amostra processada em pH 2,0 além de ter reduzido a solubilidade. Os autores atribuíram essas reduções à mudança de conformação proteica aliado a formação de grandes agregados propiciada pela passagem pelo ponto isoelétrico. Já em pH 12,0 os autores, obtiveram tamanho de partícula que não variou significativamente já a solubilidade foi maior, podendo essas diferenças de resultado serem atribuídas à

variação na estrutura proteica das diferentes espécies bem como pela ausência da contribuição das proteínas α -conglutinas (TIAN et al., 2020). De modo similar Li e colaboradores (2020), em estudo com proteínas de amendoim submetidas à pH-shifting (2,0; 4,0; 10,0; 12,0), também obtiveram aumento do tamanho médio nos pHs 2,0 e 12,0 (LI et al., 2020).

Para o efeito ocasionado pelo uso do HPP nas amostras, tem-se que este pode ocasionar em dissociação e/ou agregação proteica (WANG et al., 2022a). Para as amostras em pH 2,0 de processo, o efeito combinado do pH extremo, que ocasiona o desdobramento da proteína, com a pressão resultou em 2 cenários. A 200 MPa, houve a prevalência do efeito de agregação, com aumento do volume de partículas ao longo de toda a distribuição, se destacando o intervalo de 200 a 1000 nm que teve os maiores valores dentre as pressões analisadas. Já para as pressões de 400 e 600 MPa a agregação e a dissociação tiveram influência. A primeira, pois aumentou a quantidade de partícula com tamanho acima de 1000 nm, enquanto a segunda é evidenciada pela redução do volume de partículas no intervalo de 200 a 1000 nm e, conseqüentemente, aumentou a contribuição do pico máximo de tamanho. De modo similar a esses resultados, Añón & de Lamballerie & Speroni (2012), em estudo com proteínas de soja submetidas à HPP com 3 pressões (200, 400 e 600 MPa) por 10 min em pH 8,0, observou que a 200 MPa houve prevalência da agregação, enquanto que nas outras pressões houve a presença do efeito combinado de agregação/dissociação. No caso da agregação, quanto maior a quantidade de α -conglutina (11S) na amostra, maiores foram as quantidades de agregados formados e os tamanhos destes (AÑÓN; DE LAMBALLERIE; SPERONI, 2012).

Já para as amostras a pH 7,0 de processo, ocorreu um aumento progressivo do tamanho das partículas das amostras, indicando a ocorrência de formação de agregados de grande tamanho. Esses resultados estão em conformidade com o descrito na literatura. Chapleau & Lamballerie-Anton (2005), em estudo com isolado proteico de tremoço submetido à HPP (200, 400 e 600 MPa) por 10 min, detectou a formação de agregados de alto peso molecular em 400 e 600 MPa por cromatografia de exclusão de tamanho. Em 400 MPa, houve a formação de agregados de α -conglutina (11S), enquanto que em 600 MPa os agregados apresentaram α -conglutina (11S) e β -conglutina (7S). Os autores descrevem a

globulina 7S como mais sensível a pressão, mas não contendo ligações dissulfeto na estrutura proteica contendo mais de 12 subunidades. Já a globulina 11S é a mais influente na formação de agregados pela presença de ligações dissulfeto nas 4 subunidades da estrutura proteica. Cabe destacar que houve uma diferença de comportamento da amostra em 200 MPa dos autores para a deste estudo, que apresentou a formação de agregados. Essa variabilidade pode ser atribuída a diferenças no local de cultivo da leguminosa bem como dos métodos de extração de proteínas que foram empregados.

Com relação as amostras em pH 11,0, apesar de ter ocorrido a influência da agregação e da dissociação, a segunda foi mais proeminente tendo em vista que o tamanho médio acabou reduzindo com o aumento da pressão, o que impactou em maior homogeneidade de tamanhos. Uma possível explicação para esses efeitos pode ser descrita por um mecanismo envolvendo 2 etapas. Na primeira, há a formação do glóbulo fundido pelo uso do pH alcalino, estrutura flexível promover interações entre cadeias laterais (interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e dissulfeto), reduzindo o desdobramento da proteína. No entanto, como há a aplicação de alta pressão, as interações intermoleculares não covalentes são rompidas, formando-se as pequenas partículas. Esses achados estão em conformidade com a literatura. Zhang e colaboradores (2022), em estudo com amostras de isolado proteico de ervilha submetido à efeito combinado de ultrassom de alta intensidade (0 a 600W) com pH-shifting (2,0; 7,0 e 12,0) por 10 min, obteve mudanças nas partículas de proteínas. As partículas tinham formas irregulares, bem como grande tamanho e distribuições irregulares. Com o tratamento combinado, houve redução de tamanho e aumento da uniformidade da distribuição de tamanho, sendo atribuída pelos autores a esse mecanismo de 2 etapas (ZHANG et al., 2022).

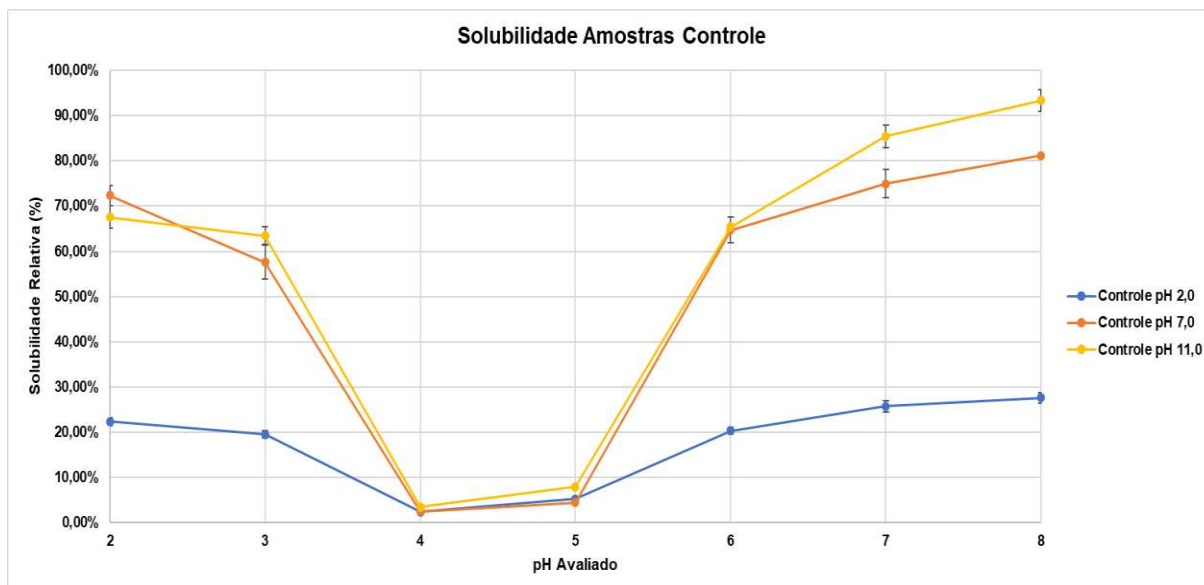
Com isso, de modo geral a mudança de pH para valores extremos, de forma isolada, ocasionou em aumento do tamanho de partícula. Para o efeito do HPP combinado ao pH-shifting, observou-se atuação conjunta dos efeitos de dissociação/agregação proteico. O aumento de pressão ocasionou em maior homogeneidade nos tamanhos de partículas (evidenciado pela redução no valor de PDI). Para o pH 2,0, a pressão baixa aumentou o tamanho das partículas, enquanto as pressões intermediárias e altas reduziram os tamanhos. Em pH 7,0, as amostras

tiveram aumento de tamanho de partículas conforme aumentou-se a pressão. E em pH 11,0, as amostras tiveram redução de tamanho com o aumento de pressão.

5.5. ANÁLISES FUNCIONAIS

5.5.1. Solubilidade em água

A Solubilidade (SP) é uma propriedade físico-química importante pois influencia outras características tecno-funcionais das proteínas. Como consequência, tem-se a necessidade de um estudo criterioso para definição da proteína mais adequada para uma nova formulação, pois os processos tecnológicos modificam a SP e isso ocasiona alteração na qualidade dos produtos durante a estocagem (na aparência, sedimentação, viscosidade e aromas) e durante/pós consumo do alimento (*mouthfeel*, digestibilidade e nas respostas metabólicas) (GROSSMANN; MACCLEMENTS, 2023). A Figura 26 apresenta as curvas de solubilidade com pHs analisados de 2,0 a 8,0. As curvas representadas na figura foram obtidas para as amostras controle de isolado proteico de tremço processadas nos pHs 2,0, 7,0 e 11,0. Os apêndices de A até G apresentam os dados consolidados em tabelas por cada um dos 7 pHs analisados, contendo também os dados estatísticos associados.



Onde: Valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Para análise estatística, consultar material no apêndice deste trabalho. Para obtenção dos valores de solubilidade relativa, que foi avaliada nos pH de 2,0 a 8,0, necessitou-se da medição de uma amostra preparada em NaOH (valor referência de solubilidade total).

Figura 26 - Solubilidade proteica em água dos controles nos 3 diferentes pHs de processamento.

Analisando a Figura 26 observa-se um comportamento característico em formato de “U”, ou seja, nos extremos de pH de análise (pHs muito ácidos e muito alcalinos) as amostras possuem elevada solubilidade. Já em pHs próximos ao ponto isoeletrico (PI), a solubilidade das amostras se apresenta mais baixa (menor que 10%).

Ainda sobre a Figura 26, podemos avaliar o efeito do tratamento de condicionamento prévio nas amostras nos 3 diferentes pHs. A amostra tratada em pH 2,0 de processo, apresentou uma curva de solubilidade mais achatada, ou seja, a amplitude foi menor entre os valores de menor solubilidade (expressos nos pHs 4,0 e 5,0) e os valores de grande solubilidade (expressos nas faixas de pH 2,0 a 3,0 e pH 6,0 a 8,0, sendo esta última com valores menores que a primeira faixa). Já para os pH 7,0 e 11,0 de processo, as curvas de solubilidade apresentaram grande amplitude nos valores de solubilidade. Em pH 4,0 de análise, apresentou-se os menores valores, respectivamente: 2,54% e 3,45%; enquanto no pH 2,0 de processo o valor foi de 2,41%. Estes valores foram significativamente ($p < 0,05$) diferentes. Já no pH 8,0 de análise, apresentou-se os picos máximos de solubilidade, sendo, respectivamente, para pH 7,0 e 11,0 de processo: 81,16% e 93,32%. Comparando com o pH 2,0 de processo este apresentou valor de 27,60%, valor cerca de 66%

menor que a solubilidade máxima do pH 7,0 de processo. Além disso, nos pH 7,0 e 11,0 de processo, na faixa entre pH 6,0 e 8,0 de análise, os valores foram maiores do que os valores obtidos na faixa de pH de análise de 2,0 a 3,0.

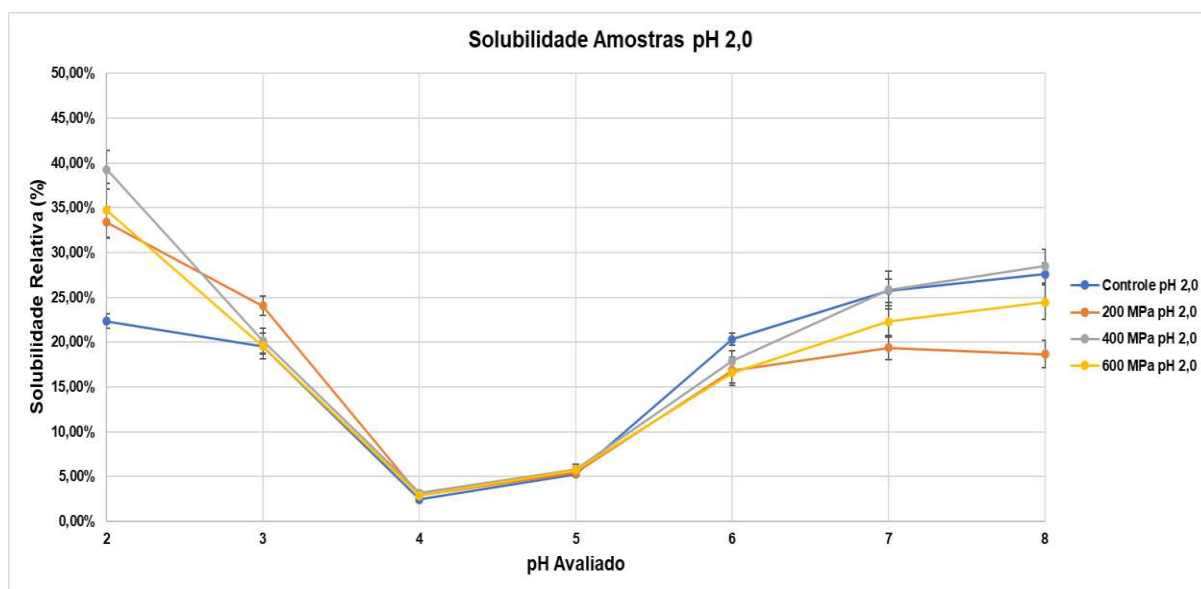
Esse comportamento da solubilidade das proteínas em função do pH ocorre, pois próximo ao PI (proteínas do tremço tem PI de aproximadamente 4,7) a carga líquida é quase zero (DOMÍNGUEZ et al., 2023). No PI, a carga líquida é zero, pois há o equilíbrio entre as cargas positivas e negativas presentes, respectivamente, nos grupos amino ($-NH_2$) e ácido carboxílico ($-COOH$) (DENG et al., 2019). Com a redução da repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína, há a propensão à agregação destas e a consequente precipitação. Por outro lado, se a proteína está em um meio com pH afastado do PI, há um desequilíbrio nas cargas positivas e negativas, que ocasiona na presença de uma repulsão eletrostática entre as moléculas proteicas. Assim, há favorecimento da interação entre proteína e solvente (água), o que faz a proteína apresentar boa solubilidade (DENG et al., 2011).

Como dito acima, o uso de pHs extremos nas proteínas causa um desequilíbrio no conteúdo de cargas da proteína. Assim, pela existência dessa repulsão eletrostática entre as partes das proteínas, a estrutura proteica acaba sofrendo desdobramento. Ao voltar o pH para 7,0, como parte da repulsão eletrostática é reduzida, há um redobramento da estrutura (TANG; YING; SHI, 2021). Proteínas que chegam neste estado, com estruturas secundárias semelhantes à nativa, mas pequena quantidade de estruturas terciárias definidas são chamadas de Glóbulos Fundidos (EWBANK; CREIGHTON, 1991). Nesta estrutura, a depender de como é feito a incubação em pH 7,0 para reenovelamento pode-se induzir a formação de diferentes estruturas.

Para a realização de um retorno ao pH 7,0 rapidamente e/ou sem passar pelo PI, como é o caso das amostras deste projeto em pH 7,0 e 11,0 de processo, há a formação de nanoagregados solúveis em água (JIANG; XIONG; CHEN, 2010; TANG; YING; SHI, 2021). Jiang & Xiong & Cheng (2010), em trabalho que avaliou o efeito do *pH-shifting* (mudança no pH de processo) em isolados proteicos de soja submetidos aos pH 1,5 e 12,0 seguido de neutralização, observou a melhoria da solubilidade das amostras em tratadas em pH 12,0, enquanto que as amostras em pH 1,5 apresentaram redução dos valores de solubilidade, principalmente para a fração de proteínas 7S (β -conglutina).

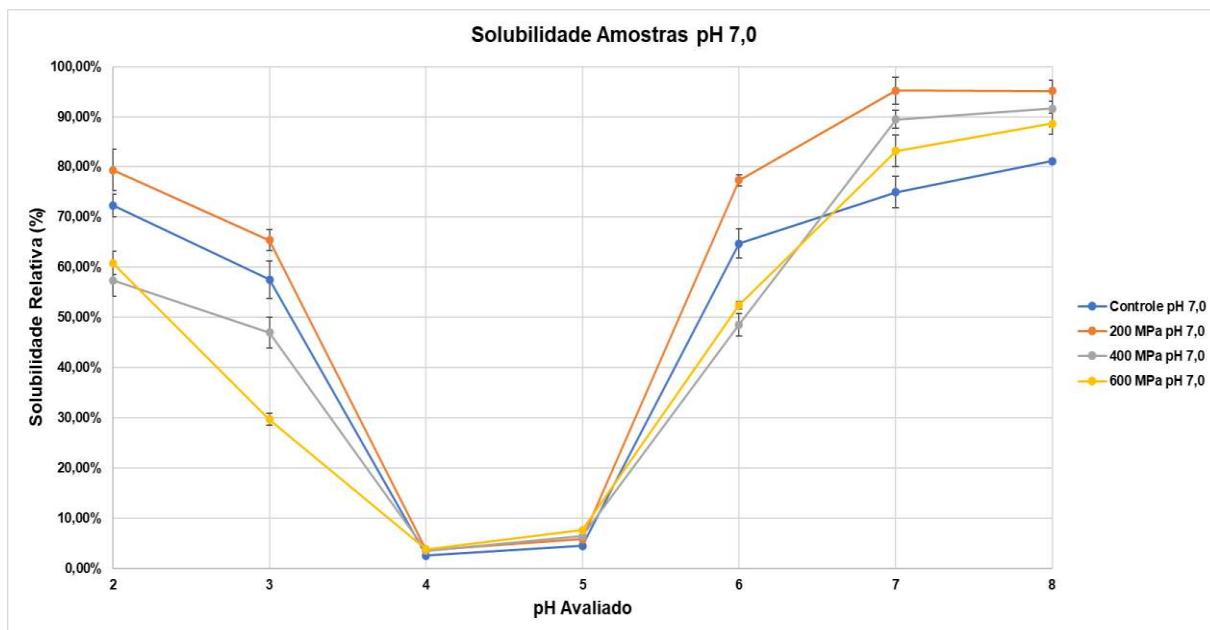
No entanto, para a situação em que se necessite passar pelo PI para chegar ao pH neutro, como é o caso das amostras em pH 2,0 de processo, há a formação de agregados insolúveis (JIANG; WANG; XIONG, 2018; WAGNER; SORGENTINI; AÑÓN, 1996). Wagner & Sorgentini & Añón (1996), em estudo que avaliou o efeito do pH-*shifting* ácido (pH 1,0 a 3,5) em amostras de isolado de soja, observou que as amostras neutralizadas em 2 etapas (primeiro até o PI e depois do PI até o pH neutro) apresentaram menor solubilidade e maior valor de hidrofobicidade superficial, o que está de acordo com os achados deste trabalho para o pH 2,0 de processo, o qual apresentou reduzida solubilidade e o maior valor de hidrofobicidade dentre os controles.

As Figuras 27 a 29, a seguir, apresentam os comportamentos para a solubilidade das amostras processadas em alta pressão comparadas a seus respectivos controles.



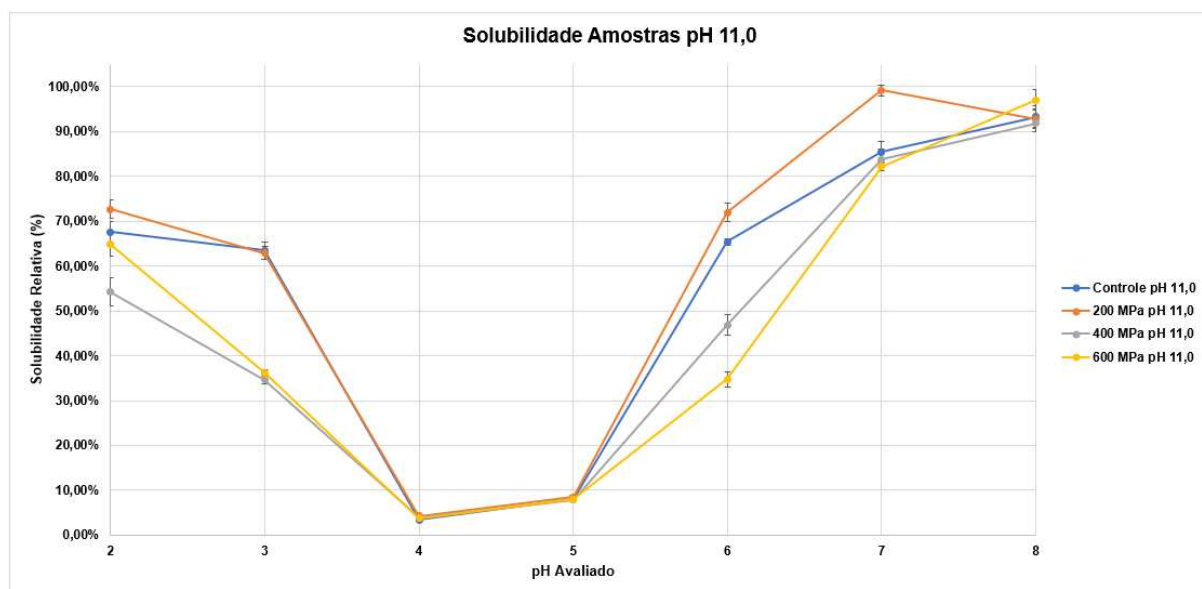
Onde: Valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Para análise estatística, consultar material no apêndice deste trabalho. Para obtenção dos valores de solubilidade relativa, que foi avaliada nos pH de 2,0 a 8,0, necessitou-se da medição de uma amostra preparada em NaOH (valor referência de solubilidade total).

Figura 27 - Solubilidade proteica em água no pH 2,0 de processamento.



Onde: Valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Para análise estatística, consultar material no apêndice deste trabalho. Para obtenção dos valores de solubilidade relativa, que foi avaliada nos pH de 2,0 a 8,0, necessitou-se da medição de uma amostra preparada em NaOH (valor referência de solubilidade total).

Figura 28 - Solubilidade proteica em água no pH 7,0 de processamento.



Onde: Valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Para análise estatística, consultar material no apêndice deste trabalho. Para obtenção dos valores de solubilidade relativa, que foi avaliada nos pH de 2,0 a 8,0, necessitou-se da medição de uma amostra preparada em NaOH (valor referência de solubilidade total).

Figura 29 - Solubilidade proteica em água no pH 11,0 de processamento.

Da análise das Figuras 27 a 29, pôde-se perceber que a aplicação de alta pressão combinada a mudança no pH de processo, não mudou o formato de “U” característico. No entanto, houve mudança nas amplitudes das curvas conforme aumentou-se a pressão.

Para o pH 2,0 de processo, assim como relatado para o respectivo controle, houve a redução nos valores da curva solubilidade, tornando as curvas mais achatadas. Para a pressão de 200 MPa, nos pHs 2,0; 3,0 e 4,0 de análise a solubilidade foi maior que o controle, enquanto que para os pHs 6,0; 7,0 e 8,0 de análise foi pior que o controle. No pH 5,0 de análise não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o controle. Para a pressão 400 MPa, nos pHs 2,0 e 4,0 de análise obteve-se maior solubilidade do que o controle, já para os demais pHs de análise não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o controle. E para a pressão 600 MPa, no pH 2,0 de análise a solubilidade foi maior que o controle, já para os pHs 6,0; 7,0 e 8,0 de análise, observou-se redução da solubilidade e nos pHs 3,0; 4,0 e 5,0 não houve diferença significativa ($p < 0,05$) com o controle. O valor de maior solubilidade nas 3 pressões estudadas (200, 400 e 600 MPa) foi no pH 2,0 de análise, sendo respectivamente: $33,40\% \pm 0,02$; $39,26\% \pm 0,02$ e $34,73\% \pm 0,03$; com as pressões 200 e 600 MPa não diferindo significativamente ($p < 0,05$) entre si. Todas as 3 pressões diferiram significativamente para o controle neste pH avaliado. Já o controle apresentou seu maior valor no pH 8,0 de análise, sendo de $27,60\% \pm 0,01$.

Em relação ao pH 7,0 de processo, a pressão de 200 MPa apresentou uma curva com valores superiores ao controle em todos os pHs analisados. Já para as pressões de 400 e 600 MPa, a solubilidade foi menor que o controle nos pHs 2,0; 3,0 e 6,0 de análise. Nos pHs de análise 4,0; 5,0; 7,0 e 8,0, as duas pressões obtiveram valores melhores que o controle. Os valores máximos de solubilidade das amostras foi de: $95,19\% \pm 0,03$ para 200 MPa em pH 7,0 de análise; $91,63\% \pm 0,04$ para 400 MPa em pH 8,0 de análise; e $88,60\% \pm 0,02$ para 600 MPa em pH 8,0 de análise.

Para o pH 11,0 de processo, a amostra em 200 MPa apresentou solubilidade maior que o controle para os pHs 2,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 de análise. Nos pHs 3,0 e 8,0 a solubilidade não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para o controle. Para a amostra em 400 MPa, nos pH 2,0; 3,0 e 6,0 de análise a

solubilidade foi menor que o controle, enquanto nos pHs 5,0; 7,0 e 8,0 não houve diferença significativa ($p < 0,05$) e no pH 4,0 foi maior que o controle. Por fim, para a amostra em 600 MPa, nos pHs 2,0; 4,0; 5,0 e 7,0 de análise não apresentou diferença significativa para o controle. Já nos pHs 3,0 e 6,0 a solubilidade foi menor que o controle. Apenas no pH 8,0 de análise a solubilidade foi maior do que o controle.

Para as amostras em pH 2,0 e 11,0 de processo, conforme houve o aumento da pressão os efeitos na solubilidade passaram para a maioria dos pHs analisados a serem neutros ou apresentarem menor valor do que o controle. A razão para isso é que a pressão proporcionou, como dito anteriormente, alterações reversíveis nas estruturas quaternárias e no desenovelamento parcial das proteínas para pressões até 200 MPa. Com isso, há a melhoria das interações entre proteína-solvente, logo, tem-se aumento da solubilidade (WANG et al., 2022a). Já para pressões mais elevadas (400 e 600 MPa), estas podem ter induzido modificações irreversíveis na conformação das proteínas, com a formação de agregados insolúveis de menor tamanho que foram detectados na análise de distribuição de tamanho de partícula (QUEIRÓS; SARAIVA; DA SILVA, 2018; WANG et al., 2022a).

Estes resultados estão em conformidade com o encontrado por Chapleau & De Lamballerie-Anton (2003), que avaliaram o efeito do HPP sob 3 pressões (200, 400 e 600 MPa) por 10 min. em amostras de isolado proteico de tremoço, e os resultados de Cao e colaboradores (2018), que avaliaram o efeito da aplicação do HPP em 4 pressões (100, 200, 300 e 400 MPa) à 10 min. em amostras de proteína de pinhão (CAO et al., 2022; CHAPLEAU; DE LAMBALLERIE-ANTON, 2003).

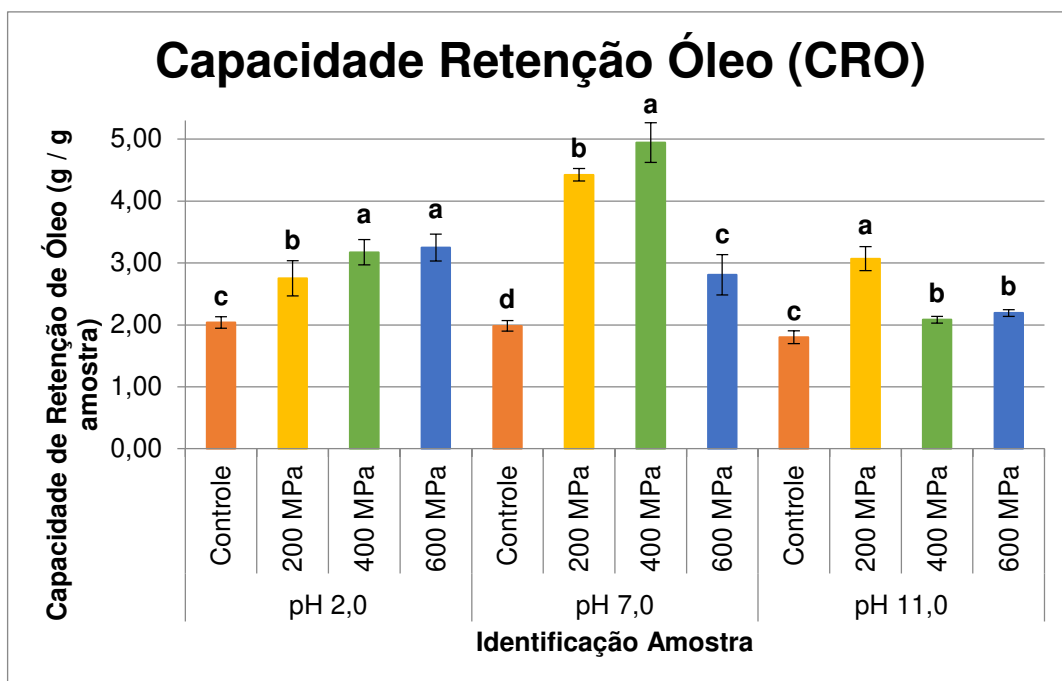
Para as amostras em pH 7,0 de processo, conforme aumentou-se a pressão, melhor foi o comportamento da curva de solubilidade em relação ao controle. Isso ocorre pois possivelmente houve a dissociação de agregados insolúveis a agregados solúveis, conforme aumento da pressão (YANG; POWERS, 2016). Estes resultados também estão em conformidade com o encontrado por Tang & Ma (2009), em estudo que avaliou o efeito do HPP em 3 pressões (200, 400 e 600 MPa) por 15 min na agregação e nas propriedades estruturais de isolados proteicos de soja. Neste estudo os autores encontraram que a aplicação de pressão resultou em aumento da quantidade de agregados, pois o HPP induziu desdobramento e desnaturação das proteínas. Com isso, os agregados se formaram por interações

hidrofóbicas e outras interações fracas. No entanto, a aplicação de pressões de 400 e 600 MPa resultou na conversão de agregados insolúveis para solúveis. Puppo e colaboradores (2004), em estudo com HPP em 3 pressões (200, 400 e 600 MPa) por 10 min combinado com mudança de pH (3,0 e 8,0), também observou que o HPP, promoveu aumento da solubilidade, da hidrofobicidade e da formação de agregados solúveis principalmente da fração de 11S (α -conglutina) (PUPPO et al., 2004; TANG; MA, 2009).

Portanto, de modo geral, o emprego isolado do pH-*shifting* resultou em modificação da curva de solubilidade das proteínas presentes no isolado de tremço, sendo que em pH alcalino houve incremento da solubilidade em alguns pHs analisados. Já para o pH ácido, a curva de solubilidade sofreu redução da solubilidade frente ao controle. Em relação ao HPP combinado com mudança de pH, a aplicação de baixa pressão resultou em incremento da solubilidade em mais pontos da curva, já para as pressões intermediárias e altas o incremento da solubilidade se restringiu a uma quantidade menor de pontos da curva.

5.5.2. Capacidade de Retenção de Óleo (CRO)

A Capacidade de Retenção de Óleo é uma propriedade funcional relacionada à habilidade da estrutura proteica em reter óleo em sua estrutura (XU et al., 2024). A unidade empregada para sua quantificação é grama de óleo por grama de amostra seca. A Figura 30, a seguir, apresenta os valores obtidos para essa propriedade.



Onde: Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras dentro do mesmo pH avaliado que apresentaram letras diferentes pelo teste *post-hoc* de Tukey. Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 30 - Capacidade de Retenção de Óleo.

Analisando os dados da Figura 30, para todos os pHs de processo houve melhoria significativa ($p < 0,05$) da capacidade de retenção de óleo quando comparadas aos seus respectivos controles. No pH 2,0 de processo, a 400 MPa ($3,17 \pm 0,20$ g/g amostra) e 600 MPa ($3,25 \pm 0,22$ g/g amostra) obteve-se os maiores valores de CRO, sendo que estes não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si. Para o pH 7,0 de processo, as amostras em 200 MPa ($4,42 \pm 0,11$ g/g amostra) e 400 MPa ($4,94 \pm 0,32$ g/g amostra) apresentaram os maiores valores para esta propriedade, dentre todas as amostras analisadas. Cabe destacar que neste pH, a amostra 600 MPa ($2,81 \pm 0,33$ g/g amostra), obteve valor menor do que a 200 e 400 MPa. Por fim, para o pH 11,0 de processo, a amostra em 200 MPa ($3,07 \pm 0,19$ g/g amostra) apresentou o maior valor. Já as amostras 400 MPa ($2,08 \pm 0,05$ g/g amostra) e 600 MPa ($2,19 \pm 0,05$ g/g amostra), apresentaram-se maiores que o controle, no entanto não diferiram estatisticamente entre si.

Analisando apenas o efeito do pH de processamento, os 3 controles apresentaram diferença, sendo que o pH 11,0 de processo foi o menor ($1,80 \pm 0,10$ g/g amostra). Esse valor é 10,27% menor que o valor do pH 7,0 ($1,98 \pm 0,09$ g/g amostra).

amostra) e 13,08% menor que o valor do pH 2,0 ($2,04 \pm 0,09$ g/g amostra). Tang & Roos & Miao (2023), em estudo sobre o impacto do pH-shifting (3,0; 5,0; 7,0 e 9,0) nas propriedades funcionais de leguminosas (lentilha, soja, ervilha e grão de bico), obtiveram comportamento e valores similares para as 3 primeiras leguminosas (TANG; ROOS; MIAO, 2023).

Esses resultados obtidos estão relacionados ao balanço de carga líquida das proteínas que nos extremos (pH 2,0 e 11,0), ao ser diferente de zero, proporciona repulsão entre as partes das proteínas de mesma carga, o que gera um desdobramento da estrutura proteica (JIANG; WANG; XIONG, 2018). Com isso, as cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos que estavam oclusas na estrutura acabam sendo expostas, como pode ser verificado pelo aumento da hidrofobicidade das amostras controle dos isolados proteicos a pH 2,0 e 11,0.

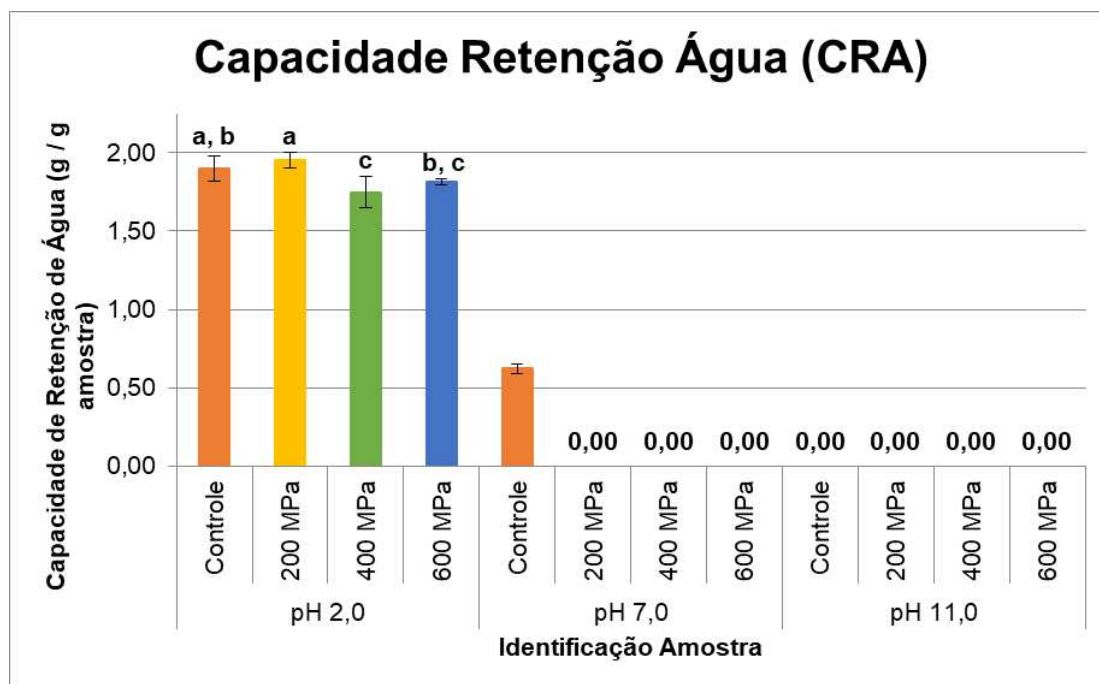
Para a avaliação do efeito do HPP, tem-se que de modo geral houve melhoria da CRO com o aumento a pressão. A explicação para a melhoria da CRO se relaciona a modificação conformacional das proteínas induzida pela pressão aplicada (NAVARE; KARWE; SALVI, 2023). Observou-se que o HPP resultou em aumento dos grupos hidrofóbicos expostos na superfície da proteína que interagem fortemente com óleos/gorduras. No entanto, uma exposição excessiva destes grupos provocada por pressões mais elevadas (400 e 600 MPa) tende a formar agregados conforme observou-se nos tópicos 5.4.2 - FTIR e 5.4.3 – Tamanho de Partículas. Como impacto desses agregados, as regiões hidrofóbicas das proteínas anteriormente expostas pela pressão são oclusas novamente, reduzindo a hidrofobicidade, conforme observou-se para as amostras em pH 2,0 e 11,0 no tópico 5.4.1 - Hidrofobicidade. Esses resultados estão em conformidade com a literatura, Zhu e colaboradores (2017), em estudo com proteínas de farelo de arroz submetidas à HPP (100, 200, 300, 400 e 500 MPa), obtiveram em pressões baixas (100 e 200 MPa) aumento de 180% na CRO, no entanto, pressões acima de 200 MPa causaram redução da CRO (ZHU et al., 2017). As amostras dos autores a 300 – 500 MPa se mantiveram maiores que o controle assim como as amostras de isolado proteico de tremçoço.

De modo geral observou-se que o aumento da CRO se relacionou a aplicação de pressões baixas/intermediárias atingindo um valor máximo de CRO próximo de 400 MPa. Níveis de pressão mais elevados tendem a formar grandes

agregados, que impactam na redução dos grupos hidrofóbicos expostos e, por consequência, na CRO.

5.5.3. Capacidade de retenção de água (CRA)

De modo similar a CRO, a Capacidade de Retenção de Água é habilidade da proteína em reter água em sua matriz tridimensional mesmo diante da atuação da gravidade e/ou de compostos químicos, como os sais (ZAYAS, 1997). A unidade de mediada empregada foi grama de água por grama de amostra seca. A Figura 31, a seguir, apresenta os dados obtidos de CRA.



Onde: Para as amostras processadas com o HPP (200, 400 e 600 MPa) combinado com os pHs (7,0 e 11,0), além da amostra controle no pH 11,0; não foi possível obter os respectivos valores para a CRA das amostras. Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras dentro do mesmo pH avaliado que apresentaram letras diferentes pelo teste *post-hoc* de Tukey). Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 31 - Capacidade de Retenção de Água.

Da Figura 31, pôde-se observar que a combinação de processamentos por HPP e mudança de pH resultou em uma alteração significativa na Capacidade de Retenção de Água das amostras. No entanto, essa alteração acabou piorando essa característica conforme houve o aumento da pressão para as amostras processadas no pH 2,0. O controle no pH 2,0 obteve o maior valor ($1,90 \pm 0,08$ g/g

amostra), mas o controle não diferiu estatisticamente em relação a amostra em 200 MPa ($1,95 \pm 0,05$ g/g amostra) e nem para a amostra 600 MPa ($1,82 \pm 0,02$ g/g amostra), estas pressões diferiram estatisticamente entre si. Já a amostra em 600 MPa, não diferiu para a amostra 400 MPa ($1,75 \pm 0,10$ g/g amostra) que teve o menor valor.

Para o pH 2,0 de processo, com o aumento da pressão há a diminuição da CRA, pois está correlacionada à redução da solubilidade (LIN; FERNÁNDEZ-FRAGUAS, 2020). Este fato também foi observado nas amostras de isolado proteico no referido pH. Lin & Fernández-Fraguas (2020), em estudo com proteínas de feijão carioca submetidas à HPP (150, 300 e 450 MPa) em diferentes tempos (5, 10 e 15 min), obtiveram redução da CRA com o aumento de pressão nos tempos de 10 e 15 min.

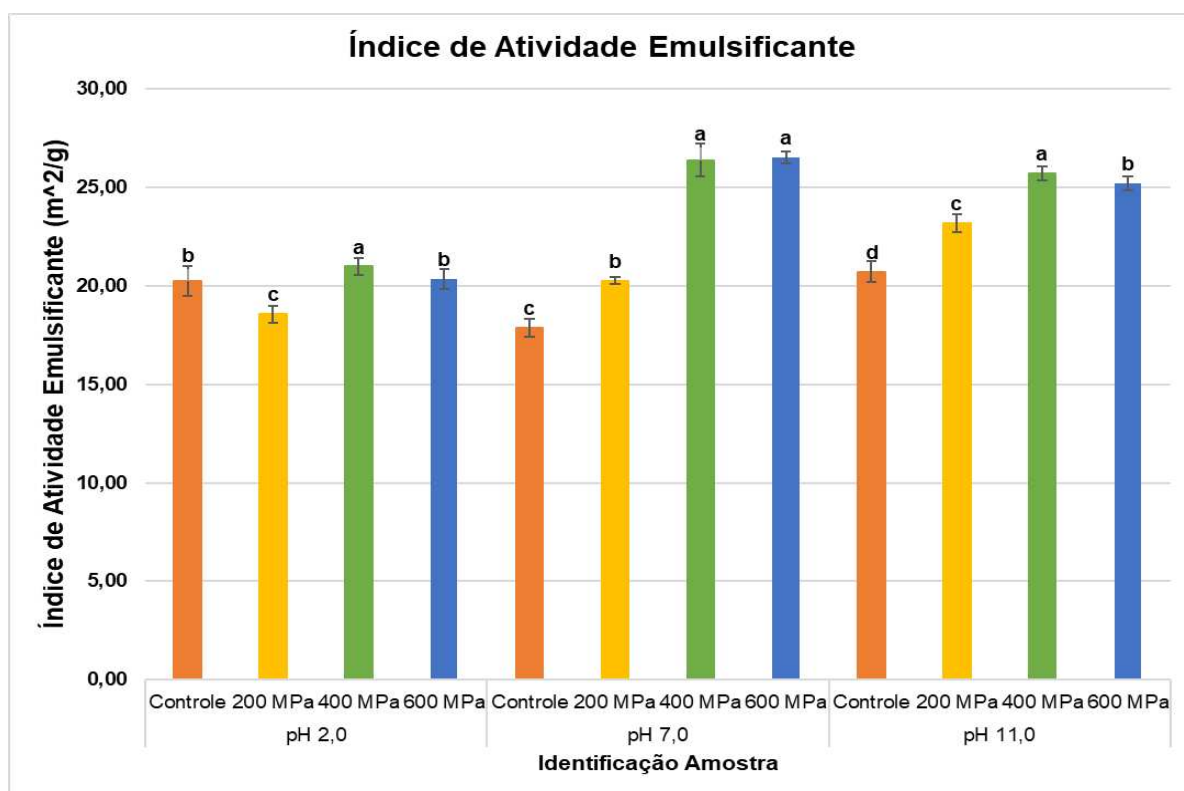
Em relação as amostras processadas nos pHs 7,0 e 11,0 não foi possível obter valores para esta característica, pois ao executar a metodologia descrita no item 4.2.7.2, na etapa de verter os tubos de eppendorf, empregada para escoar o excesso de água, havia a saída da água com grande parte da amostra. Assim, como a análise se baseia na diferença de peso entre a amostra hidratada e a amostra seca, ao sair parte da massa de amostra hidratada tem-se uma diferença negativa que não tem sentido prático para avaliar a CRA da amostra.

Comparando este achado com a literatura, Tang & Roos & Miao (2023), em trabalho que avaliou comparativamente o efeito do pH nas propriedades tecno-estruturais de isolado proteico de Soro de Leite, Caseinato, Grão-de-bico, Ervilha, Soja, e de Lentilha; os autores obtiveram o mesmo achado para a CRA do isolado de Lentilha e de Grão-de-Bico. A explicação para a ocorrência deste fenômeno, passa pela avaliação de solubilidade destes isolados, os quais os autores relataram serem maiores do que 90% em pH 7,0 de análise (TANG; ROOS; MIAO, 2023). Assim, pelo fato de as proteínas estarem quase completamente solubilizadas, elas não conseguem reter água em sua estrutura. Avaliando os resultados de solubilidade deste trabalho, também obtivemos altas solubilidades (acima de 80%). O controle em pH 7,0 obteve solubilidade intermediária (cerca de 70%), fato que já possibilitou a medição da CRA. Cabe destacar que nos referidos pHs não foi possível avaliar o impacto na CRA, pois as amostras apresentaram solubilidade elevada, inclusive nos controles.

Em resumo, o uso do HPP combinado com mudança de pH ácido (2,0) resultou na redução da CRA. Para uma condição neutra de pH (7,0) ou mesmo alcalina (11,0) devido à elevada solubilidade nestas condições não foi possível observar impactos na CRA dos isolados proteicos.

5.5.4. Índice de Atividade Emulsificante (IAE) e Estabilidade Emulsificante (EEM)

O IAE avalia a capacidade da proteína analisada de atuar adsorvida na interface água-óleo, por isso o valor é expresso em unidades de área estabilizada por unidade de massa da proteína. Já o EEM é responsável pela avaliação das propriedades da camada adsorvida que foi formada, e tem como unidade de medida o tempo em minutos (AHMED et al., 2018). As Figuras 32 e 33 apresentam os resultados consolidados para a IAE e a EEM das amostras de isolado proteico de tremçoço.



Onde: Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras dentro do mesmo pH avaliado que apresentaram letras diferentes pelo teste *post-hoc* de Tukey). Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 32 - Índice de Atividade Emulsificante.

Analisando a Figura 32, para o pH 2,0 de processo, o maior valor de IAE obtido foi em 400 MPa ($20,98 \pm 0,44 \text{ m}^2/\text{g}$) seguido dos valores no controle ($20,24 \pm 0,75 \text{ m}^2/\text{g}$) e em 600 MPa ($20,34 \pm 0,52 \text{ m}^2/\text{g}$), sendo que estes 2 valores não diferiram significativamente ($p < 0,05$) e em 200 MPa ($18,57 \pm 0,43 \text{ m}^2/\text{g}$) foi o menor valor.

Em relação ao pH 7,0 de processo, este apresentou um comportamento positivo de IAE em relação a pressão, ou seja, conforme aumentou-se a pressão aplicada, maior foi o valor obtido de IAE. Os valores em 400 MPa ($26,39 \pm 0,81 \text{ m}^2/\text{g}$) e em 600 MPa ($26,54 \pm 0,31 \text{ m}^2/\text{g}$) foram os maiores tanto para o referido pH de processo, quanto para os demais pHs de processo, mas não diferiram entre si. O valor em 200 MPa ($20,27 \pm 0,19 \text{ m}^2/\text{g}$) foi maior que o controle ($17,87 \pm 0,46 \text{ m}^2/\text{g}$) e diferiu significativamente ($p < 0,05$) deste.

Para o pH 11,0 de processo, o valor de IAE foi o maior em 400 MPa ($25,72 \pm 0,36 \text{ m}^2/\text{g}$). O segundo maior valor foi em 600 MPa ($25,21 \pm 0,35 \text{ m}^2/\text{g}$) e o terceiro foi em 200 MPa ($23,18 \pm 0,45 \text{ m}^2/\text{g}$), sendo que todas as pressões obtiveram valores maiores do que o controle ($20,72 \pm 0,54 \text{ m}^2/\text{g}$).

Com relação aos resultados dos controles, comparando as IAE com dados da literatura, pôde-se verificar que estes estão de acordo com os resultados obtidos por Nahimana *et al.* (2023). Neste estudo, que avaliou o efeito dos métodos de extração de lipídios (à quente com hexano e a frio com mistura de clorofórmio-metanol) nas tecno-funcionalidades de isolados proteicos de tremçoço branco os autores obtiveram: $23,4 \text{ m}^2/\text{g}$ para o controle (sem desengorduramento), $27,25 \text{ m}^2/\text{g}$ para o isolado desengordurado à frio e $26,1 \text{ m}^2/\text{g}$ para o isolado desengordurado à quente (NAHIMANA et al., 2023).

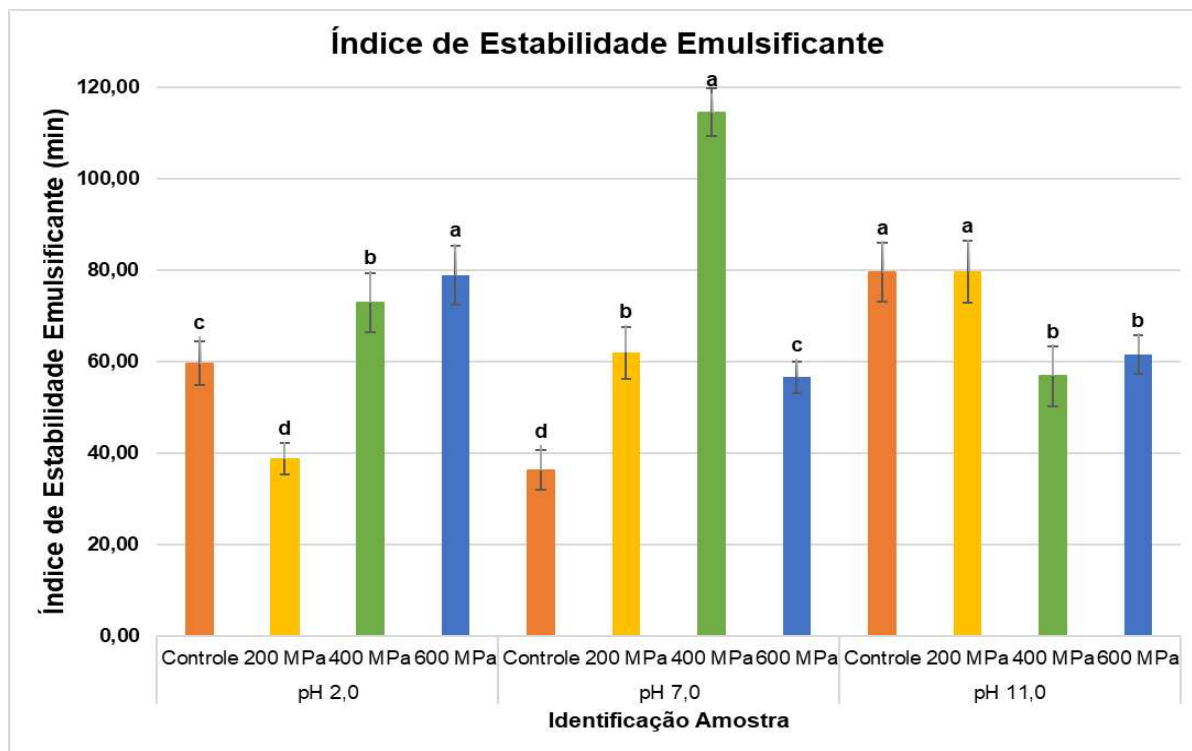
Uma explicação para o comportamento da IAE observada neste trabalho passa pelo entendimento da combinação de fatores que influenciam nesta propriedade. Dentre eles, para uma boa IAE é necessário ter um equilíbrio entre os grupos capazes de interagir com a água (grupos hidrofílicos) e com o óleo (grupos hidrofóbicos), para se ter a redução na tensão interfacial. Esse equilíbrio é avaliado por meio dos valores de solubilidade e hidrofobicidade superficial. Além disso, como a proteína vai atuar adsorvida em uma interface que apresenta uma estrutura

tridimensional (gota), é importante que a proteína também possua boa flexibilidade molecular para que forme um filme capaz de recobrir toda a superfície (MULLA; SUBRAMANIAN; DAR, 2022; QUEIRÓS; SARAIVA; DA SILVA, 2018).

Assim, para a modificação destes fatores a alta pressão é apontada na literatura com uma alternativa, sendo associado o aumento da pressão com mudanças na conformação que se iniciam com a dissociação proteica (rompimento das estruturas quaternárias), seguido de desdobramentos parciais (em pressões intermediárias – 400 MPa) e formação de novas estruturas (pressões altas – 600 MPa) (AHMED et al., 2018; QUEIRÓS; SARAIVA; DA SILVA, 2018).

No pH 2,0 de processo, houve pouca mudança nesta propriedade, pois foi muito impactada pela baixa solubilidade das amostras (frente aos demais pHs de processo), resultante das alterações conformacionais nas proteínas que puderam ser observadas com a formação de grandes agregados (evidenciada pela distribuição de tamanho de Partículas). Aliado a isso, há a consequência da formação destes grandes agregados na hidrofobicidade das amostras que foi reduzida (apresentando valores menores do que o controle). Possivelmente outro impacto importante da formação destes grandes agregados é a redução da flexibilidade molecular para melhor atuação na interface água-óleo.

Para os pHs 7,0 e 11,0 de processo, as solubilidades foram altas (acima de 80%) e a hidrofobicidade seguiu comportamento semelhante aos valores de IAE. Aliado a isso, tem-se que o tremço possui grande quantidade de α -conglutina e β -conglutina (cerca de 80% das globulinas, que são o maior grupo de proteínas presentes no tremço – cerca de 87% das proteínas são globulinas), que são vicilinas e possuem baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados (BOUKID; PASQUALONE, 2022; JIMENEZ-LOPEZ, 2020). Esta característica favorece a atuação da pressão na modificação conformacional da proteína, conforme relatado por diversos autores (AHMED et al., 2018; MULLA; SUBRAMANIAN; DAR, 2022).



Onde: Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras dentro do mesmo pH avaliado que apresentaram letras diferentes pelo teste *post-hoc* de Tukey). Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 33 - Índice de Estabilidade Emulsificante

Em relação a Figura 33, o processo em pH 2,0 apresentou o maior valor de EEM em 600 MPa ($78,77 \pm 6,48$ min) e o segundo maior valor em 400 MPa ($72,72 \pm 6,49$ min) sendo que estes diferiram estatisticamente. O controle apresentou o terceiro maior valor ($59,19 \pm 4,77$ min) e diferiu estatisticamente para a amostra em 200 MPa ($38,60 \pm 3,47$ min).

Para o pH 7,0 de processo, o comportamento da EEM apresentou o maior valor em 400 MPa ($114,44 \pm 5,24$ min). O segundo e o terceiro maior valor foi, respectivamente, a 200 MPa ($61,86 \pm 5,67$ min) e a 600 MPa ($56,45 \pm 3,34$ min). O controle foi estatisticamente menor que os demais ($36,21 \pm 4,34$ min).

Em relação ao pH 11,0 de processo, a aplicação de pressão até 200 MPa ($79,60 \pm 6,74$ min) não causou mudança no valor de EEM em relação ao controle ($79,35 \pm 6,44$ min). No entanto, para as amostras processadas em 400 MPa ($56,68 \pm 6,47$ min) e 600 MPa ($61,44 \pm 4,27$ min) houve redução significativa do valor desta propriedade quando comparadas ao controle.

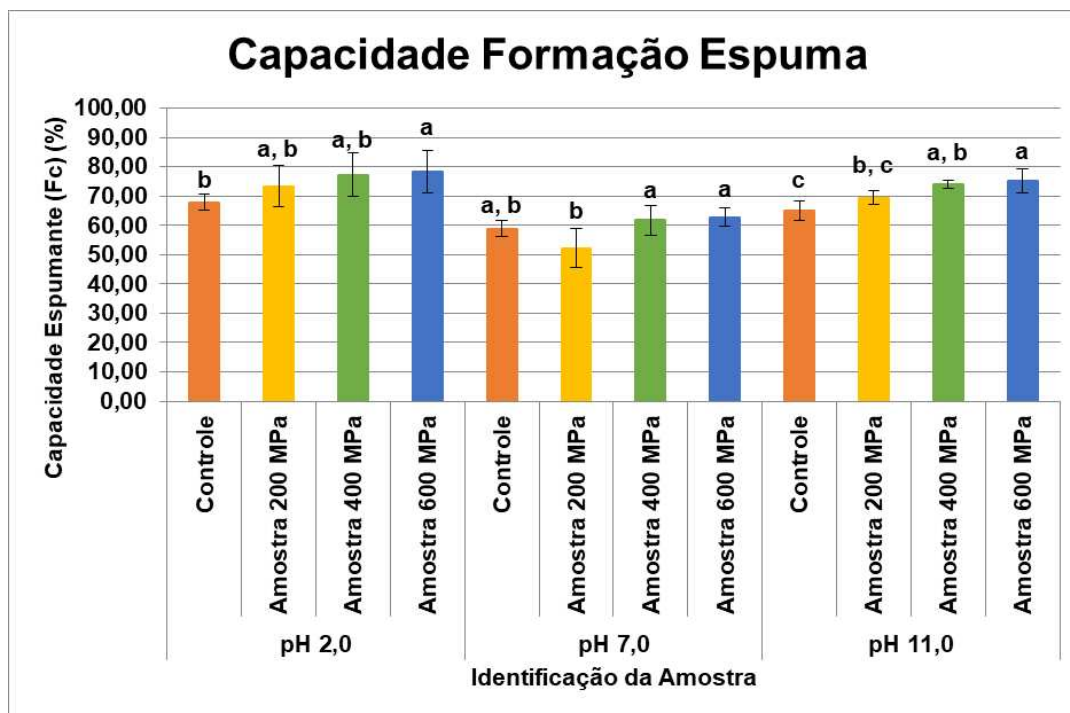
Para as alterações na EEM observadas neste trabalho, diferentemente da IAE que de modo geral melhora com a aplicação de pressão, a estabilidade não apresenta o mesmo comportamento. Isso ocorre, pois a IAE e a EEM são afetadas por propriedades moleculares antagônicas (LIN; FERNÁNDEZ-FRAGUAS, 2020). Enquanto para a IAE é muito importante a capacidade de recobrimento de toda a superfície (flexibilidade molecular), para a EEM é importante a formação de um filme viscoelástico estável. Por isso, há na literatura trabalhos que obtiveram agregação proteica em amostras submetidas à HPP e estes contribuíram para a estabilização do filme interfacial. Chapleau & de Lamballerie-Anton (2003), em trabalho com amostras de *Lupinus albus* tratadas em 3 pressões (200, 400 e 600 MPa) por 10 min, relataram a formação de agregados acima de 400 MPa para as frações de α -conglutina. Em 600 MPa, a fração de β -conglutina também contribuiu significativamente para a formação de agregados, responsáveis pela estabilização das emulsões avaliadas. O achado desses autores pode ser confirmado nos resultados da EEM para o pH 7,0 de processo.

Com isso, de modo geral pode-se observar que a mudança de pH atuando de forma isolada proporcionou em aumento no IAE. Já para o HPP combinado à mudança de pH, o aumento da pressão resultou em aumento da IAE das amostras. Para a EEM, o aumento da pressão resultou em melhoria desta nos pHs 2,0 e 7,0, enquanto que no pH 11,0 as amostras apresentaram redução nos valores desta propriedade.

5.5.5. Capacidade de Formação de Espuma (CFE) e Estabilidade Espuma (EE)

As espumas estão presentes em diversos alimentos consumidos diariamente, em uma gama de produtos que engloba produtos panificados, bebidas e sobremesas. Apesar disso, um desafio ao desenvolver um produto com esta característica é que espumas são termodinamicamente instáveis. Isso se deve a existência de tensão superficial entre as bolhas de ar e a fase contínua (AMAGLIANI et al., 2021). Por isso, é interessante o uso de moléculas com atividade superficial para atuarem adsorvidas entre a interface ar-água, reduzindo a tensão superficial entre as fases. Proteínas possuem natureza anfifílica, ou seja, possuem resíduos de

aminoácidos polares e apolares e isso torna as proteínas aptas a atuarem como surfactantes (AVELAR et al., 2021). A Figura 34, a seguir apresenta os valores consolidados das amostras de isolado proteico de tremçoço.



Onde: Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras dentro do mesmo pH avaliado que apresentaram letras diferentes pelo teste *post-hoc* de Tukey). Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 34 - Capacidade de Formação de Espuma.

A partir da análise da Figura 34, para o pH 2,0 de processo, tem-se que a amostra a 600 MPa ($78,33 \pm 7,23$ %) apresentou o maior CFE e diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) para o controle ($67,78 \pm 2,72$ %). Já os valores em 200 MPa ($73,33 \pm 6,99$ %) e em 400 MPa ($77,22 \pm 7,43$ %), estes não diferiram estatisticamente do controle e da amostra em 600 MPa.

Para o pH 7,0 de processo, as amostras em 400 MPa ($61,67 \pm 5,05$ %) e 600 MPa ($62,78 \pm 3,28$ %) foram os maiores valores, mas não diferiram significativamente ($p < 0,05$) para o controle ($58,89 \pm 2,72$ %). Já a amostra em 200 MPa ($52,22 \pm 6,55$ %) apresentou o menor valor.

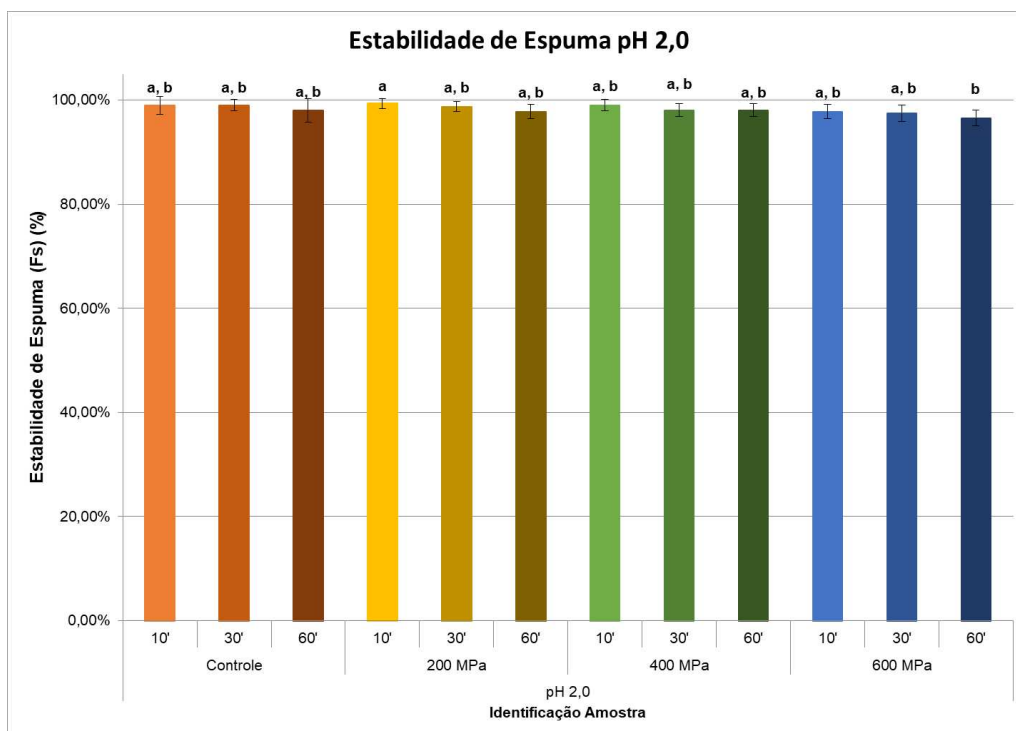
Em relação ao pH 11,0 de processo, a amostra em 600 MPa ($75,00 \pm 4,08$ %) apresentou o maior e não diferiu significativamente ($p < 0,05$) para a condição em

400 MPa ($73,89 \pm 1,36 \%$). O controle ($65,00 \pm 3,50 \%$) foi significativamente menor que as condições em 400 e 600 MPa. As condições 200 e 400 MPa não diferiram significativamente ($p < 0,05$).

Com relação aos mecanismos que explicam os resultados obtidos de CFE, tem-se que são semelhantes aos descritos para o processo de emulsificação proteica. Assim, sabe-se que a aplicação de pressão ocasiona o desdobramento das estruturas proteicas e isso muda as características de solubilidade/hidrofobicidade (balanço entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos) além da flexibilidade molecular (LI et al., 2011). De modo semelhante observou-se para as amostras em pH 11,0 de processo, as quais mantiveram uma elevada solubilidade ou mesmo aumentaram e a hidrofobicidade também aumentou. Aliado a isso, também houve redução no tamanho de partícula.

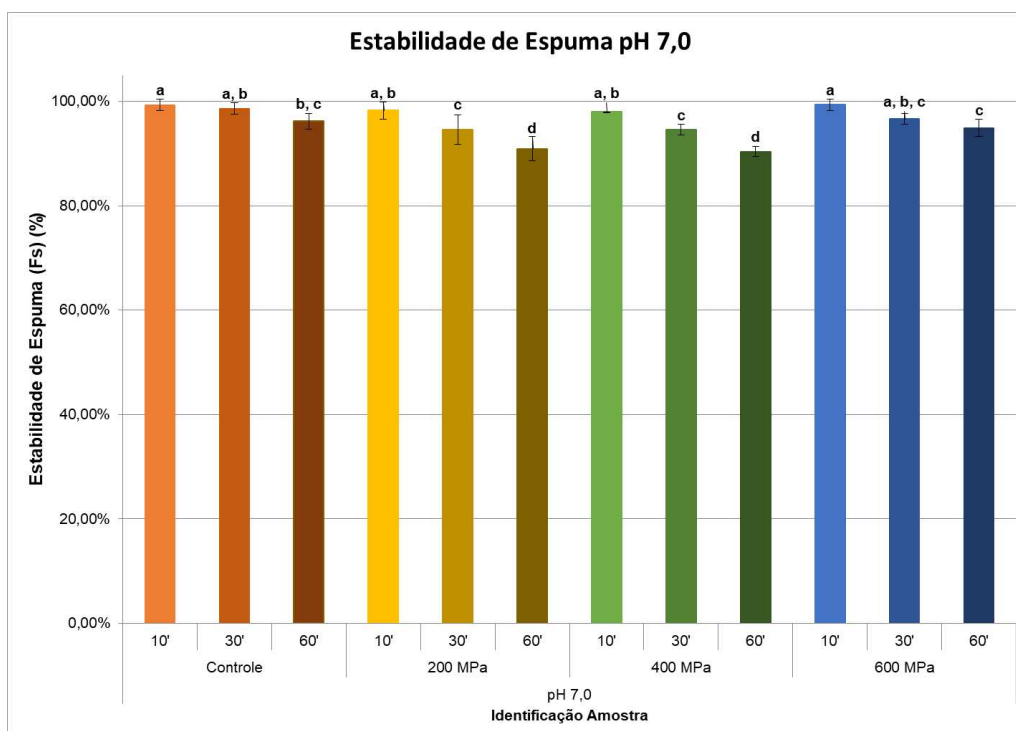
No caso da CFE das amostras em pH 2,0 esta apresentou aumento, pois observou-se a combinação de redução na hidrofobicidade e na solubilidade, o que manteve em equilíbrio as interações entre as fases apolares e polares. Aliado a isto, tem-se pequena redução no tamanho das partículas com o aumento da pressão o que favoreceu na redução da rigidez molecular. Já para o pH 7,0 de processo, apesar de ter aumentado os valores de solubilidade e hidrofobicidade, houve uma redução na flexibilidade molecular uma vez que houve o aumento do tamanho médio das partículas, por isso, não houve melhora significativa em relação ao controle.

As Figuras 35 a 37 apresentam os valores de EE das amostras avaliadas entre 10 e 60 minutos de análise.

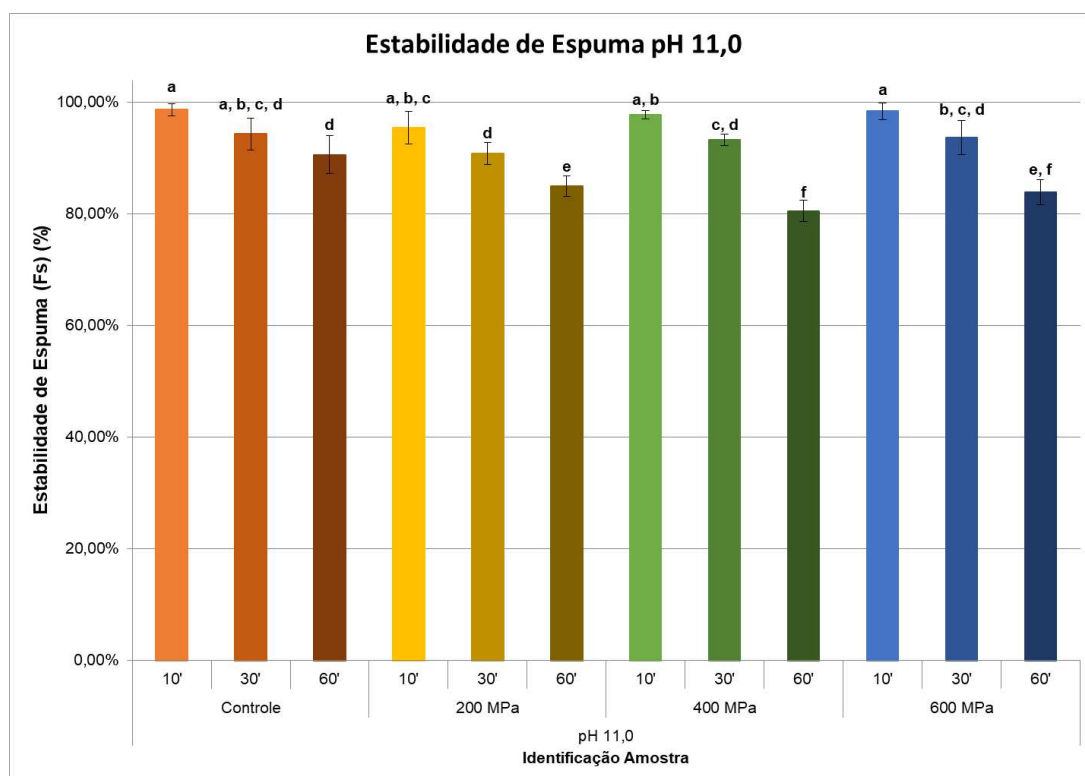


Onde: Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras dentro do mesmo pH avaliado que apresentaram letras diferentes pelo teste *post-hoc* de Tukey). Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 35 - Estabilidade de Espuma no pH 2,0 de processamento.



Onde: Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras dentro do mesmo pH avaliado que apresentaram letras diferentes pelo teste *post-hoc* de Tukey). Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 36 - Estabilidade de Espuma no pH 7,0 de processamento.

Onde: Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras dentro do mesmo pH avaliado que apresentaram letras diferentes pelo teste *post-hoc* de Tukey). Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, seguindo protocolo padrão.

Figura 37 - Estabilidade de Espuma no pH 11,0 de processamento.

Da análise dos gráficos de estabilidade de espuma, pôde-se avaliar para o pH 2,0 de processo, que a variação de pressão não foi suficiente para causar grandes mudanças na EE das amostras. Apenas as amostras em 200 MPa após 10 min e em 600 MPa após 60 min diferiram significativamente ($p < 0,05$).

Para o pH 7,0 de processo, houve maior discrepância com a aplicação de pressão. O controle se manteve o mais estável durante a análise, seguido da amostra em 600 MPa. As amostras em 400 MPa e 600 MPa apresentaram comportamento similar, mas com estabilidade significativamente menor após 60 minutos.

Em relação ao pH 11,0 de processo, este foi o que apresentou as maiores diferenças, evidenciando que a mudança de pH também contribuiu para a piora na estabilidade da espuma. Novamente, o controle foi o mais estável durante a análise.

As 3 pressões aplicadas apresentaram comportamentos similares. De modo semelhante a relação existente entre IAE e EEM, ocorre para a CFE e EE, uma melhor CFE resulta em uma piora na estabilidade desta conforme foi observado nas amostras de isolado proteico (LI et al., 2011; SINGH; RAMASWAMY, 2015; WANG et al., 2022a).

Assim, de modo geral, a aplicação de pressão resultou no aumento da CFE. Para as amostras em diferentes pHs e sem altas pressões, o pH influenciou na CFE sendo que nos pHs extremos (2,0 e 11,0) houve incremento nesta propriedade. Para a EE, a aplicação de pressão resultou em uma menor estabilidade principalmente nas amostras processadas a pH 11,0. Para os controles, o uso de pH ácido não impactou na estabilidade, enquanto que o pH neutro e alcalino resultaram em menor estabilidade.

6. CONCLUSÃO

A utilização da tecnologia emergente de alta pressão hidrostática combinada à técnica de processamento em pHs diferentes do pH nativo (pH-*shifting*) se mostrou uma ferramenta promissora para induzir modificações nos diversos níveis estruturais das proteínas de tremçoço branco. O conteúdo de estruturas secundárias foi modificado havendo a conversão de estruturas ordenadas (α -hélice e β -folha) a estruturas mais desordenadas (Bobinas aleatórias e β -volta), bem como houve a formação de agregados com tamanhos mais homogêneos com o aumento da pressão. Essas mudanças de estrutura ocasionaram alterações na exposição de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, o que impactaram na atividade superficial dessas proteínas e, conseqüentemente, resultou em modificações das propriedades tecno-funcionais dos isolados proteicos. A exposição de grupos hidrofóbicos aliado a maior flexibilidade proteica (pelo aumento de estruturas desordenadas) aumentou a IAE e a CFE. Essa maior flexibilidade estrutural com o uso do HPP, também permitiu incrementar a interação proteína-solvente (água), por isso, houve melhoria da solubilidade. O pH neste aspecto, acabou prejudicando as amostras em pH 2,0, uma vez que a passagem pelo PI favoreceu a interação proteína-proteína, evidenciado pela formação dos agregados de maior tamanho em relação aos demais pHs. Portanto, este estudo foi capaz de apresentar ferramentas viáveis direcionadas a obtenção de uma gama de ingredientes a partir de uma proteína de origem vegetal com funcionalidades que podem ser ajustadas para diferentes aplicações (*“tailor made”*) na indústria de alimentos, como por exemplo, as solubilidades e capacidades emulsificantes que podem ser direcionadas à indústria de bebidas ácidas, smoothies, produtos cárneos ou análogos, maionese/molhos para salada, etc.

REFERÊNCIAS

ACHOURI, A.; BOYE, J. I. Thermal processing, salt and high pressure treatment effects on molecular structure and antigenicity of sesame protein isolate. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 240–251, ago. 2013.

AGANOVIC, K. et al. **Aspects of high hydrostatic pressure food processing: Perspectives on technology and food safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** Blackwell Publishing Inc., , 1 jul. 2021.

AHMED, J. et al. Effect of high pressure treatment on functional, rheological and structural properties of kidney bean protein isolate. **LWT**, v. 91, p. 191–197, 1 maio 2018.

AL-ALI, H. A. et al. **Technological strategies to improve gelation properties of legume proteins with the focus on lupin. Innovative Food Science and Emerging Technologies** Elsevier Ltd, , 1 mar. 2021.

AMAGLIANI, L. et al. On the foaming properties of plant proteins: Current status and future opportunities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 118, p. 261–272, 2021.

AÑÓN, M. C.; DE LAMBALLERIE, M.; SPERONI, F. Effect of high pressure on solubility and aggregability of calcium-added soybean proteins. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 155–162, 2012.

AVELAR, Z. et al. **The role of emergent processing technologies in tailoring plant protein functionality: New insights. Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 jul. 2021.

BADER, S.; BEZ, J.; EISNER, P. Can protein functionalities be enhanced by high-pressure homogenization? – A study on functional properties of lupin proteins. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1359–1366, 2011.

BHAGAVAN, N. . V.; HA, C. E. Three-Dimensional Structure of Proteins and Disorders of Protein Misfolding. Em: BHAGAVAN, N. . V.; HA, C. E. (Eds.). **Essentials of Medical Biochemistry With Clinical Cases**. 2. ed. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 29–38.

BOUKID, F.; PASQUALONE, A. **Lupine (Lupinus spp.) proteins: characteristics, safety and food applications. European Food Research and Technology** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 fev. 2022.

BRAGA, A. F. **ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE CORDAS-DE-VIOLA**. Jaboticabal: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP, 2021.

CALDERÓN-CHIU, C. et al. Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) leaf as a new source to obtain protein hydrolysates: Physicochemical characterization, techno-functional properties and antioxidant capacity. **Food Hydrocolloids**, v. 112, 1 mar. 2021.

CAMMILLERI, G. et al. Polyphenols of white lupin (*Lupinus albus* L.) seeds cultivated in Southern Italy by a LC-HRMS method. **Natural Product Research**, v. 38, n. 16, p. 2864–2868, 2024.

CAO, J. et al. Effect of high hydrostatic pressure on chlorophyll/soybean protein isolate interaction and the mixtures properties. **Food Hydrocolloids**, v. 128, 1 jul. 2022.

CARVAJAL-LARENAS, F. E. et al. Effect of processing on the diffusion of alkaloids and quality of *Lupinus Mutabilis* sweet. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 4, p. 1461–1471, 2014.

CHAKRABORTY, S. et al. **High-pressure inactivation of enzymes: A review on its recent applications on fruit purees and juices**. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** Blackwell Publishing Inc., , 2014.

CHAPLEAU, N.; DE LAMBALLERIE-ANTON, M. Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 273–280, 2003.

DAY, L. **Protein: Food Sources**. Palmerston North, New Zealand: AgResearch Ltd., , 2016. (Nota técnica).

DE CASTRO, H. C.; MACIEL, M. E.; MACIEL, R. A. Comida, cultura e identidade: conexões a partir do campo da gastronomia. **Ágora**, v. 18, n. 1, p. 18, 14 out. 2016.

DE LIMA FILHO, O. F. Embrapa Pulses alternativas. 2019.

DENG, Q. et al. Functional properties of protein isolates, globulin and albumin extracted from Ginkgo biloba seeds. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1458–1465, 2011.

DENG, Y. et al. Physicochemical and functional properties of Chinese quince seed protein. **Food Chemistry**, v. 283, p. 539–548, 2019.

DENG, Z. et al. Modification of pepper seed protein isolate to improve its functional characteristic by high hydrostatic pressure. **Food Chemistry**, v. 464, 1 fev. 2025.

DEVKOTA, L. et al. Structural and Thermal Characterization of Protein Isolates from Australian Lupin Varieties as Affected by Processing Conditions. **Foods**, v. 12, n. 5, 1 mar. 2023.

DNYANESHWAR PATIL, N. et al. Influence of dual succinylation and ultrasonication modification on the amino acid content, structural and functional properties of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate. **Food Chemistry**, v. 445, 1 jul. 2024.

DOMÍNGUEZ, R. et al. Optimization and Characterization of Lupin Protein Isolate Obtained Using Alkaline Solubilization-Isoelectric Precipitation. **Foods**, v. 12, n. 20, 1 out. 2023.

EWBANK, J. J.; CREIGHTON, T. E. The molten globule protein conformation probed by disulphide bonds. **Nature**, v. 350, p. 518–520, 1991.

FANG, L. et al. Enhancing the Usability of Pea Protein Isolate in Food Applications through Modifying Its Structural and Sensory Properties via Deamidation by Glutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 6, p. 1691–1697, 12 fev. 2020.

GALVÃO, A. M. M. T. et al. Lentil protein isolate (*Lens culinaris*) subjected to ultrasound treatment combined or not with heat-treatment: structural characterization and ability to stabilize high internal phase emulsions. **Food Research International**, v. 183, p. 1–13, 2024.

GROSSMANN, L.; MACCLEMENTS, D. J. Current insights into protein solubility: A review of its importance for alternative proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 137, p. 1–21, 2023.

GUO, W. et al. Unveiling the impact of high pressure processing on anthocyanin-protein/polysaccharide interactions: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 270, n. 132042, p. 1–13, 2024.

GUO, X. et al. Modification of food macromolecules using dynamic high pressure. **Trends in Food Science & Technology**, v. 100, p. 223–234, 2020.

HASSOUN, A. et al. **The fourth industrial revolution in the food industry—part II: Emerging food trends. Critical Reviews in Food Science and Nutrition** Taylor and Francis Ltd., , 2024.

HORWITZ, WILLIAM. **Official methods of analysis of AOAC International**. [s.l.] AOAC International, 2006.

HUTCHINGS, J. B.; RONNIER LUO, M.; JI, W. Food appearance quality assessment and specification. Em: **Instrumental Assessment of Food Sensory Quality: A Practical Guide**. Kilcast, David ed. [s.l.] Woodhead Publishing, 2013. p. 29–52.

IGANCI, J. R. V.; MIOTTO, S. T. S. Flora do Brasil 2020. Em: **Flora do Brasil 2020**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM - ITIS. **report lupinus species ITIS.pdf**. [s.l.: s.n.]. Disponível em:
<https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=25916&print_version=SCR&source=from_print#null>.

ITAL. **Indústria de alimentos 2030**. Campinas - SP: [s.n.].

JIANG, J.; WANG, Q.; XIONG, Y. L. A pH shift approach to the improvement of interfacial properties of plant seed proteins. **Curent opinions in food science**, v. 19, p. 50–56, 2018.

JIANG, J.; XIONG, Y. L.; CHEN, J. PH shifting alters solubility characteristics and thermal stability of soy protein isolate and its globulin fractions in different pH, salt concentration, and temperature conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 8035–8042, 14 jul. 2010.

JIMENEZ-LOPEZ, J. C. Narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) β -conglutin: A multifunctional family of proteins with roles in plant defence, human health benefits, and potential uses as functional food. **Legume Science**, v. 2, n. 2, 1 jun. 2020.

KRAUSE, B. et al. Dispersability and particle size distribution of CNTs in an aqueous surfactant dispersion as a function of ultrasonic treatment time. **Science Direct**, v. 48, p. 2746–2754, 2010.

LI, H. et al. Effects of high hydrostatic pressure on some functional and nutritional properties of soy protein isolate for infant formula. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 22, p. 12028–12036, 23 nov. 2011.

LI, J. et al. Effect of pH-shifting treatment on structural and heat induced gel properties of peanut protein isolate. **Food Chemistry**, v. 325, p. 1–10, 2020.

LIN, T.; FERNÁNDEZ-FRAGUAS, C. Effect of thermal and high-pressure processing on the thermo-rheological and functional properties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. **LWT- Food Science and Technology**, v. 127, p. 1–12, 2020.

LUO, L. et al. Impacts of sonication and high hydrostatic pressure on the structural and physicochemical properties of quinoa protein isolate dispersions at acidic, neutral and alkaline pHs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 91, 1 dez. 2022.

MA, X.; HABIBI, M.; SAGIS, L. M. C. Interfacial and foaming properties of soluble lupin protein isolates: Effect of pH. **Food Hydrocolloids**, v. 155, n. 110228, p. 1–12, 2024.

MACDOUGALL, D. B. SENSORY EVALUATION | Appearance. Em: CABALLERO, B. (Ed.). **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2. ed. [s.l.] Academic Press, 2003. p. 5161–5167.

MANE, S. P. et al. **Lupin seed γ -conglutin: Extraction and purification methods - A review**. **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 mar. 2018.

MEDINA-MEZA, I. G. et al. Effects of thermal and high pressure treatments in color and chemical. **LWT- Food Science and Technology**, v. 60, p. 86–94, 2015.

MIANO, A. C.; GARCÍA, J. A.; AUGUSTO, P. E. D. Correlation between morphology, hydration kinetics and mathematical models on Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) grains. **LWT**, v. 61, n. 2, p. 290–298, 1 maio 2015.

MOHAMED, A. A.; RAYAS-DUARTE, P. Composition of *Lupinus albus*. **Cereal Chemistry**, v. 72, n. 6, p. 643–647, 1995.

MOKRZYCKI, W.; TATOL, M. **Color difference Delta E-A survey Colour difference $\Delta E-A$ survey**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/236023905>>.

MOORE, K. G.; BENTLEY, K.; LOVELL, P. H. A Comparative Study of Chlorophyll Production in Cotyledons. **Journal of Experimental Botany**, v. 23, n. 75, p. 432–441, 1972.

MULLA, M. Z.; SUBRAMANIAN, P.; DAR, B. N. Functionalization of legume proteins using high pressure processing: Effect on technofunctional properties and digestibility of legume proteins. **LWT**, v. 158, 15 mar. 2022.

NAHIMANA, P. et al. Impact of defatting methods on the physicochemical and functional properties of white lupin protein isolates. **European Food Research and Technology**, v. 249, n. 9, p. 2387–2400, 1 set. 2023.

NAVARE, S. S. **EFFECT OF HIGH PRESSURE PROCESSING ON SELECTED PHYSICOCHEMICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF YELLOW LENTIL PROTEIN CONCENTRATE**. [s.l: s.n.].

NAVARE, S. S.; KARWE, M. V.; SALVI, D. Effect of high pressure processing on selected physicochemical and functional properties of yellow lentil protein concentrate. **Food Chemistry Advances**, v. 3, 1 dez. 2023.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela Brasileira de Composicao de Alimentos - TACO 4 Edicao Ampliada e Revisada**. Campinas: [s.n.].

PENCHALARAJU, M.; JOHN DON BOSCO, S. Legume protein concentrates from green gram, cowpea, and horse gram. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 4, 1 abr. 2022.

PEYRANO, F.; SPERONI, F.; AVANZA, M. V. Physicochemical and functional properties of cowpea protein isolates treated with temperature or high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 38–46, 1 fev. 2016.

PILAR CANO, M. et al. Impact of high hydrostatic pressure and thermal treatment on the stability and bioaccessibility of carotenoid and carotenoid esters in adstringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb, var. Rojo Brillante). **Food Research International**, v. 123, p. 538–549, 2019.

PIMENTEL, L. O. DE L. **Papel da Hidrofobicidade na Evolução de Proteínas**. São José do Rio Preto : UNESP, 2015.

PINTO, C. A. et al. Tailoring structure of foods using high hydrostatic pressure. Em: **Food Structure and Functionality**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 69–93.

PUPPO, C. et al. Physicochemical Modifications of High-Pressure-Treated Soybean Protein Isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1564–1571, 24 mar. 2004.

QUEIRÓS, R. P.; SARAIVA, J. A.; DA SILVA, J. A. L. Tailoring structure and technological properties of plant proteins using high hydrostatic pressure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 9, p. 1538–1556, 13 jun. 2018.

RAWAL, V. et al. Pulses: Nutritional Benefits and Consumption Patterns. Em: RAWAL, V. ;; NAVARRO, D. K. (Eds.). **The Global Economy of Pulses**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2019. p. 9–19.

ROCHA, C. P. V. DA; RIAL, C. S.; HELLEBRANDT, L. Alimentação, globalização e interculturalidade alimentar a partir do contexto migratório. **Cadernos de Pesquisa Interdisciplinar em Ciências Humanas**, v. 14, n. 105, 20 dez. 2013.

RODRIGUES, I. M.; COELHO, J. F. J.; CARVALHO, M. G. V. S. **Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential**. **Journal of Food Engineering** Elsevier Ltd, , 2012.

RODRIGUEZ-SAONA, L.; AYVAZ, H.; WEHLING, R. L. Infrared and Raman Spectroscopy. Em: NIELSEN, S. S. (Ed.). **Food Analysis**. 5. ed. West Lafayette: Springer, 2017. p. 107–128.

SARICA OGLU, 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, 1 fev. 2020.

SHAGHAGHIAN, S. et al. **Digestibility and bioavailability of plant-based proteins intended for use in meat analogues: A review**. **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 nov. 2022.

SHEVKANI, K. et al. **Pulse proteins: secondary structure, functionality and applications**. **Journal of Food Science and Technology** Springer, , 1 jun. 2019.

SHRESTHA, S. et al. **Lupin proteins: Structure, isolation and application. Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 out. 2021.

SILVA, C. M. et al. Guia para Caracterização Tecnológica-Funcional de Ingredientes Proteicos para o Mercado de Produtos de Origem Vegetal. p. 1–26, 2022.

SINGH, A.; RAMASWAMY, H. S. High pressure modification of egg components: Exploration of calorimetric, structural and Functional characteristics. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 32, p. 45–55, 2015.

SINGHARAJ, S.; ONSAARD, E. Production and characteristic of sesame proteins. **Original Research Article Journal of Food Science and Agricultural Technology**, v. 1, n. 1, p. 188–192, 2015.

STINCO, C. M. et al. Effect of high-pressure processing on carotenoids profile, colour, microbial and enzymatic stability of cloudy carrot juice. **Food Chemistry**, v. 299, p. 1–7, 2019.

STÜBLER, A. S. et al. Impact of pilot-scale processing (thermal, PEF, HPP) on the stability and bioaccessibility of polyphenols and proteins in mixed protein- and polyphenol-rich juice systems. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 64, 1 ago. 2020.

SZCZEPAŃSKA, J. et al. High pressure processing of carrot juice: Effect of static and multi-pulsed pressure on the polyphenolic profile, oxidoreductases activity and colour. **Food Chemistry**, v. 307, p. 1–8, 2020.

TANG, C. H.; MA, C. Y. Effect of high pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate. **LWT**, v. 42, n. 2, p. 606–611, 2009.

TANG, Q.; ROOS, Y. H.; MIAO, S. Plant Protein versus Dairy Proteins: A pH-Dependency Investigation on Their Structure and Functional Properties. **Foods**, v. 12, n. 2, p. 1–19, 2023.

TANG, S. et al. Predicting Protein Surface Property with its Surface Hydrophobicity. **Protein & Peptide Letters**, v. 28, n. 8, p. 938–944, 23 fev. 2021a.

TANG, S. et al. Predicting Protein Surface Property with its Surface Hydrophobicity. **Protein & Peptide Letters**, v. 28, n. 8, p. 938–944, 23 fev. 2021b.

TANG, Z. X.; YING, R. F.; SHI, L. E. **Physicochemical and functional characteristics of proteins treated by a pH-shift process: a review.** *International Journal of Food Science and Technology* Blackwell Publishing Ltd, , 1 fev. 2021.

TIAN, Y. et al. The role of conformational state of pH-shifted β -conglycinin on the oil/water interfacial properties and emulsifying capacities. **Food Hydrocolloids**, v. 108, p. 1–8, 2020.

TIWARI, A. et al. Chemistry of high-pressure processing. Em: **Chemistry of Thermal and Non-Thermal Food Processing Technologies.** [s.l.] Elsevier, 2024. p. 111–136.

TIZAZU, H.; EMIRE, S. A. Chemical composition, physicochemical and functional properties of lupin (*lupinus albus*) seeds grown in ethiopia. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v. 10, n. 8, p. 3029–3046, 2010.

UCI. Z-Average size. **Particle Size Distribution**, p. 1–5, 2011.

VAN DER MEY, J. A. M. Crop development of *Lupinus* species in Africa. **South African Journal of Science**, v. 92, n. 2, p. 53–56, 1996.

VOGELSANG-O'DWYER, M. et al. Techno-functional, nutritional and environmental performance of protein isolates from blue lupin and white lupin. **Foods**, v. 9, n. 2, 2020.

WAGNER, J. R.; SORGENTINI, D. A.; AÑÓN, M. C. Thermal and Electrophoretic Behavior, Hydrophobicity, and Some Functional Properties of Acid-Treated Soy Isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1881–1889, 1996.

WANG, C. et al. Optimization of high hydrostatic pressure treatments on soybean protein isolate to improve its functionality and evaluation of its application in yogurt. **Foods**, v. 10, n. 3, 1 mar. 2021.

WANG, R. et al. Effects of high pressure modification on conformation and digestibility properties of oyster protein. **Molecules**, v. 24, n. 18, 9 set. 2019.

WANG, W. et al. **Effect of high hydrostatic pressure processing on the structure, functionality, and nutritional properties of food proteins: A review.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* John Wiley and Sons Inc, , 1 nov. 2022a.

WANG, Z. et al. Effect of Ionic Strength on Heat-Induced Gelation Behavior of Soy Protein Isolates with Ultrasound Treatment. **Molecules**, v. 27, n. 8221, p. 1–18, 2022b.

WOLKO, B. et al. Lupinus. Em: KOLE, C. (Ed.). **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Legume Crops and Forages**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 1–321.

XU, Y. et al. Structural and Functional Properties of Kabuli Chickpea Protein as Affected by High Hydrostatic Pressures. **ACS Food Science and Technology**, v. 4, n. 2, p. 528–536, 16 fev. 2024.

YAMAMOTO, K. **Food processing by high hydrostatic pressure**. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry, , 2017.

YAN, S. et al. Effect of pH-shifting treatment on the structural and functional properties of soybean protein isolate and its interactions with (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Process Biochemistry**, v. 101, p. 190–198, 2021.

YAN, X. et al. Tracking the driving forces for the unfolding and folding of kidney bean protein isolates: Revealing mechanisms of dynamic changes in structure and function. **Food Chemistry**, v. 402, n. 134230, p. 1–13, 2023.

YANG, J.; POWERS, J. R. Effects of High Pressure on Food Proteins. Em: BALASUBRAMANIAM, V. M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; LELIEVELD, H. L. M. (Eds.). **High Pressure Processing of Food: Principles, Technology and Applications**. New York: Springer, 2016. v. 1p. 353–389.

YAO, Y. et al. Release and conformational changes in allergenic proteins from wheat gluten induced by high hydrostatic pressure. **Food Chemistry**, v. 368, 30 jan. 2022.

ZAYAS, J. F. **Functionality of Proteins in Food**. 1. ed. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997.

ZHANG, J. et al. Synergistic modification of pea protein structure using high-intensity ultrasound and pH-shifting technology to improve solubility and emulsification. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 88, p. 1–11, 2022.

ZHOU, H. et al. Effects of high hydrostatic pressure treatment on structural, allergenicity, and functional properties of proteins from ginkgo seeds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 34, p. 187–195, 2016.

ZHU, S. M. et al. Enhancement of Functional Properties of Rice Bran Proteins by High Pressure Treatment and Their Correlation with Surface Hydrophobicity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 2, p. 317–327, 1 fev. 2017.

APÊNDICE

APÊNDICE A – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA NO pH 2,0

Solubilidade absoluta do isolado proteico de tremçoço processado por HPP à 200, 400 e 600 MPa em pH 2,0; 7,0 e 11,0

Amostra	Solubilidade Absoluta (mg/ml)
Controle x pH 2,0	1,5975 ± 0,06 ^h
200 MPa x pH 2,0	2,3525 ± 0,11 ^g
400 MPa x pH 2,0	2,8332 ± 0,16 ^f
600 MPa x pH 2,0	2,4115 ± 0,11 ^g
Controle x pH 7,0	5,3250 ± 0,05 ^b
200 MPa x pH 7,0	5,7585 ± 0,17 ^a
400 MPa x pH 7,0	4,3194 ± 0,11 ^e
600 MPa x pH 7,0	4,6733 ± 0,13 ^d
Controle x pH 11,0	5,0036 ± 0,07 ^c
200 MPa x pH 11,0	5,4400 ± 0,12 ^b
400 MPa x pH 11,0	4,1956 ± 0,26 ^e
600 MPa x pH 11,0	4,8296 ± 0,04 ^{c, d}

Onde: Valores foram expressos em média ± desvio padrão. Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras com letras diferentes pelo teste post-hoc de Tukey.

APÊNDICE B – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA EM pH 3,0

Solubilidade absoluta do isolado proteico de tremçoço processado por HPP à 200, 400 e 600 MPa em pH 2,0; 7,0 e 11,0

Amostra	Solubilidade Absoluta (mg/ml)
Controle x pH 2,0	1,3970 ± 0,03 ^g
200 MPa x pH 2,0	1,6949 ± 0,08 ^f
400 MPa x pH 2,0	1,4530 ± 0,09 ^g
600 MPa x pH 2,0	1,3587 ± 0,05 ^g
Controle x pH 7,0	4,2368 ± 0,09 ^b
200 MPa x pH 7,0	4,7441 ± 0,12 ^a
400 MPa x pH 7,0	3,5350 ± 0,19 ^c
600 MPa x pH 7,0	2,2817 ± 0,09 ^e
Controle x pH 11,0	4,6998 ± 0,11 ^a
200 MPa x pH 11,0	4,7028 ± 0,12 ^a
400 MPa x pH 11,0	2,6769 ± 0,07 ^d
600 MPa x pH 11,0	2,7005 ± 0,09 ^d

Onde: Valores foram expressos em média ± desvio padrão. Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras com letras diferentes pelo teste post-hoc de Tukey.

APÊNDICE C – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA EM pH 4,0

Solubilidade absoluta do isolado proteico de tremçoço processado por HPP à 200, 400 e 600 MPa em pH 2,0; 7,0 e 11,0

Amostra	Solubilidade Absoluta (mg/ml)
Controle x pH 2,0	0,1723 ± 0,01 ^h
200 MPa x pH 2,0	0,2024 ± 0,02 ^{f, g}
400 MPa x pH 2,0	0,2271 ± 0,01 ^{e, f}
600 MPa x pH 2,0	0,2006 ± 0,01 ^{f, g, h}
Controle x pH 7,0	0,1872 ± 0,01 ^{g, h}
200 MPa x pH 7,0	0,2606 ± 0,02 ^d
400 MPa x pH 7,0	0,2630 ± 0,01 ^{c, d}
600 MPa x pH 7,0	0,2916 ± 0,01 ^{b, c}
Controle x pH 11,0	0,2556 ± 0,02 ^{d, e}
200 MPa x pH 11,0	0,3211 ± 0,02 ^a
400 MPa x pH 11,0	0,2989 ± 0,01 ^{a, b}
600 MPa x pH 11,0	0,2789 ± 0,02 ^{b, c, d}

Onde: Valores foram expressos em média ± desvio padrão. Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras com letras diferentes pelo teste post-hoc de Tukey.

APÊNDICE D – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA EM pH 5,0

Solubilidade absoluta do isolado proteico de tremçoço processado por HPP à 200, 400 e 600 MPa em pH 2,0; 7,0 e 11,0

Amostra	Solubilidade Absoluta (mg/ml)
Controle x pH 2,0	0,3766 ± 0,01 ^d
200 MPa x pH 2,0	0,3802 ± 0,03 ^d
400 MPa x pH 2,0	0,4191 ± 0,03 ^d
600 MPa x pH 2,0	0,3970 ± 0,02 ^d
Controle x pH 7,0	0,3287 ± 0,02 ^e
200 MPa x pH 7,0	0,4199 ± 0,02 ^d
400 MPa x pH 7,0	0,4844 ± 0,02 ^c
600 MPa x pH 7,0	0,5850 ± 0,02 ^b
Controle x pH 11,0	0,5885 ± 0,02 ^b
200 MPa x pH 11,0	0,6336 ± 0,03 ^a
400 MPa x pH 11,0	0,6068 ± 0,01 ^{a, b}
600 MPa x pH 11,0	0,5989 ± 0,02 ^{a, b}

Onde: Valores foram expressos em média ± desvio padrão. Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras com letras diferentes pelo teste post-hoc de Tukey.

APÊNDICE E – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA EM pH 6,0

Solubilidade absoluta do isolado proteico de tremçoço processado por HPP à 200, 400 e 600 MPa em pH 2,0; 7,0 e 11,0

Amostra	Solubilidade Absoluta (mg/ml)
Controle x pH 2,0	1,4530 ± 0,08 ^f
200 MPa x pH 2,0	1,1876 ± 0,09 ^g
400 MPa x pH 2,0	1,2909 ± 0,09 ^{f, g}
600 MPa x pH 2,0	1,1523 ± 0,05 ^g
Controle x pH 7,0	4,7647 ± 0,05 ^b
200 MPa x pH 7,0	5,6081 ± 0,16 ^a
400 MPa x pH 7,0	3,6530 ± 0,20 ^d
600 MPa x pH 7,0	4,0304 ± 0,08 ^c
Controle x pH 11,0	4,8443 ± 0,09 ^b
200 MPa x pH 11,0	5,3840 ± 0,15 ^a
400 MPa x pH 11,0	3,6235 ± 0,15 ^d
600 MPa x pH 11,0	2,5854 ± 0,13 ^e

Onde: Valores foram expressos em média ± desvio padrão. Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras com letras diferentes pelo teste post-hoc de Tukey.

APÊNDICE F – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA EM pH 7,0

Solubilidade absoluta do isolado proteico de tremçoço processado por HPP à 200, 400 e 600 MPa em pH 2,0; 7,0 e 11,0

Amostra	Solubilidade Absoluta (mg/ml)
Controle x pH 2,0	1,8394 ± 0,10 ^f
200 MPa x pH 2,0	1,3646 ± 0,08 ^g
400 MPa x pH 2,0	1,8659 ± 0,17 ^f
600 MPa x pH 2,0	1,5474 ± 0,05 ^g
Controle x pH 7,0	5,5196 ± 0,05 ^e
200 MPa x pH 7,0	6,9056 ± 0,06 ^b
400 MPa x pH 7,0	6,7346 ± 0,16 ^b
600 MPa x pH 7,0	6,3955 ± 0,09 ^c
Controle x pH 11,0	6,3276 ± 0,07 ^{c, d}
200 MPa x pH 11,0	7,4187 ± 0,24 ^a
400 MPa x pH 11,0	6,4751 ± 0,12 ^c
600 MPa x pH 11,0	6,1242 ± 0,17 ^d

Onde: Valores foram expressos em média ± desvio padrão. Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras com letras diferentes pelo teste post-hoc de Tukey.

APÊNDICE G – RESULTADOS SOLUBILIDADE ABSOLUTA EM pH 8,0

Solubilidade absoluta do isolado proteico de tremçoço processado por HPP à 200, 400 e 600 MPa em pH 2,0; 7,0 e 11,0

Amostra	Solubilidade Absoluta (mg/ml)
Controle x pH 2,0	1,9721 ± 0,11 ^e
200 MPa x pH 2,0	1,3144 ± 0,10 ^g
400 MPa x pH 2,0	2,0546 ± 0,08 ^e
600 MPa x pH 2,0	1,6978 ± 0,06 ^f
Controle x pH 7,0	5,9767 ± 0,22 ^d
200 MPa x pH 7,0	6,8997 ± 0,13 ^{b, c}
400 MPa x pH 7,0	6,8968 ± 0,18 ^{b, c}
600 MPa x pH 7,0	6,8113 ± 0,06 ^c
Controle x pH 11,0	6,9145 ± 0,05 ^{b, c}
200 MPa x pH 11,0	6,9469 ± 0,10 ^{b, c}
400 MPa x pH 11,0	7,1062 ± 0,09 ^{a, b}
600 MPa x pH 11,0	7,2271 ± 0,25 ^a

Onde: Valores foram expressos em média ± desvio padrão. Para análise estatística, há diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras com letras diferentes pelo teste post-hoc de Tukey.