

ALINE CRISTINI DOS SANTOS SILVA

**OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE
SUBPRODUTOS FOLHOSOS DE ASPARGOS: UMA NOVA FONTE DE
PROTEÍNA ALTERNATIVA**

Tese apresentada ao programa de Pós
Graduação em Ciência de Alimentos da
Universidade Estadual de Maringá, como parte
dos requisitos para obtenção do título de doutor
em Ciência de Alimentos

Maringá

2025

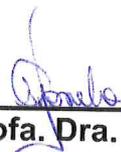
ALINE CRISTINI DOS SANTOS SILVA

**“OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE
SUBPRODUTOS FOLHOSOS DE ASPARGOS: UMA NOVA FONTE DE
PROTEÍNA ALTERNATIVA”**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.



Profa. Dra. Livia de Lacerda Oliveira



Profa. Dra. Adriana Gonela



Prof. Dr. Marco Aurélio Schuler de Oliveira



Prof. Dr. Fernando Antônio Anjo



Prof. Dr. Paula Toshimi Matumoto Pintro
Orientadora

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S586o

Silva, Aline Cristini dos Santos

Otimização e caracterização da extração de proteínas de subprodutos folhosos de aspargos : uma nova fonte de proteína alternativa / Aline Cristini dos Santos Silva. -- Maringá, PR, 2025.

79 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Toshimi Matumoto Pinto.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2025.

1. Aspargo - Processo de extração de proteínas. 2. Aspargo - Propriedades funcionais. 3. Aspargo - Digestibilidade. 4. Proteínas vegetais. 5. Isolado proteicos. I. Pinto, Paula Toshimi Matumoto, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDD 23.ed. 664

Marinalva Aparecida Spolon Almeida - 9/1094

ALINE CRISTINI DOS SANTOS SILVA

**OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE
SUBPRODUTOS FOLHOSOS DE ASPARGOS: UMA NOVA FONTE DE
PROTEÍNA ALTERNATIVA**

Tese apresentada ao programa de Pós
Graduação em Ciência de Alimentos da
Universidade Estadual de Maringá, como parte
dos requisitos para obtenção do título de doutor
em Ciência de Alimentos

Maringá

2025

Orientadora

Profa. Dra. Paula Toshimi Matumoto Pinto

BIOGRAFIA

ALINE CRISTINI DOS SANTOS SILVA nasceu em 19 de julho de 1988 na cidade Astorga (Paraná). Filha de Álvaro dos Santos e Alice Vergínio dos Santos. Concluiu o Ensino Médio na Escola Estadual Engenheiro José Faria Saldanha (2005), cursou graduação em Nutrição na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR) (2007-2010), concluiu mestrado em Ciência de Alimentos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (2013-2015) pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) e especialização em Gestão em Saúde (2017-2018) na mesma universidade. Ingressou no doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos em março de 2022 com defesa da tese em fevereiro de 2025. Desde 2021 é membro do Grupo de Pesquisa em Alimentos Funcionais da UEM. Possui experiência nas áreas de nutrição, alimentos funcionais, proteínas alternativas e reaproveitamento de resíduos agroindustriais.

Dedico

À minha mãe Alice, que mesmo estando ausente fisicamente, permanece presente em cada conquista da minha vida.

Sua força, amor incondicional e ensinamentos são a luz que me guia e a inspiração que jamais se apaga.

Este título é, acima de tudo, uma homenagem à sua memória e ao legado que deixou em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível.

Agradeço à minha família. Ao meu esposo Randor Henrique da Silva, que sempre me apoiou incondicionalmente e assumiu os cuidados com nossos filhos quando não pude estar presente. Aos meus filhos, Ana Clara dos Santos Silva e Henrique Daniel dos Santos Silva, que são minha inspiração diária para seguir em frente e não desistir. Ao meu pai, pelo valores que me transmitiu, que foram fundamentais para essa conquista.

A minha orientadora Profa Paula Toshimi Matumoto Pinto por todos os ensinamentos e lições que vou levar para a vida.

Aos colegas de trabalho, que contribuíram para o meu crescimento durante essa jornada. Em especial, aos meus amigos Anderson e Bianka, pela presença constante e apoio ao longo dessa etapa tão desafiadora e significativa da minha vida.

A todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Alimentos Funcionais da Universidade Estadual de Maringá, que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos por possibilitarem a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos pelos conhecimentos repassados.

A todos, minha sincera gratidão.

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está apresentada na forma de DOIS artigos científicos:

1. Aline Cristini dos Santos-Silva, Bianka Rocha Saraiva, Anderson Lazzari, Henrique dos Santos, Évelin Lemos de Oliveira, Francielle Sato, Eduardo César Meurer, Paula Toshimi Matumoto-Pintro. Optimization and Characterization of Protein Extraction from Asparagus Leafy By-Products. **Foods**, v. 13, n. 6, p. 894, 2024.
Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/13/6/894>
2. Aline Cristini dos Santos-Silva, Bianka Rocha Saraiva, Fernando Anjo, Larissa Aparecida Ricardini Junqueira, Marco Aurelio Schüler de Oliveira, Paula Toshimi Matumoto-Pintro. Protein Isolate from Asparagus By-Products: A Sustainable Alternative Source with High Nutritional and Functional Quality. **Food Bioscience**.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION

The growing demand for sustainable protein sources is driven by global population growth and the scarcity of natural resources such as arable land and water. The reuse of plant by-products, such as those from widely cultivated plants, is a topic of increasing relevance in response to demands for sustainability and reduction of agro-industrial waste. Plant proteins have gained prominence due to their lower environmental impact, as they require fewer natural resources and generate lower greenhouse gas emissions compared to animal sources. Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) is a low-calorie perennial herbaceous vegetable, recognized for its nutritional, commercial and pharmacological properties. Its benefits include antidiabetic, anticancer, antioxidant, lipid-lowering and antimicrobial actions. Global asparagus production is led by China, accounting for more than 84% (7.8 million tons per meter), followed by Peru, Mexico and Germany. Asparagus is a vegetable whose edible and marketable fraction represents less than 25% of the plant. The remaining 75%, consisting of fibrous stems, leaves and roots, are characterized as by-products. These by-products contain nutrients and bioactive compounds, such as polyphenols and essential amino acids, with potential for the development of functional and sustainable food ingredients. The efficiency of a protein source depends not only on its amino acid composition, but also on its digestibility, bioavailability and the presence of antinutritional factors. The response to protein intake can vary substantially between sources, being influenced by physiological and dietary factors, such as absorption rate and essential amino acid profile. The use of these materials can contribute to the reduction of agro-industrial waste and to the addition of value to the production chain.

OBJECTIVE

The aim of this study was to optimize the protein extraction process from asparagus leafy by-products using response surface methodology (RSM) and to characterize the bioactive and functional properties of the obtained protein isolate.

MATERIALS AND METHODS

Asparagus leafy by-products were collected after asparagus harvest, cleaned, dried and subjected to characterization (centesimal composition and protein fractionation).. Response surface methodology using the Box-Behnken designer was applied to optimize the protein extraction process using the variables pH (8-10), time (20-60 min) and temperature (30-70 °C). The concentration was fixed at 5 g.L⁻¹. Protein content was evaluated by Bradford in the protein extract and called response variable (Y). Isoelectric point and extraction efficiency were determined in the protein extract obtained under optimized conditions. Protein isolate from asparagus by-products was evaluated for its technofunctional properties (color, water absorption capacity, oil absorption capacity, protein solubility, gel formation capacity, foam formation capacity and stability, emulsifying capacity and emulsion stability), total polyphenol content, tannin content, antioxidant capacity (ABTS and DPPH), protein degradation (polyacrylamide gel electrophoresis - SDS-PAGE), structural and conformational properties (Fourier transform infrared spectroscopy - FTIR), amino acid profile, determination of the nutritional profile (protein efficiency ratio - PER), in vitro gastrointestinal digestion (pepsin-pancreatin) and evaluation of the bioactive potential (total polyphenols, ABTS and DPPH).

RESULTS AND DISCUSSION

Asparagus leaf by-products contained 15.65% crude protein, 33.17% crude fiber, 34.54% carbohydrates, and 5.84% ash. Leaves are recognized as low-cost protein sources due to their ability to readily synthesize amino acids using sources such as sunlight, carbon dioxide, and atmospheric nitrogen. Protein fractionation indicated that the glutelin fraction was significantly higher (22.88%) than the prolamin (14.59%), albumin (14.58%), and globulin (11.96%) fractions. Glutelins are poorly soluble proteins in water but readily solubilized under alkaline and acidic conditions. Optimized alkaline extraction (pH 9, 50 °C, 40 min) with isoelectric precipitation (pH 3.4) of asparagus by-products resulted in a protein isolate with 90.48% protein. The yield was 43.47% and the extraction efficiency was 84.44%. The dark green color (L^* 31.91, a^* -0.01 and b^* -2.11) observed may have been influenced by pH modulation, since alkaline conditions can favor the oxidation of phenolic compounds due to the possible covalent bond of these compounds with proteins. Water and oil absorption rates (4.49% and 3.47%, respectively) can be justified by the extraction conditions, since slightly elevated temperature and pH can promote protein dissociation, providing more binding sites on the subunits. The minimum solubility of the protein isolate obtained was around pH 4, with an increase observed between pH 6 and 8, showing pH-dependent solubility. The lowest gelation concentration observed was 18% at natural pH, and the lower this concentration, the higher the gelation efficiency. Foam formation and stability, as well as emulsifying capacity, were pH dependent. Solubility tends to increase protein unfolding and the development of air-water interfacial protein membranes, increasing the encapsulation of air bubbles. At pH 4, no foam formation capacity and emulsifying capacity were observed, which can be explained by the lower solubility of the protein isolate from asparagus by-products at this pH. At alkaline pHs, the emulsion may present greater stability to flocculation due to electrostatic repulsion between the droplets. Bioactive compounds (total polyphenols 7.29 mg GAE.g⁻¹) and antioxidant activity (ABTS and DPPH, 145.76 and 65.21 TEAC $\mu\text{mol.100}^{-1}$, respectively) were observed. Polyphenols can be extracted together with proteins due to the interaction capacity of these two compounds, leading to the formation of soluble or insoluble compounds that can reduce or increase the antioxidant activity of polyphenols, as well as affect enzymatic digestion. Protein degradation after the processing steps of asparagus leafy by-products was minimal, since a prominent protein band close to 45 kDa was observed. Through the analysis of structural and conformational properties, it was possible to observe a reduction of the bands associated with carbohydrates ($\nu\text{C-O}$) in the FTIR spectrum, while amide-I (total protein) became more evident after isolation. Among the band centers determined from the amide-I region, there was a predominance of β -Volta, being an important characteristic for the flexibility of the protein, contributing to the stabilization of the water-oil emulsion, facilitating the globular emulsion of the protein. Based on the mass spectra obtained, it was possible to identify, through the corresponding m/z ions, the following amino acids: alanine (90), proline (116), valine (118), leucine/isoleucine (132), asparagine (133) and phenylalanine (166). Of the total amino acids identified (63.19%), 49.13% correspond to essential amino acids, standing out as a quality protein source. The CEP index was >1.5 , indicating a relevant amino acid composition. The in vitro digestibility of the isolate obtained was 86.18%, despite the presence of antinutrients (tannins 82.05 mg EAT/100g). Tannins present from 0.5 to 5% in the diet can reduce protein digestibility and mineral absorption, depending on the food matrix, while tannins $>5\%$ in the diet can have a strong antinutritional effect, causing iron deficiency and impairing digestion. Antioxidant activity and total polyphenols evaluated before

and after digestion increased significantly, indicating that enzymatic digestion positively influenced antioxidant activity and polyphenol release, suggesting that the protein isolate from asparagus by-products constitutes a potential source of bioactive antioxidants, with relevant implications for the development of functional foods.

CONCLUSIONS

The present study achieved its objective by optimizing the protein extraction process from asparagus leaf by-products using the response surface methodology (RSM), resulting in the production and characterization of the protein isolate. This isolate presented a high-quality protein composition and promising functional properties, making it a viable ingredient for applications in the food industry. The use of these by-products not only contributes to sustainability and reduction of agro-industrial waste, but also promotes the valorization of alternative protein sources. Future studies may investigate specific applications in food formulations, as well as their sensory acceptance.

Keywords: Protein isolate, extraction process, vegetable proteins, functional properties, digestibility.

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO

A crescente demanda por fontes de proteína sustentáveis é impulsionada pelo crescimento populacional global e pela escassez de recursos naturais, como terras aráveis e água. A reutilização de subprodutos vegetais, como aqueles de plantas amplamente cultivadas, é um tema de crescente relevância em resposta às demandas por sustentabilidade e redução de resíduos agroindustriais. As proteínas vegetais ganharam destaque devido ao seu menor impacto ambiental, pois requerem menos recursos naturais e geram menores emissões de gases de efeito estufa em comparação com fontes animais. O aspargo (*Asparagus officinalis* L.) é um vegetal herbáceo perene de baixa caloria, reconhecido por suas propriedades nutricionais, comerciais e farmacológicas. Seus benefícios incluem ações antidiabéticas, anticancerígenas, antioxidantes, hipolipemiantes e antimicrobianas. A produção global de aspargos é liderada pela China, respondendo por mais de 84% (7,8 milhões de toneladas por metro), seguida pelo Peru, México e Alemanha. O aspargo é um vegetal cuja fração comestível e comercializável representa menos de 25% da planta. Os 75% restantes, constituídos por caules fibrosos, folhas e raízes, são caracterizados como subprodutos. Esses subprodutos contêm nutrientes e compostos bioativos, como polifenóis e aminoácidos essenciais, com potencial para o desenvolvimento de ingredientes alimentares funcionais e sustentáveis. A eficiência de uma fonte proteica depende não apenas de sua composição de aminoácidos, mas também de sua digestibilidade, biodisponibilidade e presença de fatores antinutricionais. A resposta à ingestão de proteína pode variar substancialmente entre as fontes, sendo influenciada por fatores fisiológicos e dietéticos, como taxa de absorção e perfil de aminoácidos essenciais. O uso desses materiais pode contribuir para a redução de resíduos agroindustriais e para a agregação de valor à cadeia produtiva.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi otimizar o processo de extração de proteína de subprodutos folhosos de aspargos usando metodologia de superfície de resposta (MSR) e caracterizar as propriedades bioativas e funcionais do isolado proteico obtido.

MATERIAIS E MÉTODOS

Subprodutos folhosos de aspargos foram coletados após a colheita de aspargos, higienizados, secos e submetidos à caracterização (composição centesimal e fracionamento proteico). Metodologia de superfície de resposta usando o *designer* Box-Behnken foi aplicada para otimizar o processo de extração proteica usando as variáveis pH (8-10), tempo (20-60 min) e temperatura (30-70 °C). A concentração foi fixada em 5 g.L⁻¹. O conteúdo proteico foi avaliado por Bradford no extrato proteico e denominado variável resposta (Y). O ponto isoelétrico e a eficiência da extração foram determinados no extrato proteico obtido em condições otimizadas. O isolado proteico de subprodutos de aspargos foi avaliado quanto às propriedades tecnofuncionais (cor, capacidade de absorção de água, capacidade de absorção de óleo, solubilidade proteica, capacidade de formação de gel, capacidade de formação de espuma e estabilidade, capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão), teor de polifenóis totais e de taninos, capacidade antioxidante (ABTS e DPPH), degradação das proteínas (eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE), propriedades estruturais e conformacionais (espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - FTIR), perfil de aminoácidos, determinação do perfil nutricional (capacidade de eficiência proteica -

CEP), digestão gastrointestinal *in vitro* (pepsina-pancreatina) e avaliação do potencial bioativo (polifenóis totais, ABTS e DPPH) antes e após a digestão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Subprodutos folhosos de aspargos apresentaram 15,65% de proteína bruta, 33,17% de fibra bruta, 34,54% de carboidratos e 5,84% de cinzas. As folhas são reconhecidas como fontes de proteína de baixo custo devido à sua capacidade de sintetizar prontamente aminoácidos usando fontes como luz solar, dióxido de carbono e nitrogênio atmosférico. O fracionamento proteico indicou que a fração de glutelina foi significativamente maior (22,88%) do que as frações de prolamina (14,59%), albumina (14,58%) e globulina (11,96%). Glutelinas são proteínas pouco solúveis em água, mas facilmente solubilizadas em condições alcalinas e ácidas. A extração alcalina otimizada (pH 9, 50 °C, 40 min) com precipitação isoelétrica (pH 3,4) de subprodutos de aspargos resultou em um isolado proteico com 90,48% de proteína. O rendimento foi de 43,47% e a eficiência de extração foi de 84,44%. A cor (L^* 31,91, a^* -0,01 e b^* -2,11) verde escuro observada pode ter sido influenciada pela modulação do pH, uma vez que condições alcalinas podem favorecer a oxidação de compostos fenólicos devido à possível ligação covalente desses compostos com proteínas. Índices de absorção de água e óleo (4,49% e 3,47%, respectivamente) podem ser justificados pelas condições de extração, uma vez que temperatura e pH ligeiramente elevados podem promover a dissociação proteica, fornecendo mais sítios de ligação nas subunidades. A solubilidade mínima do isolado proteico obtido foi torno de pH 4, com um aumento observado entre pH 6 e 8, mostrando solubilidade dependente do pH. A menor concentração de gelificação observada foi em 18% em pH natural, sendo que, quanto menor essa concentração, maior a eficiência de gelificação. A formação e estabilidade da espuma, assim como a capacidade emulsificante, mostraram-se dependentes do pH. A solubilidade tende a aumentar o desdobramento das proteínas e o desenvolvimento de membranas proteicas interfaciais ar-água, aumentando o encapsulamento das bolhas de ar. Em pH 4 não foi observada capacidade de formação de espuma e capacidade emulsificante, o que pode ser justificado pela menor solubilidade do isolado proteico dos subprodutos de aspargos nesse pH. Em pHs alcalinos, a emulsão pode apresentar maior estabilidade à floculação devido à repulsão eletrostática entre as gotas. Foram observados compostos bioativos (polifenóis totais 7,29 mg GAE.g⁻¹) e atividade antioxidante (ABTS e DPPH, 145,76 e 65,21 TEAC $\mu\text{mol}\cdot 100^{-1}$, respectivamente). Os polifenóis podem ser extraídos juntamente com proteínas devido à capacidade de interação desses dois compostos, levando à formação de compostos solúveis ou insolúveis que podem reduzir ou aumentar a atividade antioxidante dos polifenóis, bem como afetar a digestão enzimática. A degradação proteica após as etapas de processamento dos subprodutos folhosos de aspargos foi mínima, uma vez que foi observada uma banda proteica proeminente próxima a 45 kDa. Por meio da análise das propriedades estruturais e conformacionais, foi possível observar uma redução das bandas associadas aos carboidratos ($\nu\text{C-O}$) no espectro FTIR, enquanto a amida-I (proteína total) tornou-se mais evidente após o isolamento. Dentre os centros de banda determinados da região da amida I, houve predominância do β -Volta, sendo uma característica importante para a flexibilidade da proteína, contribuindo para a estabilização da emulsão água-óleo, facilitando a emulsão globular da proteína. Com base nos espectros de massa obtidos, foi possível identificar, por meio dos íons m/z correspondentes, os seguintes aminoácidos: alanina (90), prolina (116), valina (118), leucina/isoleucina (132), asparagina (133) e fenilalanina (166). Do total de aminoácidos identificados (63,19%), 49,13% correspondem a aminoácidos essenciais, destacando-se como uma fonte proteica de qualidade. O índice de CEP foi >1,5, indicando

uma composição de aminoácidos relevante. A digestibilidade *in vitro* do isolado obtido foi de 86,18%, apesar da presença de antinutrientes (taninos 82, 05 mg EAT/100g). Taninos presentes de 0,5 à 5 % na dieta pode reduzir a digestibilidade das proteínas e a absorção de minerais, dependendo da matriz alimentar, enquanto que taninos > 5 % na dieta pode ter forte efeito antinutricional podendo causar deficiência de ferro e prejudicar a digestão. Atividade antioxidante e os polifenóis totais avaliados antes e após a digestão aumentou significativamente, indicando que a digestão enzimática influenciou positivamente a atividade antioxidante e a liberação de polifenóis, sugerindo que o isolado proteico de subprodutos de aspargos constitui uma fonte potencial de antioxidantes bioativos, com implicações relevantes para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

CONCLUSÕES

O presente estudo alcançou seu objetivo ao otimizar o processo de extração de proteína a partir de subprodutos folhosos de aspargos por meio da metodologia de superfície de resposta (MSR), resultando na obtenção e caracterização do isolado proteico. Esse isolado apresentou uma composição proteica de qualidade e propriedades funcionais promissoras, tornando-se um ingrediente viável para aplicações na indústria alimentícia. O uso desses subprodutos não só contribui para a sustentabilidade e redução de resíduos agroindustriais, mas também promove a valorização de fontes alternativas de proteína. Estudos futuros podem investigar aplicações específicas em formulações de alimentos, bem como sua aceitação sensorial.

Palavras-chave: Isolado proteico, processo de extração, proteínas vegetais, propriedades funcionais, digestibilidade.

ARTIGO 1

Otimização e Caracterização da Extração de Proteínas de Subprodutos Folhosos de Aspargos

Aline Cristini dos Santos-Silva¹, Bianka Rocha Saraiva², Anderson Lazzari¹, Henrique dos Santos³, Évelin Lemos de Oliveira⁴, Francielle Sato³, Eduardo César Meurer⁴, Paula Toshimi Matumoto-Pintro^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil; alinecristinisantossilva@gmail.com (A.C.S.S); andersonlazzari29@gmail.com (A.L); ptmpintro@uem.br (P.T.M.P)

²Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil; bianka_saraiva@hotmail.com

³Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Maringá, Brasil; rique.love@gmail.com (H.S); fsato@uem.br (F.S)

⁴Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Jandaia do Sul, Brasil; eduardo.meurer@gmail.com (E.C.M); evelynlemos@hotmail.com (E.L.O)

Recebido 16 Fevereiro 2024 | Revisado: 11 Março 2024 | Aceito: 13 Março 2024 |

Publicado: 15 Março 2024

FOODS

Resumo: A produção de aspargos gera quantidades significativas de subprodutos durante o verão e o período de crescimento pós-colheita. Os subprodutos podem ser boas fontes de nutrientes e fitoquímicos. O interesse em aumentar a disponibilidade de proteínas para consumo humano tem levado ao uso de novas fontes vegetais ricas em proteínas. O objetivo do estudo foi utilizar a metodologia de superfície de resposta (MSR) para otimizar o processo de extração aquosa de proteínas de subprodutos folhosos de aspargos, proporcionando a produção do novo ingrediente. A condição ótima de extração foi em pH 9, com 40 min de extração a 50 °C e a concentração foi fixada em 5g. L⁻¹. O isolado obtido apresentou 90,48% de proteína com 43,47% de rendimento. Aminoácidos como alanina, prolina, valina, leucina/isoleucina, asparagina e fenilalanina foram identificados, a atividade antioxidante para 2,2 AZINO BIS (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi de 145,76 equivalente a Trolox $\mu\text{mol.100g}^{-1}$ e para DPPH 65,21 equivalente a Trolox $\mu\text{mol.100g}^{-1}$. Foram apresentadas propriedades tecnológicas favoráveis (capacidade de absorção de água 4,49 g.g⁻¹ e capacidade de absorção de óleo 3,47 g.g⁻¹) e a coloração tendeu para o verde escuro (L* 31,91, a* -01,01, b* -2,11). O isolado proteico obtido através do processo de otimização da extração apresentou alto potencial para ser utilizado como ingrediente proteico.

Palavras-chave: Isolado proteico; processo de extração; propriedades tecnológicas

1. Introdução

O aspargo (*Asparagus officinalis* L.), popularmente conhecido como "rei dos vegetais", é um vegetal herbáceo perene pertencente à família Asparagaceae. Os brotos de aspargos são considerados um alimento saudável devido ao seu baixo teor calórico, alto teor proteico e fitoquímico bioativo. Uma vez que os brotos de aspargos começam a se abrir, eles rapidamente se tornam fibrosos e não são aceitos comercialmente. Após esse período, as lanças podem se transformar em caules modificados, chamados cladofilos ou cladódios, que são órgãos fotossinteticamente ativos, semelhantes a folhas [1].

Novas aplicações para resíduos agrícolas e industriais têm sido investigadas visando um impacto ambiental positivo e transformação em compostos utilizáveis. A parte comercial da planta, o caule comestível de aspargos, compreende à menos de 25% da planta; os 75% restantes incluem caule fibroso, raiz e folhas. Essas frações são caracterizadas como subprodutos, contendo os mesmos nutrientes e fitoquímicos presentes nos brotos podem ser encontrados e, portanto, têm alto potencial para uso como ingredientes alimentícios com valor nutricional e propriedades promotoras de saúde [2].

De acordo com as estimativas da FAO, até 2050 [3], a população mundial atingirá cerca de 9,6 bilhões, e estima-se que a produção global de alimentos aumentará em 50%. É necessário obter novas alternativas alimentares para garantir a segurança alimentar, portanto, novas fontes de proteínas vegetais têm sido pesquisadas. As proteínas de origem animal possuem disponibilidade limitada e alto custo, além disso, os consumidores também têm associado o consumo excessivo de proteína de origem animal a problemas de saúde, portanto o uso de proteínas origem vegetais, geralmente de menor custo e maior disponibilidade, pode se tornar alternativa para atender a essa demanda [4].

Nos países em desenvolvimento, cereais e leguminosas são as fontes de proteína dietética mais importantes, e os vegetais ajudam a atender às necessidades nutricionais de proteína da população [5]. O desafio é converter essas fontes vegetais em ingredientes proteicos aceitáveis e funcionais.

Os isolados proteicos têm ganhado espaço devido à qualidade da proteína obtida e sua versatilidade no preparo de alimentos tradicionais ou no desenvolvimento de novos alimentos [6]. O sucesso do uso de isolados de proteínas vegetais depende de suas propriedades funcionais, que são influenciadas por fatores intrínsecos (composição e conformação de proteínas), fatores ambientais (composição de alimentos) e métodos e condições usados durante o isolamento [7].

Dentre os métodos utilizados para extrair proteínas, a precipitação isoelétrica é um método tradicional que consiste na extração de proteínas por álcali diluído, seguida de precipitação no ponto isoelétrico. Parâmetros como pH, temperatura, tempo, força iônica e relação solvente/soluto podem afetar significativamente a capacidade de extração de proteínas [8]. A metodologia de superfície de resposta (MSR) pode ser utilizada quando muitos fatores e interações afetam a resposta desejada, pois essa ferramenta fornece informações relevantes em menos tempo e com um número reduzido de experimentos. As condições operacionais ideais são alcançadas usando projetos experimentais mais complexos, como o *designer* Box-Behnken (BBD), uma classe de experimentos de segunda ordem rotativos ou quase rotativos baseados em experimentos fatoriais incompletos de três níveis [9].

Subprodutos de aspargos têm sido estudados na produção de suco, processamento de fibra alimentar em pó e extração de compostos bioativos [2], mas estudos limitados têm sido relatados sobre a valorização de subprodutos folhosos de aspargos, usados apenas como

ração animal ou cobertura do solo para a próxima colheita. A extração proteica de subprodutos de aspargos pode apresentar uma abordagem viável e sustentável para atender à crescente demanda por fontes alternativas de proteína, oferecendo uma nova solução para aumentar o valor nutricional, reduzir o desperdício e contribuir para o desenvolvimento de suplementos proteicos mais sustentáveis. O objetivo deste estudo foi utilizar o MSR para otimizar o processo de extração de proteínas a partir de subprodutos folhosos de aspargos e avaliar as propriedades físico-químicas e tecnológicas do isolado proteico obtido.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Os subprodutos folhosos ou cladódios que se desenvolveram após a colheita de aspargos foram coletados em Marialva, Paraná, Brasil (23° 29' 8" S, 51° 47' 34" W), sanitizados e secos em estufa com circulação de ar a 55 °C por 18 h, triturados e peneirados a 60 mesh. O pó obtido foi armazenado ao abrigo da luz à temperatura ambiente e foi denominado subproduto do aspargo.

2.2. Caracterização dos subprodutos dos aspargos

O pó de subproduto do aspargo foi analisado em triplicata quanto à umidade, cinzas, lipídios, proteína bruta e teor de fibra bruta de acordo com o Instituto Adolfo Lutz [9]. O teor de umidade foi determinado por secagem em estufa a 105 °C, até peso constante, e o teor de cinzas por incineração em mufla a 550 °C por 4h. A quantidade de lipídios totais foi extraída por Soxlet e a determinação de proteínas foi baseada na concentração de nitrogênio pelo método de Kjeldahl. O teor de carboidratos foi determinado por diferença, subtraindo-se

da composição centesimal (100%) a soma dos percentuais de umidade, proteína, gordura, fibra e cinzas.

O fracionamento proteico do subproduto do aspargo foi baseado em sua solubilidade em soluções aquosas, salinas, alcalinas e hidroalcoólicas [11]. O pó foi misturado com água deionizada (1:10 p/v) e homogeneizado por 30 min e centrifugado a 2.249 $\times g$ por 20 min. O sobrenadante obtido foi denominado fração albumina. O *pellet* foi sucessivamente ressuspenso em diferentes soluções nas mesmas condições descritas para a fração albumina. A solução de NaCl a 0,90% (m/v) foi utilizada para solubilizar a fração globulina, a solução de etanol a 70% (m/v) para prolaminas e a solução de NaOH 0,10 M para as glutelinas. Foram utilizadas as seguintes equações:

(1)

$$\text{Proteína total (\%)} = \frac{\text{Proteína total (g) de cada fração}}{\text{Proteínas totais (g) de subproduto do aspargo em pó}} \times 100$$

(2)

$$\text{Resíduos insolúveis} = 100 - (\text{albuminas} + \text{globulinas} + \text{prolaminas} + \text{glutelinas})$$

2.3. Extração de proteínas e desenho experimental

Subprodutos de aspargo foi extraído em água deionizada usando a combinação de variáveis independentes: pH (8-10), tempo (20-40 min) e temperatura (30-70 °C). A concentração não foi utilizada como variável, sendo fixada em 5 g.L⁻¹ para todas as corridas após testes preliminares. Após ajuste do pH, as amostras foram submetidas a banho-maria com agitação sob condições avaliadas e foram então centrifugados (MPW-351R, Polônia) a 5.046 $\times g$ por 20 min a 25 °C, filtradas através de um filtro quantitativo (papel quantitativo, peso 80 g) e o sobrenadante foi coletado e denominado extrato proteico.

O teor de proteína foi avaliado no extrato proteico e foi denominado variável resposta (Y). O extrato proteico foi homogeneizado (5 µL) com reagente de Bradford (250 µL) e após 10 min de reação, a absorbância foi lida em microplacas ELISA (Dispositivo Molecular VersaMax, EUA) a 595 nm. Uma curva analítica foi construída usando albumina de soro bovino [12].

O MSR usando o design Box-Behnken foi usado para otimizar o processo de extração. O efeito das três variáveis independentes (X_1 , pH; X_2 , tempo de extração; X_3 , temperatura de extração) em três níveis, foi avaliado para determinar o efeito sobre o teor de proteína extraída da variável resposta dependente. As variáveis e seus níveis foram definidos com base em testes preliminares dentro da faixa de investigação. Para o cálculo estatístico, as variáveis foram codificadas de acordo com a equação:

(3)

$$x_i = \frac{X_i - X_{0i}}{\Delta X} = 1,2,3$$

onde x_i é o valor codificado da variável independente, X_i é o valor real da variável independente, X_{0i} é o valor real da variável independente no ponto central e ΔX corresponde ao intervalo de variação da variável independente. Os índices 1, 2 e 3 representam as diferentes condições avaliadas.

O delineamento consistiu em 15 pontos experimentais e foi realizado em ordem aleatória. Duas repetições no ponto central foram usadas para permitir a estimativa de uma soma de erro puro de quadrados. A variável resposta investigada Y (mg de proteína extraída g^{-1} de subproduto de aspargos) foi ajustada a um modelo polinomial de segunda ordem. O modelo quadrático para predição do ponto ótimo foi expresso de acordo com a equação:

(4)

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

onde β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes de regressão para intercepto, linear, quadrático e interação, respectivamente. X_i e X_j são os fatores e k é o número de variáveis independentes [13].

O ponto ótimo de extração foi determinado pela função de desejabilidade, visando maximizar o teor de proteína extraída. A resposta obtida na condição ótima prevista foi validada por comparação com a resposta prevista pelo modelo.

2.4. Determinação do ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico (PI) foi determinado no extrato proteico obtido em condições ótimas do desenho experimental. A proteína extraída (5 mL) foi diluída em água destilada (40 mL) e o pH foi ajustado de 2 a 10 usando 0,5 ou 3 N HCl/NaOH. A turbidez de cada solução foi lida em espectrofotômetro a 320 nm e o valor de pH que apresentou maior turbidez foi considerado como o ponto isoelétrico [14].

2.5. Caracterização do processo de extração

A eficiência de extração foi determinada pelo teor de proteína extraída em condições ótimas em relação ao teor de proteína do pó do subproduto do aspargo antes do processo de extração, expresso em porcentagem. O rendimento da proteína extraída foi calculado usando a equação:

Rendimento (%)

(5)

$$= \frac{\text{Peso do isolado} \times \% \text{ teor de proteína do isolado}}{\text{peso subprodutos de aspargo em pó} \times \% \text{ teor de proteína de subprodutos de aspargo em pó}} \times 100$$

2.6. *Isolado proteico de subproduto de aspargos*

O extrato proteico obtido em condições ótimas foi ajustado ao PI previamente determinado. A proteína precipitada foi recuperada após centrifugação por 20 min (10,180 xg) a 4 °C, resuspendida em água destilada, centrifugada novamente e, em seguida, o *pellet* foi liofilizado a -51 ° C (CHRIST, Alpha 1–4, LD Plus). O isolado proteico foi armazenado para análises posteriores.

2.7. *Propriedades tecnológicas*

2.7.1. Cor

As análises de cor foram realizadas com o colorímetro Minolta CR400 e iluminante C baseado no sistema CIELAB, que avalia a cor por refletância de luz em três dimensões: L*, luminosidade em uma escala de 0 (preto) a 100 (branco); a* variando de vermelho (0 + a) a verde (0 - a) e b* que representa uma escala de amarelo (0 + b) a azul (0 - b).

2.7.2. Capacidade de absorção de água (CAA)

O isolado proteico (100 mg) foi misturado com 1000 µL de água destilada usando um agitador e deixado em repouso por 30 min. A suspensão foi centrifugada a 1.800 xg por 20 min a 22 °C, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi drenado em um ângulo de 45° (10 min). A capacidade de absorção de água foi calculada pela taxa de volume de água absorvida pelo peso da amostra [15].

2.7.3. Análises de capacidade de absorção de óleo (CAO)

O isolado proteico (100 mg) foi misturado com 1000 µL de óleo de girassol, deixado em repouso por 30 min (22 °C) e centrifugado a 13.600 *xg* por 10 min a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e drenado em um ângulo de 45° por 20 min. O volume de óleo absorvido foi dividido pelo peso da amostra de proteína para obter a capacidade de absorção de óleo da amostra [16].

2.7.4. Solubilidade em proteínas

A solubilidade do isolado proteico foi determinada de acordo com Saraiva et al. [17]. O isolado proteico (200 mg) foi misturado com 20 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 2, 4, 6, 8, 10 e 12 com 0,5 ou 3 N HCl/NaOH. A mistura foi agitada por 60 min a 25 °C e centrifugada a 5.046 *xg* por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e o teor de proteína solúvel foi determinado pelo método de Bradford [12]. A seguinte equação foi usada para calcular a solubilidade:

(6)

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{Conteúdo de Proteína no sobrenadante}}{\text{Conteúdo total de proteínas da amostra}} \times 100$$

2.8. Conteúdo total de polifenóis (CTP) e capacidade antioxidante

2.8.1. Preparação do extrato

O isolado proteico (1:100 p/v) foi homogeneizado com etanol/água (70:30, v/v) por 15 min. Centrifugado a 5.046 *xg* por 15 min a 4 °C e, o sobrenadante foi recuperado para análises posteriores.

2.8.2. Conteúdo total de polifenóis (CTP)

CTP foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu [18]. Uma alíquota (125 µL) do extrato foi misturada com 125 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (50%) e 2250 µL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) (3,79 M). Após a homogeneização, as amostras permaneceram protegidas da luz por 30 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 725 nm. A absorbância foi comparada com uma curva padrão de ácido gálico. Os resultados obtidos foram expressos em mg de EAG (equivalente de ácido gálico).

2.8.3. Capacidade antioxidante por ensaios ABTS e DPPH

Os ensaios ABTS+ (2,2 AZINO BIS (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil) foram realizados de acordo com Saraiva et al. [16]. A solução de ABTS (7 mM) em etanol 100% reagiu (por 16 h à temperatura ambiente) com persulfato de potássio (140 mM) para formar a solução de cátion radical ABTS ($\text{ABTS}^{\bullet+}$). Foi diluído novamente em etanol 100% até obter uma absorbância de $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm. Para análise, alíquotas de 40 µL dos extratos foram adicionadas a 1960 µL de ABTS diluído¹ e a absorbância foi lida a 734 nm após 6 min.

Alíquotas de 150 µL de extrato foram misturadas com 2,85 mL do radical DPPH (0,06 mM), homogeneizadas em vórtice e mantidas longe da luz por 30 min. As leituras foram feitas em um espectrofotômetro a 515 nm.

Os resultados de sequestro de radicais livres DPPH e ABTS foram avaliados e expressos como uma capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) por 100 g de matéria seca da amostra (μmol^{-1}).

2.9. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas em um espectrômetro Bruker Vertex 70v (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, DEU) com um acessório de refletância total atenuada (ATR). O pó e isolado proteico de subprodutos de aspargo foram separados em alíquotas (n=3) e, em seguida, submetidos à medição de FTIR-ATR. Cada espectro é o resultado de uma média de 128 varreduras, medidas de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução espectral de 4cm^{-1} . As medidas foram realizadas à temperatura ambiente e normalizadas pelo vetor de normalização usando o software OPUS [19].

2.10. Identificação qualitativa dos aminoácidos

Os aminoácidos foram analisados de acordo com Polisel et al. [20]. Para a preparação da amostra, 0,10 g de isolado proteico de subproduto de aspargos foi dissolvido em 1,0mL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM. A solução foi misturada em vórtice e refrigerada a 4 °C por 60 min. Foi centrifugado a 1.696xg por 10 min e diluído (1:10 v/v) duas vezes em fase móvel acetonitrila:água:ácido fórmico (70:30:0.1) (v/v/v). A amostra diluída (5 μ L) foi injetada diretamente no espectrômetro de massas, com ionização por eletro spray e analisador triplo quadrupolo (Waters, XE Premier). O tempo de execução da análise foi de 2 min para cada amostra. A identificação de íons M+H realizada de acordo com Cantú et al. [21] 200x com fragmentação neutra do tipo perda.

2.11. Análises estatísticas

O experimento foi realizado três vezes e as análises foram realizadas em triplicatas. Os resultados obtidos foram submetidos a análises de variância utilizando o modelo linear geral (GLM) com SPSS (v.15.0) (IBM SPSS Statistics, SPSS Inc., Chicago, EUA) para Windows.

Foram calculadas médias e desvio-padrão para cada variável. Para que as diferenças fossem estatisticamente significativas, foi utilizado o teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Tabela 1 – Composição centesimal e frações proteicas solúveis do pó de subproduto do aspargo.

Parâmetros	(%)
Umidade	8,56 ± 0,05
Cinzas	5,84 ± 0,08
Lípidos	2,23 ± 0,19
Fibra bruta	33,17 ± 0,39
Proteína	15,65 ± 0,26
Carboidratos	34,54 ± 0,53
Frações	Proteína (%)
Albumina	14,58 ± 0,52 ^c
Globulina	11,96 ± 0,28 ^d
Prolamina	14,59 ± 0,36 ^c
Glutelina	22,88 ± 0,13 ^b
Resíduos insolúveis	35,98 ± 0,01 ^a

Os valores são a média ± desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

3. Resultados e discussão

3.1. Propriedades do pó de subprodutos de aspargo

O pó de subprodutos do aspargo apresentou 15% de proteína, rico em fibras alimentares e carboidratos, além de possuir baixas quantidades de lipídios e cinzas (Tabela 1). As folhas foram recentemente reconhecidas como fontes de proteína de baixo custo devido à sua capacidade de sintetizar prontamente aminoácidos usando fontes como luz solar, dióxido de carbono e nitrogênio atmosférico. Folhas de várias plantas têm sido investigadas como fonte potencial de proteínas (alfafa 15-20% [22], jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam) 19,35% [23] e o tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) 9,4–14,6% [24] (teor de proteína com base no peso seco).

As frações proteicas do pó de subproduto do aspargo são apresentadas na Tabela 1. Dentre a parte solúvel da amostra, a fração glutelina apresentou o maior teor significativo ($p < 0,05$), seguida das frações prolamina, albumina e globulina. O teor de resíduos insolúveis demonstra que 34% da amostra não é solúvel em nenhum dos solventes utilizados à temperatura ambiente. Nas frações proteicas extraídas das folhas de rabanete (*Raphanussativus* L.), a glutelina também foi superior às demais (glutelina 42,58%, prolamina 23,57%, albumina 20,08% e globulina 13,74%) [25].

As glutelinas são proteínas pouco solúveis em água, mas são facilmente solubilizadas em condições alcalinas ($\text{pH} > 10$) e ácidas ($\text{pH} < 4$) [25]. A solução alcalina é geralmente eficiente para solubilizar proteínas em ambos os casos, pois a maioria das proteínas vegetais apresenta maior solubilidade na faixa de pH alcalino, devido ao maior teor de aminoácidos como ácido aspártico e ácido glutâmico [27]. As proteínas solúveis afetam diretamente a funcionalidade durante o processamento dos alimentos. Conhecer a composição das proteínas solúveis nos subprodutos do aspargo é de extrema importância, pois é decisivo na escolha do método de extração que visa extrair o teor proteico mais predominante.

3.2. Influência das condições de extração no teor de proteínas solúveis

O teor de proteína solúvel de subprodutos de aspargo foi significativamente afetado por três fatores diferentes: pH (8–10), tempo de extração (20–60 min) e temperatura (30–70°C), conforme resumido na Tabela 2. No delineamento experimental, o teor de proteína solúvel variou entre 110,57 e 133,01 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. A figura 1E e F mostram um aumento na quantidade de proteína extraída com um aumento no tempo de 20 para 40 min e temperatura de 30 para 50 °C em pH 9 (116,55 para 130,99 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$). A mudança do pH da solução de 8 para 10

resultou em 9,9% mais proteína solúvel no extrato, e os valores mínimos de extração de proteína foram obtidos em pH 8, 20 min e 50 °C (Tabela 2).

Com o aumento da temperatura e do pH (Figura 1 A e 1B) há um aumento no teor de proteína. Esse aumento pode ser observado até cerca de 55 °C, acima do qual começa a diminuir. A redução no teor de proteína em temperaturas elevadas pode estar associada à desnaturação de proteínas induzida pelo calor ou à gelificação induzida pelo calor em temperaturas acima de 60 °C. Acima de pH 10, o teor de proteína diminui devido ao desdobramento ou desnaturação das moléculas de proteína em um meio altamente alcalino, levando a uma conformação distorcida com hidrofobicidade modificada da proteína em estudo. Em relação ao tempo, 40 min foi adequado para extração de proteínas dos subprodutos do aspargo (Figura 1 C, 1D, 1E e 1F). O tempo de extração deve ser adequado para dispersar a proteína no solvente, pois um longo tempo de extração (maior que 2 horas) pode resultar em saturação da proteína, resultando em uma redução no teor de proteína [28].

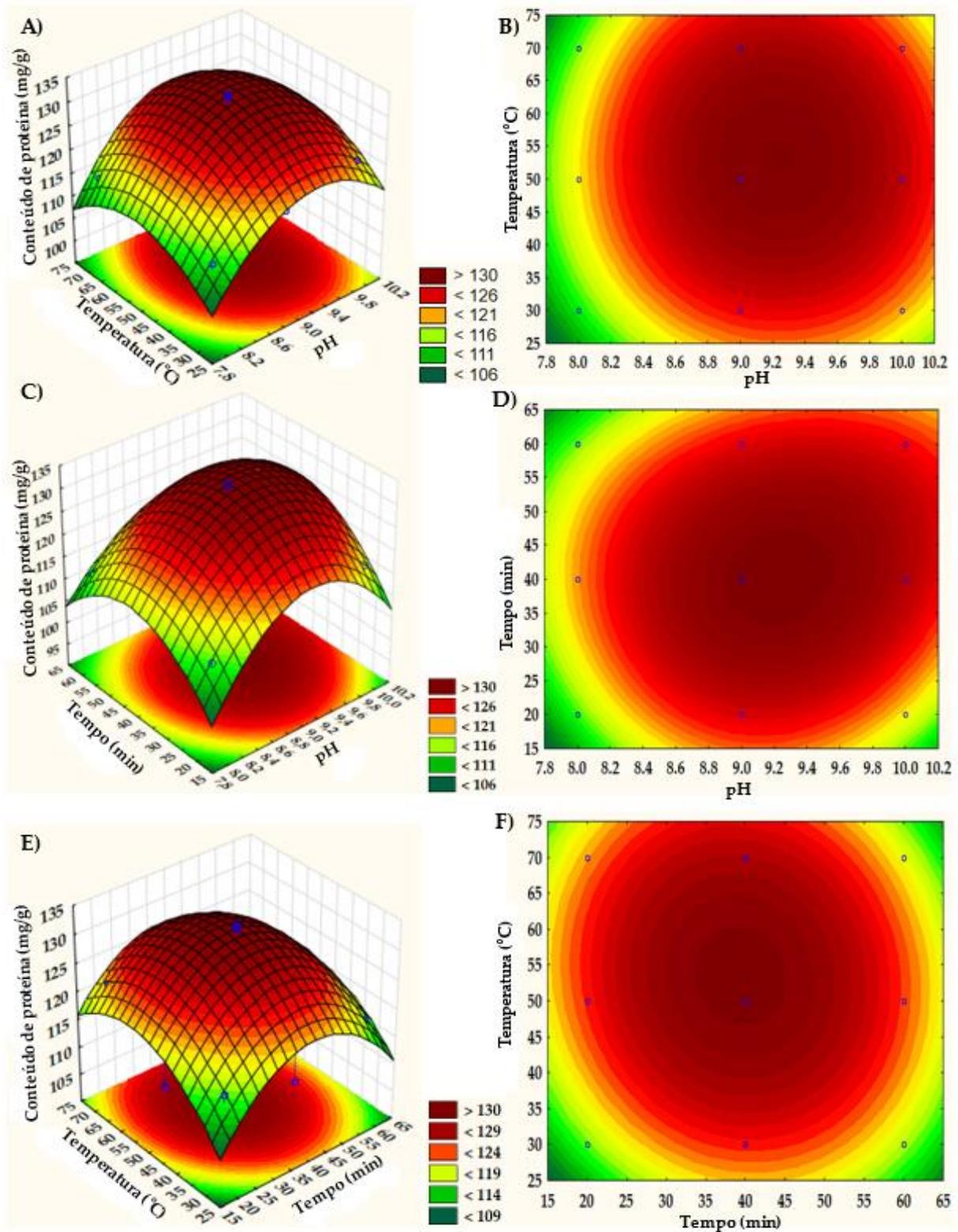


Figura 1 – Gráficos de superfície e contorno de resposta de extração de proteínas do subproduto do aspargo mostrando os efeitos da temperatura (°C) e do pH na extração (A, B); os efeitos do tempo (min) e do pH na extração (C, D), o efeito da temperatura (°C) e do tempo (min) na extração (E, F).

Tabela 2 – Desenho de Box-Behnken para pH, tempo e temperatura e sua resposta, teor de proteína (mg de proteína.g⁻¹ de subproduto de aspargos).

Parâmetros independentes (valor codificado)				Teor de proteína, Y (mg. g ⁻¹)
Corrida	pH (X ₁)	Tempo (X ₂ , min)	Temperatura (X ₃ , °C)	Resultados experimentais
1	8 (1)	20 (-1)	50 (0)	110,57
2	10 (1)	20 (-1)	50 (0)	116,30
3	8 (-1)	60 (1)	50 (0)	111,70
4	10 (1)	60 (1)	50 (0)	122,76
5	8 (-1)	40 (0)	30 (-1)	112,59
6	10 (1)	40 (0)	30 (-1)	120,42
7	8 (-1)	40 (0)	70 (1)	114,61
8	10 (1)	40 (0)	70 (1)	122,92
9	9 (0)	20 (-1)	30 (-1)	116,55
10	9 (0)	60 (1)	30 (-1)	117,76
11	9 (0)	20 (-1)	70 (1)	121,87
12	9 (0)	60 (1)	70 (1)	119,45
13	9 (0)	40 (0)	50 (0)	130,99
14	9 (0)	40 (0)	50 (0)	130,19
15	9 (0)	40 (0)	50 (0)	132,45
16	9 (0)	40 (0)	50 (0)	133,01
17	9 (0)	40 (0)	50 (0)	130,83

3.3. MSR e otimização da condição de extração

A equação de regressão obtida para o teor de proteína (Y) foi a seguinte:

(7)

$$Y = -889.74 + 209.61X_1 - 11.53X_3 - 76X_1 + 0.64X_1 + 4.4X_2^2 + 0.57X_1 - 0.03X_3 - 0.08 + 371.8$$

De acordo com a Tabela 3, os valores de F com valor de P menor que 0,05 descrevem que os termos do modelo são significativos ao quantificar a tendência exata de resposta. A

adequação do modelo, por meio dos valores de R-quadrado (0,9939) e Adj R-quadrado (0,9737), sugere que a variação total de 97,37% no teor de proteína foi atribuída às condições de extração. A diferença entre R-quadrado e Adj R-quadrado é muito pequena, refletindo que o modelo polinomial praticamente não possui termos insignificantes, indicando um alto grau de precisão e confiabilidade entre os valores experimentais.

Tabela 3 – Coeficientes de regressão estimados para um modelo quadrático e ANOVA para resultados experimentais da otimização da proteína do subproduto do aspargo.

Fonte	Soma dos quadrados	Grau de Liberdade	Quadrático médio	Valor F	Valor de p
X ₁	123,59	1	123,59	88,28	0,0007*
X ₂	9,75	1	9,75	6,96	0,0577
X ₃	12,90	1	12,90	9,21	0,0386*
X ₁ X ₂	7,09	1	7,09	5,07	0,0875
X ₁ X ₂ ²	0,05	1	0,05	0,04	0,8564
X ₁ ² X ₂	9,67	1	9,67	6,91	0,0583
X ₁ X ₃	0,06	1	0,06	0,04	0,8478
X ₁ ² X ₃	0,78	1	0,78	0,56	0,4962
X ₂ X ₃	3,30	1	3,30	2,36	0,1996
X ₁ ²	319,80	1	319,80	228,43	0,0001*
X ₂ ²	233,31	1	233,31	166,65	0,0002*
X ₃ ²	111,40	1	111,40	79,57	0,0009*
Erro puro	5,6	4	1,4		
Total SS	921,8923	16			
R-quadrado				0,994	
Adj R-quadrado				0,976	

X₁, X₂ e X₃ são os valores codificados adimensionais de pH, temperatura e tempo de extração, respectivamente.

*Termos com efeito significativo (p < 0,05).

A significância de cada termo por meio dos valores de P sobre o teor de proteína foi analisada por ANOVA. Os resultados mostraram que houve diferenças no modelo, assim como dois termos lineares (X_1 e X_3) e todos os termos quadráticos foram significativos ($P < 0,01$), enquanto os demais termos não apresentaram diferença ($P > 0,05$).

Os gráficos tridimensionais de MSR (Figura 1-F) foram criados com a variável resposta (Y) no eixo Z contra quaisquer duas variáveis independentes, mantendo a outra variável no valor do ponto central (valor codificado = 0). Por meio destes gráficos é possível observar a interação das variáveis analisadas.

A otimização teve como objetivo obter a quantidade máxima de proteína solúvel. De acordo com a função de desejabilidade, uma metodologia multicritério amplamente utilizada na otimização de procedimentos [29], as condições ótimas de extração foram pH 9,0, tempo de extração de 40 min e temperatura de 50 °C. A extração foi realizada em triplicata nessas condições e obtendo-se 136,89 mg.g⁻¹, enquanto o valor previsto pelo modelo foi de 132,96 mg.g⁻¹ (dados não mostrados), a proximidade dos valores refletem a adequação da validação do modelo.

O processo de extração apresentou um rendimento proteico de 43,47% com um teor de proteína correspondente de 90,48%. A eficiência de extração de proteínas foi de 84,44% (Tabela 4).

A taxa de extração e o teor de proteína total dependem da fonte do subproduto, da cultivar, do processamento e do tipo de biomassa utilizada, bem como do método de extração e das condições aplicadas. No entanto, a quantidade de álcali e a temperatura são fatores decisivos que devem ser controlados para melhorar a recuperação de proteínas [28]. Além disso, a extração alcalina é a extração mais utilizada devido à sua simplicidade, rapidez e baixo custo [30].

Tabela 4 – Parâmetros de extração e cor, propriedades tecnofuncionais, bioativas e antioxidantes do isolado proteico subproduto do aspargo.

<i>Parâmetros</i>	
Teor de proteína (%)	90,48 ± 1,94
Eficiência de extração (%)	84,44 ± 0,67
Rendimento de proteína (%)	43,47 ± 1,23
<i>Parâmetros de cor</i>	
L*	31,91 ± 0,36
a*	-0,01 ± 0,08
b*	-2,11 ± 0,34
<i>Propriedades tecnofuncionais</i>	
Capacidade de absorção de água (g.g ⁻¹)	4,49 ± 0,39
Capacidade de absorção de óleo (g.g ⁻¹)	3,47 ± 0,11
<i>Propriedades bioativas e antioxidantes</i>	
Teor de polifenóis totais (TPC) (mg EAG.g ⁻¹)	7,29 ± 0,58
Ensaio ABTS (TEAC μmol.100 g ⁻¹)	145,76 ± 0,76
Ensaio DPPH (TEAC μmol.100g ⁻¹)	65,21 ± 0,38

Os valores são médias ± DP de determinações triplicadas.

3.4. Caracterização do isolado proteico

3.4.1. Solubilidade, ponto isoelétrico e identificação qualitativa dos aminoácidos

A solução proteica extraída foi avaliada quanto ao pH ideal para precipitar e isolar as proteínas. As proteínas extraídas dos subprodutos do aspargo têm um ponto isoelétrico em pH 3,2 (Figura 2). A solubilidade mínima do material em torno de pH 4, próximo a pH 3, na Figura 3, demonstra repulsão eletrostática, favorecendo a precipitação de partículas. A solubilidade proteica do isolado aumentou entre pH 6 e 8 (Figura 3), mostrando solubilidade dependente do pH. Este perfil de solubilidade máxima em valores de pH alcalino e perfil de solubilidade mínima em valores de pH ácido também foi observado em outras proteínas vegetais, como amaranto, berinjela e isolados de proteína de folha de abóbora [31].

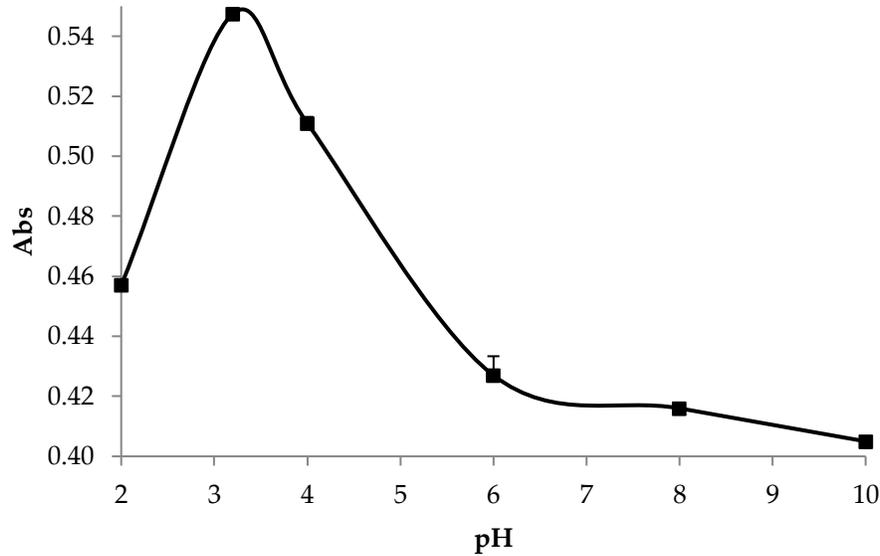


Figura 2 - Ponto isoelétrico da solução proteica de aspargos, determinação da proteína extraída na faixa de pH 2-10.

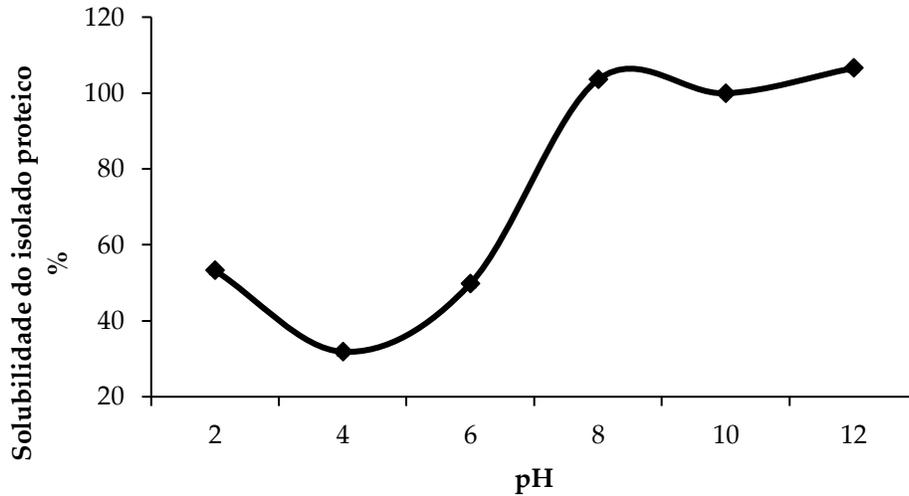


Figura 3 - Perfil de solubilidade do isolado proteico do subproduto do aspargo em diferentes valores de pH.

As diferenças encontradas nos pontos isoelétricos das proteínas vegetais podem ser atribuídas ao conteúdo de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos [27]. Os aminoácidos identificados neste estudo (Figura 4) eram em sua maioria hidrofóbicos, o único aminoácido hidrofílico identificado foi a asparagina.

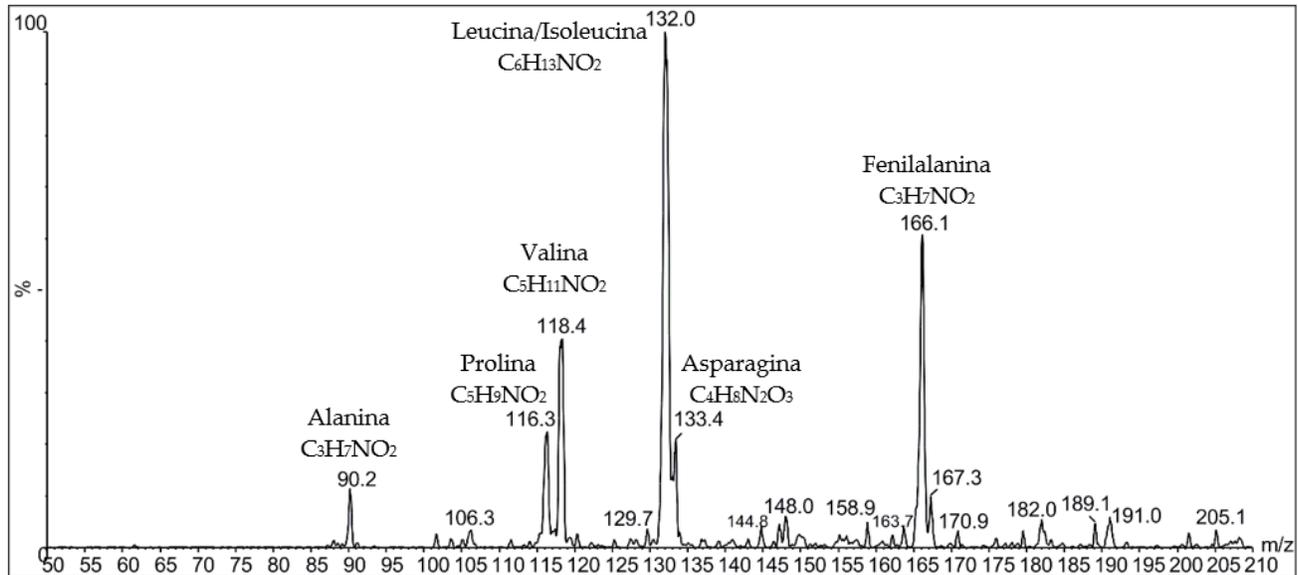


Figura 4 - Composição de aminoácidos do isolado proteico do subproduto do aspargo determinado pelo espectro de massa m/z 50 a 210 obtido por perda neutra 46 Da e identificação pelo método DE NOVO.

A Figura 4 mostra os espectros de massa obtidos em que não foram identificadas possíveis combinações de di- e tripeptídeos com intensidade suficiente para fragmentar (intensidade absoluta próxima a 1000), mas a identificação foi possível usando íons m/z para o isolado: 90, 116, 118, 132, 133 e 166, que caracteriza os aminoácidos alanina, prolina, valina, leucina/isoleucina, asparagina e fenilalanina.

O valor nutricional das proteínas está relacionado ao teor de aminoácidos, suas proporções mútuas e digestibilidade [32]. Os brotos de aspargos têm cerca de 20% de proteína (matéria seca), abundante na maioria dos aminoácidos essenciais, compreendendo 40-43% do total de aminoácidos, com ácido glutâmico e ácido aspártico como aminoácidos dominantes, enquanto metionina, cistina e leucina como aminoácidos limitantes. Cerca de 15 tipos de aminoácidos foram identificados em brotos de aspargos e apresentaram distribuição espacial [33]. Os aminoácidos essenciais identificados neste estudo foram valina, leucina/isoleucina e fenilalanina.

3.4.2. Propriedades estruturais e conformacionais

A Figura 5a mostra os espectros FTIR-ATR das amostras do pó e do isolado proteico de subprodutos de aspargos. Bandas referentes ao estiramento de N-H (ν_{NH}) de proteínas e O-H (ν_{OH}) de carboidratos e água são observadas na região entre 3000 e 3600 cm^{-1} , enquanto os picos entre 3000 e 2818 cm^{-1} podem ser atribuídos ao alongamento antissimétrico de CH_3 e CH_2 , respectivamente [34].

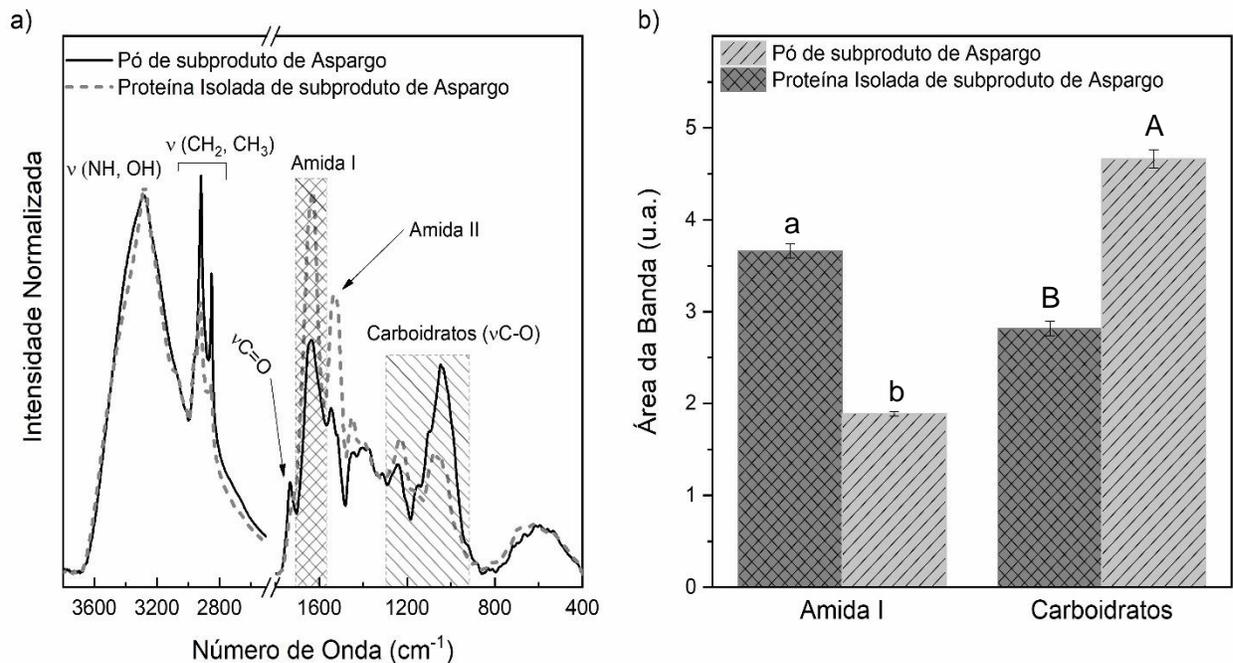


Figura 5 - a) Espectros médios de FTIR-ATR ($n = 3$) de amostras de subprodutos de aspargos em pó e isolado proteico de subproduto de aspargos, as regiões sombreadas correspondem às bandas de amida I e carboidratos. Destacadas em b) estão as áreas de amida I e bandas de carboidratos. Letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para amida I. Letras maiúsculas diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para carboidratos.

Na Figura 5a uma banda centrada em 1731 cm^{-1} é observada apenas para o espectro de subprodutos de aspargos em pó, o que pode estar relacionado ao alongamento C = O (ν_{CO}) de polifenóis, comumente presente em aspargos [34]. O teor de polifenóis totais (Tabela 7) presentes no isolado proteico obtido foi inferior ao presente no pó (11,55 mg GAE.g^{-1}). Durante o processo de extração de proteínas, alguns compostos fenólicos

originalmente presentes na forma solúvel podem ser perdidos, assim como fenólicos que faziam parte da fração ligada à proteína. A extração realizada em pH 9 pode quebrar as interações entre fenóis e proteínas [35].

Ambos os espectros mostraram bandas associadas às amidas I e II encontradas entre 1709 e 1476 cm^{-1} , com a amida I encontrada em números de onda mais altos do que a amida II, centrada, respectivamente, em 1627 e 1525 cm^{-1} . Além disso, o pico centrado em torno de 1400 cm^{-1} é atribuído à deformação assimétrica de CH_3 (δCH_3) e, finalmente, a região entre 1300 e 900 cm^{-1} refere-se ao alongamento CO (νCO) que está associado a carboidratos [34].

Para melhor avaliar as proporções de proteína total (amida I) e carboidratos nas amostras, as áreas das bandas referentes à amida I e carboidratos ($\nu\text{C-O}$) foram obtidas por meio de integração. As análises comparativas das áreas são mostradas na Figura 5 b). Comparando a área das bandas associadas aos carboidratos, é possível observar uma redução na contribuição das bandas no espectro. Enquanto a banda de amida I se torna mais evidente após o isolamento da proteína. Portanto, as amostras apresentaram maiores concentrações de proteína após o isolamento. Esse resultado pode ser verificado na tabela 1 por meio da composição química do pó de aspargos, onde os carboidratos predominam sobre as proteínas.

A banda de amida I é altamente sensível à conformação molecular da proteína [36]. Assim, para determinar os efeitos causados na estrutura após o isolamento proteico, a deconvolução da banda da amida I foi realizada usando o ajuste gaussiano, conforme mostrado na Figura 6a). Este tratamento matemático é necessário, pois as contribuições espectrais das estruturas secundárias na banda da amida I são sobrepostas. Desta forma, foram determinados cinco centros de banda, na região da amida I, referentes às estruturas:

β – Folha, Desordenada, α – Hélice, β – Volta, respectivamente, em 1627, 1644, 1659, 1675 e 1688 cm^{-1} [37].

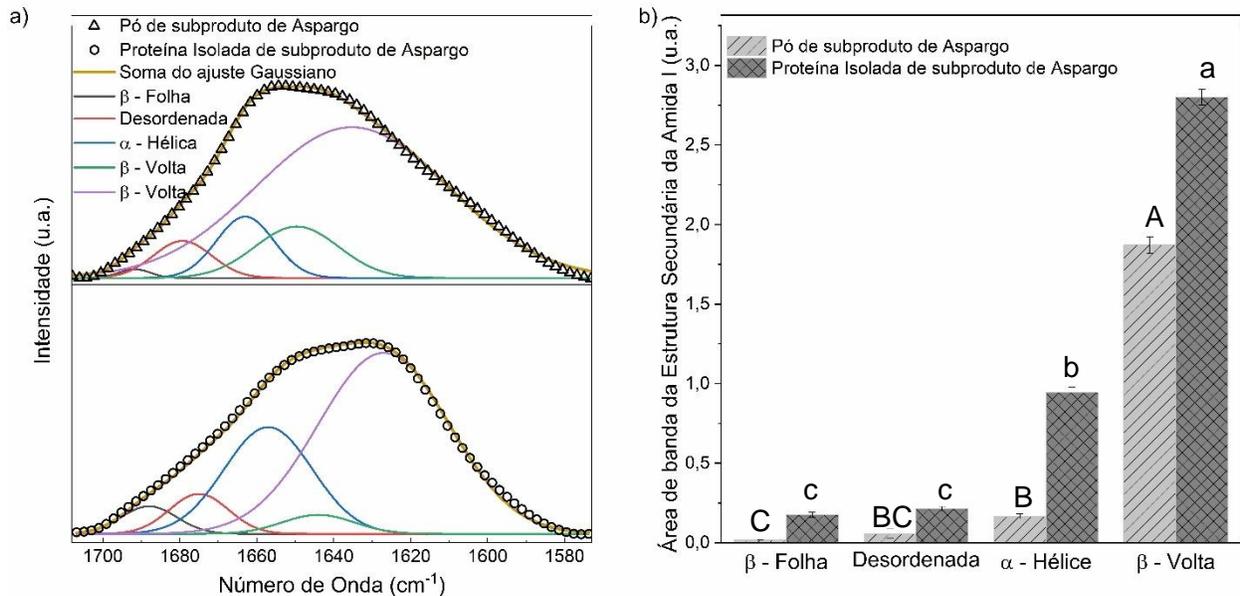


Figura 6 - a) Ajustes gaussianos da banda de amida I do pó e do isolado proteico dos subprodutos do aspargo; b) Área das bandas resultantes do ajuste gaussiano da banda de amida I do pó e isolado proteico dos subprodutos do aspargo (n=3).

Letras maiúsculas diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para o pó de subproduto de aspargos. Letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para o isolado proteico de subproduto de aspargos.

Das áreas obtidas a partir da deconvolução da banda de amida I (Figura 6b), o pó e o isolado proteico subproduto do aspargo apresentam uma dominância da estrutura β -Volta. Os resultados encontrados diferem do isolado proteico de *Moringa oleifera*, que apresentou uma estrutura secundária predominante de β -Folha (31,73%). A alta proporção de β -Volta é importante para a flexibilidade da proteína, contribuindo para a estabilização de emulsões água-óleo, facilitando a emulsão globular da proteína [38]. A quantidade de desordenada foi baixa, sugerindo que as condições ótimas de extração (Tabela 4) causaram pouca tensão,

não promovendo dobramento, o que pode ser justificado pelo fato de a proteína extraída ter sofrido pouca tensão durante o processo de extração.

3.4.3. Propriedades químicas e funcionais

Parâmetros de cor, propriedades tecnofuncionais, compostos bioativos e atividade antioxidante do isolado de subproduto de aspargos obtidos em condições ótimas são apresentados na Tabela 4.

A cor do pó do subproduto do aspargo ($59,28 \pm 0,14 L^*$, $-8,92 \pm 0,11 a^*$ e $24,06 \pm 0,12 b^*$) (dados não publicados), demonstrou maior tendência à luminosidade (L^*), foi mais propensa ao verde (a^*) e tendeu mais ao amarelo (b^*) quando comparada com a cor do isolado proteico (Tabela 4).

A cor verde escura observada no isolado proteico obtido pode ter sido influenciada pela modulação do pH. Em condições alcalinas, a oxidação de compostos fenólicos na matriz proteica pode ser acelerada devido à possível ligação covalente desses compostos com proteínas [28], uma vez que essa interação pode formar polímeros com maior pigmentação.

Os índices de absorção de água (CAA) e óleo e (CAO) do isolado proteico são mostrados na Tabela 4. Os resultados encontrados neste estudo foram superiores ao isolado proteico de tremoço (*Lupinus luteus* L.), alfafa (*Medicago sativa* L.) e folhas de moringa (*Moringa oleifera* L.) [39, 40, 41], e inferiores aos obtidos para isolado proteico de farinha de chia desengordurada [42].

As condições de extração podem influenciar CAA e CAO, pois temperatura e pH ligeiramente mais altos podem fazer com que o isolado proteico obtido se dissocie, fornecendo mais locais de ligação à água nas subunidades quando comparado às subunidades [13]. As proteínas podem interagir com a água e o óleo nos alimentos devido

às propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas dos aminoácidos polares presentes e sua localização na molécula [43].

O teor de polifenóis totais e capacidade antioxidante estão apresentados na Tabela 4. O teor total de polifenóis para o isolado de proteína foi maior do que o encontrado por Vital et al (2020) [44] para aspargos não comerciais ($2,33 \text{ mg GAE.g}^{-1}$), enquanto Garg et al (2020) [28] encontraram $2,8 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ no concentrado de proteína sangri. Os polifenóis podem ser extraídos junto com as proteínas devido à capacidade de interação desses dois compostos. Essa formação complexa leva à formação de compostos solúveis ou insolúveis que podem reduzir ou aumentar a atividade antioxidante dos polifenóis, além de afetar a digestão das enzimas [45].

Frutas e vegetais são as principais fontes de compostos fenólicos na dieta, e a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a ingestão diária seja de 400 g por dia [46]. No entanto, no dia a dia, seu consumo é considerado baixo, resultando na necessidade de incorporar esses compostos no desenvolvimento de novos produtos. Portanto, o isolado proteico obtido pode complementar a ingestão necessária.

O isolado de subprodutos de aspargos apresentou capacidade antioxidante relevante pelos ensaios ABTS e DPPH (Tabela 4). Utilizando o método ABTS, o isolado de subprodutos do aspargo apresentou maior capacidade antioxidante do que o método DPPH. Isso pode ser justificado pela forma como o radical se dissolve no meio, enquanto o ABTS é solúvel em meio orgânico e aquoso, selecionando tanto antioxidantes lipofílicos quanto hidrofílicos, o DPPH se dissolve apenas em meio orgânico, tendo maior seletividade para sistemas hidrofóbicos [47], isso também pode ser verificado através dos valores de CAA e CAO (Tabela 4), onde são observadas características hidrofílicas e lipofílicas no isolado obtido.

4. Conclusões

Os resultados indicaram que as três variáveis estudadas (pH, tempo e temperatura) afetaram significativamente o processo de extração aquosa da proteína de subprodutos de aspargos. As condições ótimas de extração foram obtidas quando o pH de extração foi 9, o tempo foi de 40 min e a temperatura foi de 50 °C. Através da otimização do processo de extração proteica de subprodutos de aspargos foi possível obter um isolado proteico com aminoácidos essenciais; compostos bioativos com atividade antioxidante presente e propriedades tecnofuncionais favoráveis para uso como ingredientes para novos produtos. O conhecimento da composição e estrutura das proteínas solúveis é importante para elucidar sua funcionalidade e orientar suas aplicações futuras. Tendo em vista a viabilidade econômica, mais estudos são necessários para entender os principais desafios das indústrias e produtores rurais no processamento de alimentos e valorizar os recursos proteicos vegetais, bem como os subprodutos do aspargo.

Conflitos de interesse: "Os autores declaram não haver conflitos de interesse."

Agradecimentos: Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento (Processo: 307963/2019-5) e ao COMCAP/UEM pelo uso do FTIR.

Referências

1. Motoki, S. et al. Effects of various asparagus production methods on rutin and protodioscin contents in spears and cladophylls. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2012**, v. 76, n. 5, p. 1047-1050.
2. Chitrakar, B. et al. Bioactive dietary Fiber powder from asparagus leaf by-product: Effect of low-temperature ball milling on physico-chemical, functional and microstructural characteristics. *Powder Technology* **2020**, v. 366, p. 275-282.
3. Food and Agriculture Organization of the United Nations **2017**. *The future of food and agriculture: Trends and challenges*. Fao
4. Sanchez-Sabate, R.; Sabaté, J. Consumer attitudes towards environmental concerns of meat consumption: A systematic review. *International journal of environmental research and public health* **2019**, v. 16, n. 7, p. 1220.
5. Semba, R.D. et al. Legumes as a sustainable source of protein in human diets. *Global Food Security* **2021**, v. 28, p. 100520.
6. Salcedo-Chávez, B. et al. Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, v. 50, n. 22, p. 6515-6520.
7. Kumar, Ma. et al. Functional characterization of plant-based protein to determine its quality for food applications. *Food Hydrocolloids* **2022**, v. 123, p. 106986.
8. Matharu, AS.; De Melo, E.M.; Houghton, J.A. Opportunity for high value-added chemicals from food supply chain wastes. *Bioresource technology* **2016**, v. 215, p. 123-130.
9. Lv, C. et al. Optimization of extraction process of crude protein from grape seeds by RSM. *Food Science and Technology Research* **2016**, 437-445.
10. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-químicos para Análises de Alimentos. 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008. 1020 p.

11. Aguirre, C. et al. Analysis of protein fractions and some minerals present in chan (Hyptissuaveolens L.) seeds. *Journal of food science* **2012**, v. 77, n. 1, p. C15-C19.
12. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **1976**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254
13. Ghorbannezhad, P. et al. Optimization of coagulation–flocculation process for medium density fiberboard (MDF) waste water through response surface methodology. *Desalination and Water Treatment* **2016**, v. 57, n. 56, p. 26916-26931.
14. Makeri, M.U. et al. Comparative physico-chemical, functional and structural characteristics of winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* DC] and Soybean [*Glycine max.*] Protein isolates. *Journal of Food Measurement and Characterization* **2017**, v. 11, p. 835-846.
15. Rodriguez-Ambriz, S.L et al. Composition and functional properties of *Lupinus camperstris* protein isolates. *Plant Foods for Human Nutrition* **2005**, v.60, 99–107.
16. Lin, C.S.; Zayas, J. F. Functional of defatted corn germ proteins in a model system: Fat binding and water retention. *Journal of Food Science* **1987**, v.52, 1308–1311.
17. Saraiva, B.R. et al. Soluble protein isolate from brewing by-product (trub) using the Box-Behnken design. *Journal of Food Processing and Preservation* **2021**, v. 45, n. 10, p. e15871.
18. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* **1965**, v. 16, n. 3, p. 144-158.
19. Ubaldini, A. L. M. et al. Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy study of physicochemical interaction between human dentin and etch-&-rinse adhesives in a

simulated moist bond technique. *Journal of Biomedical Optics* **2012**, v.17(6), p. 065002-065002.

20. Polisel, C.B. et al. Tri-and dipeptides identification in whey protein and porcine liver protein hydrolysates by fast LC–MS/MS neutral loss screening and de novo sequencing. *Journal of Mass Spectrometry* **2021**, v. 56, n. 2, p. e4701.
21. Cantú, M. et al. Peptide sequencing using pasta spectrometry: a practical guide. *Quimica Nova* **2008**, v.31, 669–675.
22. Hadidi, M. et al. Optimisation of steam blanching on enzymatic activity, color and protein degradation of alfalfa (*Medicago sativa*) to improve some quality characteristics of its edible protein. *Food chemistry* **2019**, v. 276, p. 591-598.
23. Moreno-Nájera, L.C. et al. Green technologies for the extraction of proteins from jackfruit leaves (*Artocarpus heterophyllus* Lam). *Food Science and Biotechnology* **2020**, v. 29, n. 12, p. 1675-1684.
24. Shi, W. et al. The extraction of tobacco protein from discarded tobacco leaf by hollow fiber membrane integrated process. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2019**, v. 58, p. 102245.
25. Kaur, G.; Bhatia, S. Alpha-amylase-assisted extraction of protein concentrates from *Raphanussativus* L. leaves. *Biomass Conversion and Biorefinery* **2022**, p. 1-1
26. Zhao, M. et al. Enhancing the solubility and foam ability of rice glutelin by heat treatment at pH12: Insight into protein structure. *Food Hydrocolloids* **2020**, v. 103, p. 105626.
27. Damodaran, S. Amino acids, peptides, and proteins. In S. Damodaran, K. L. Parkin, & O. R. Fennema (Eds.), *Fennema's food chemistry*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008, (pp. 179–262).

28. Garg, D.; Chakraborty, S.; Gokhale, J.S. Optimizing the extraction of protein from *Prosopis cineraria* seeds using response surface methodology and characterization of seed protein concentrate. *LWT* **2020**, v. 117, p. 108630.
29. Bezerra, M.A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **2008**, v. 76, n. 5, p. 965-977.
30. Del Mar Contreras, M. et al. Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status. *Bioresource Technology* **2019**, v. 280, p. 459-477.
31. Famuwagun, A.A. et al. Comparative study of the structural and functional properties of protein isolates prepared from edible vegetable leaves. *International Journal of Food Properties* **2020**, v. 23, n. 1, p. 955-970.
32. Pęksa, A.; Miedzianka, J. Potato industry by-products as a source of protein with beneficial nutritional, functional, health-promoting and antimicrobial properties. *Applied Sciences* **2021**, v. 11, n. 8, p. 3497.
33. Chitrakar, B.; Zhang, M.; Adhikari, B. Asparagus (*Asparagus officinalis*): Processing effect on nutritional and phytochemical composition of spear and hard-stem byproducts. *Trends in Food Science & Technology* **2019**, v. 93, p. 1-11.
34. Ku, Y.G. et al. Detection of bioactive compounds in organically and conventionally grown asparagus spears. *Food analytical methods* **2018**, v. 11, p. 309-318.
35. Rodriguez, M.; Tironi, V.A. Polyphenols in amaranth (*A. mantegazzianus*) flour and protein isolate: Interaction with other components and effect of the gastrointestinal digestion. *Food Research International* **2020**, v. 137, p. 109524.
36. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **2007**, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.1073-1101.

37. Banhara, V.F. et al. Análise das alterações de biomoléculas causadas pela exposição ao fármaco diclofenaco sódico em peixes da espécie *Brycon Opalinus* utilizando a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). *Research, Society and Development* **2022**, v. 11, n. 14, p. e202111436083-e202111436083.
38. Bassogog, C.B.B. et al. Effect of heat treatment on the structure, functional properties and composition of *Moringa oleifera* seed proteins. *Food Chemistry*, **2022**, v. 384, p. 132546.
39. Domínguez, R. et al. Optimization and Characterization of Lupin Protein Isolate Obtained Using Alkaline Solubilization-Isoelectric Precipitation. *Foods* **2023**, v. 12, n. 20, p. 3875.
40. Sahni, P.; Sharma, S.; Surasani, V.K.R. Influence of processing and pH on amino acid profile, morphology, electrophoretic pattern, bioactive potential and functional characteristics of alfalfa protein isolates. *Food Chemistry* **2020**, v. 333, p. 127503.
41. Bocarando-guzmán, M.D. et al. Comparison of the physicochemical and functional properties of flour and protein isolate from moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *International Journal of Food Properties* **2022**, v. 25, n. 1, p. 733-747.
42. Khushairay, E.S.I. et al. The nutritional and functional properties of protein isolates from defatted chia flour using different extraction pH. *Foods* **2023**, v. 12, n. 16, p. 3046.
43. Aryee, A.N.A.; Agyei, D.; Udenigwe, C.C. Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. In: *Proteins in food processing*. Wood head Publishing **2018**, p. 27-45.
44. Vital, A.C.P. et al. Use of asparagus flour from non-commercial plants (residue) for functional pasta production: Asparagus flour for functional pasta production. *Journal of Food Science and Technology* **2020**, v. 57, p. 2926-2933.

45. Bandyopadhyay, P.; Ghosh, A.K.; Ghosh, C. Recent developments on polyphenol–protein interactions: Effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. *Food &function* **2012**, v. 3, n. 6, p. 592-605.
46. Medina-Jaramillo, C. et al. Active and smart biodegradable packaging based on starch and natural extracts. *Carbohydrate Polymers* **2017**, v. 176, p. 187-194.
47. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, v. 22, n. 7, p. 3380.

ARTIGO 2

Isolado Proteico de Subprodutos de Aspargos: Uma Fonte Alternativa Sustentável com Elevada Qualidade Nutricional e Funcional

Aline Cristini dos Santos-Silva¹, Bianka Rocha Saraiva², Fernando Antônio Anjo¹, Larissa Aparecida Ricardini Junqueira³, Marco Aurelio Schüler de Oliveira³ e Paula Toshimi Matumoto-Pintro^{1,2*}

¹ Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900, Maringá, Brasil; alinecristinisantossilva@gmail.com (A.C.d.S-S.); fernandoanjo@hotmail.com (F.A.)

² Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900, Maringá, Brasil; bianka_saraiva@hotmail.com

³ Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900, Maringá, Brasil; masoliveira2@uem.br (M.A.S.d.O); larissaricardini@gmail.com (L.)

FOOD BIOSCIENCE

Resumo

O crescimento populacional e a escassez de recursos naturais impulsionam a busca por fontes alternativas de proteína. As proteínas vegetais são mais sustentáveis e representam um menor impacto ambiental do que outras fontes proteicas, portanto, o objetivo do estudo foi caracterizar e avaliar as propriedades funcionais do isolado proteico obtido a partir de subprodutos de folhosos de aspargos (*Asparagus officinalis* L.), um material vegetal pouco explorado. O isolado proteico foi obtido por extração alcalina e submetido à análise de propriedades funcionais, taninos, perfil de aminoácidos, digestibilidade *in vitro* e potencial bioativo. Os resultados demonstraram que os isolados proteicos apresentam uma composição de aminoácidos relevante com coeficiente de eficiência proteica (CEP) >1,5, sendo que os aminoácidos essenciais correspondem a 49,13%. As propriedades tecnológicas, como capacidade de formação de espuma e emulsão foram dependentes do pH. O processo de extração não afetou a integridade da proteína, conforme demonstrado pela análise por eletroforese. O isolado obtido apresentou uma digestibilidade de 86,18%. A atividade antioxidante, avaliada por meio dos ensaios ABTS e DPPH, mostrou um aumento significativo após o processo de digestão. Os polifenóis totais também aumentaram, sugerindo que a digestão enzimática influenciou a atividade antioxidante e a liberação de polifenóis. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o isolado proteico de subprodutos folhosos de aspargos representa uma alternativa viável e sustentável para a obtenção de proteínas vegetais.

Palavras-chave: Proteínas vegetais, propriedades funcionais, sustentabilidade, aminoácidos, digestibilidade.

1. Introdução

O crescimento da população global, combinado com a crescente escassez de recursos como terras aráveis e água doce, tem intensificado a busca por fontes alternativas de proteína para atender às demandas nutricionais. As proteínas vegetais têm ganhado destaque devido à sua produção mais sustentável, que requer menos recursos naturais e gera menores emissões de gases de efeito estufa em comparação com as proteínas de origem animal (Gorissen et al., 2018).

O uso de proteínas de folhas verdes como ingredientes em formulações de alimentos ainda é limitado, exigindo mais investigações para entender seu impacto nas propriedades tecnológicas e sensoriais dos alimentos. Essas proteínas têm vantagens específicas, como a capacidade de formar espuma e estabilizar emulsões em condições de baixa temperatura e concentração. Além disso, as proteínas de folhas verdes contêm altos níveis de aminoácidos essenciais (Anoop et al., 2023).

Dentre as diversas fontes vegetais com potencial para aplicação na indústria alimentícia, o aspargo (*Asparagus officinalis* L.) se destaca não apenas por suas propriedades nutricionais e funcionais, mas também por sua relevância comercial e farmacológica. Seus benefícios incluem ações antidiabéticas, anticancerígenas, antioxidantes, hipolipidêmicas e antimicrobianas (Lee et al., 2014). A produção global de aspargos é liderada pela China, responsável por mais de 84% (7,8 milhões de toneladas por metro), seguida pelo Peru, México e Alemanha. O mercado global representa uma receita de mais de US\$ 20 bilhões em 2017, projetada para chegar a US\$ 30 bilhões em 2027 (Chitrakar; Zhang; Adhikari, 2019).

Além de suas propriedades nutricionais, o aspargo é amplamente utilizado na indústria alimentícia devido ao seu sabor palatável e versatilidade, sendo ingrediente essencial em

sopas, vegetais mistos e produtos em conserva. O aumento da demanda por produtos prontos para consumo e frescos impulsionou o crescimento do mercado de aspargos, destacando sua relevância econômica e agrícola em climas temperados e subtropicais (Guo et al., 2020). Vale ressaltar que a fração comercial de aspargos corresponde a menos de 25% da planta (caules comestíveis), enquanto os 75% restantes são considerados subprodutos (caules fibrosos, raízes e folhas) (Chitrakar; Zhang; Adhikari, 2019). No entanto, esses subprodutos com alto potencial de aplicação como ingredientes alimentícios têm sido pouco utilizados. Seu alto valor nutricional e propriedades promotoras da saúde são semelhantes aos da parte comercial da planta e podem ser reutilizados (Santos-Silva et al., 2024).

A eficiência de uma fonte de proteína depende não apenas de sua composição de aminoácidos, mas também de sua digestibilidade, biodisponibilidade e presença de fatores antinutricionais. A resposta à ingestão de proteínas pode variar substancialmente entre as fontes, sendo influenciada por fatores fisiológicos e dietéticos, como taxa de absorção e perfil de aminoácidos essenciais (Atherton et al., 2010).

A aplicação de proteínas vegetais em sistemas alimentares requer que elas apresentem características desejáveis, conhecidas como propriedades funcionais, e desempenho satisfatório em diferentes matrizes alimentares. Nesse contexto, as proteínas vegetais surgem como ingredientes promissores para atender às demandas por alternativas sustentáveis e nutricionalmente adequadas. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar e avaliar as propriedades funcionais de isolados proteicos de subprodutos folhosos de aspargos.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Os subprodutos folhosos do aspargo (SUF) foram coletados, sanitizados, desidratados a 55 °C em estufa com circulação de ar e moídos. Isolado proteico (90,48 % de proteína) de subprodutos folhosos de aspargos (ISA) obtidos por extração alcalina (pH 9, tempo 40 min e temperatura 50 °C) com condições otimizadas de acordo com Santos-Silva et al. (2024) foi armazenado ao abrigo da luz a 4 °C para análises posteriores.

2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida desnaturante de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel separador utilizado foi de 12% (m/v) e o gel de empilhamento foi de 4%. A eletroforese foi realizada em sistema vertical seguindo as instruções do fabricante (Biorad). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (dodecilsulfato de sódio - SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01%, Tris(hidroximetil)aminometano-HCl 0,0625 mol/L pH 6,8, β-mercaptoetanol 5%) e aquecidas à 80 °C antes da aplicação. A tensão de funcionamento variou de 220 a 250 V, usando tampão Laemmli (3 g/L Tris-base, 14 g/L de glicina e 1 g/L de SDS). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com o corante Coomassie Blue R-250 e em uma solução contendo 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

2.3. Determinação de compostos de taninos

Os taninos foram determinados pela diferença entre os compostos fenólicos totais obtidos antes e após a precipitação da proteína com polivinilpirrolidona (PVPP), conforme descrito por Folin & Ciocalteau (1927) e Mueller-Harvey (2001) com modificações. Os compostos bioativos foram extraídos em água e homogeneizados com PVPP por 60 min e

depois centrifugados a 963 g por 10 min. Os compostos fenólicos totais foram determinados no sobrenadante e os compostos fenólicos simples foram determinados. A concentração de tanino foi calculada como a diferença entre os compostos fenólicos totais e os compostos fenólicos simples, e expressa em miligramas de equivalentes de ácido tânico (EAT) por 100 gramas.

2.4. Capacidade de formação de gel

De acordo com o método adaptado desenvolvido pela Ogunwolu et al. (2009), suspensões em água destilada contendo diferentes concentrações (2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% e 20%) de ISA em pH natural foram preparadas em microtubos de centrífuga. As amostras foram aquecidas em banho-maria a 100 °C por 1 hora, seguido de resfriamento em banho de gelo por 10 min e posteriormente mantidas refrigeradas por 120 min. Após esse processo, os tubos foram invertidos lentamente, em ordem crescente de concentração, para verificar a formação de um gel coesivo forte a cada concentração. A menor concentração (g/mL) na qual a amostra não apresentou fluxo foi chamada de Concentração Mínima de Gelificação (CMG).

2.5. Capacidade de formação de espuma e estabilidade da espuma

A capacidade de formação de espuma e a estabilidade foram determinadas de acordo com o método de Klompong et al. (2007) com modificações, em que 50 mg de ISA foram misturados com 50 mL de água destilada e o pH foi ajustado para pH 2, 4, 6, 8, 10 e 12 com 1 ou 3 N HCl/NaOH, seguido de homogeneização a 30.000 rpm usando um homogeneizador (IKA Labortechnik, Selangor, Malásia) para incorporar ar por 1 min em temperatura ambiente. A amostra misturada foi imediatamente transferida para um cilindro e

o volume total foi medido no tempo zero. A capacidade de formação de espuma e a estabilidade foram então calculadas usando as equações 1 e 2:

(1)

$$\text{Capacidade de formação de espuma (\%)} = \frac{V_2 - V_1}{V_1} \times 100$$

(2)

$$\text{Estabilidade da espuma (\%)} = \frac{V_3}{V_2} \times 100$$

Onde, V_2 é o volume total imediatamente após a homogeneização, V_1 é o volume total antes da homogeneização e V_3 é o volume total 10 min, 30 min e 60 min após a homogeneização, respectivamente.

2.6. Capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão

A capacidade emulsificante e sua estabilidade foram determinadas de acordo com a Pedroche et al. (2004) com modificações. ISA (300 mg) foram homogeneizadas com 30 mL de água destilada, e o pH foi ajustado para 2, 4, 6, 8, 10 e 12. Óleo de soja (10 mL) foi adicionado. As amostras foram homogeneizadas (sonda S 25 KV-18 G) por 1 min a 30.000 rpm e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min. A atividade emulsificante foi calculada dividindo-se o volume da camada emulsificada pelo volume da emulsão antes da centrifugação. A estabilidade da emulsão foi determinada por aquecimento por 30 min a 80 °C e, após atingir a temperatura ambiente, foram centrifugadas. A estabilidade da emulsão foi expressa como a porcentagem de atividade emulsificante remanescente após o aquecimento.

2.7. Análise de aminoácidos

O teor de aminoácidos do ISA foi analisado seguindo a metodologia descrita por Zatta Cassol et al. (2024) com modificações. A amostra contendo 3 mg de proteína foi submetida à hidrólise com HCl 6N por 18 h a 110 °C. Após o resfriamento à temperatura ambiente, o hidrolisado foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL, e o volume foi completado com água ultrapura. Uma alíquota de 50 µL foi transferida para um frasco que permaneceu em um dessecador sob vácuo até a evaporação completa do solvente (± 16 h). O resíduo seco foi então submetido à derivatização usando o kit AccQ.Fluor (Waters®).

A identificação dos aminoácidos derivatizados foi realizada usando um detector de fluorescência (modelo 2475, Waters®). As análises foram realizadas em coluna AccQ-Tag (3,9 × 150 mm; 3 µm) em condições controladas, com temperatura de 37 °C e vazão de 1,0 mL/min. Os comprimentos de onda usados para excitação e emissão foram 250 nm e 395 nm, respectivamente. A fase móvel seguiu o protocolo estabelecido pelo kit AccQ-Tag (Waters®). Para quantificação, foi utilizada uma curva padrão construída com padrões externos e aminoácidos hidrolisados (Amino Acid Hydrolysate Standard). A aquisição e o processamento dos dados foram realizados pelo software Empower 2 (Waters®).

A concentração total de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) foi obtida pela soma das concentrações individuais de leucina, isoleucina e valina.

A composição de aminoácidos do ISA foi usada para determinar os parâmetros nutricionais:

Os coeficientes de eficiência proteica (CEP) foram calculadas de acordo com Mir, Riar e Singh (2019) com as equações 3 e 4:

$$CEP_1 = - 0.684 + 0.456 \times \text{Leu} - 0.047 \times \text{Pro} \quad (3)$$

$$CEP_2 = - 0.468 + 0.454 \times \text{Leu} - 0.105 \times \text{Tir} \quad (4)$$

2.8. Digestão gastrointestinal *in vitro* e avaliação do potencial bioativo

Utilizou-se o método de digestibilidade *in vitro* pepsina-pancreatina com base em González-Montoya et al. (2018) com modificações. SUF (700mg) e ISA (300mg) foram suspensos em tampão fosfato (pH 7,5). Em seguida, a fase gástrica foi iniciada ajustando o pH para 2,0 com 1 N HCl e adição de 12 mg de pepsina. A solução foi incubada por 2h sob agitação a 37 °C. Posteriormente, iniciou-se a fase intestinal com ajuste do pH para 7,5 com NaOH 1 N e adição de 12 mg de pancreatina. A solução foi incubada por 4h sob agitação a 37 °C. A digestão foi interrompida por inativação enzimática da solução a 100 °C por 10 min e centrifugação a 8500 *xg* por 15 min a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C até análise posterior.

O método de Bradford (1976) foi utilizado para determinar o teor de proteína solúvel. A digestibilidade foi determinada usando a equação 5 (Almeida et al., 2015):

(5)

$$\% \text{ Digestibilidade} = \left(1 - \frac{Pa - Pb}{Pz} \right) \times 100\%$$

Onde o teor de proteína na amostra e no branco é representado por Pa e Pb, respectivamente, e Pz corresponde ao teor de proteína presente na alíquota coletada no tempo zero, quando a amostra foi solubilizado antes do início da digestão.

O potencial bioativo foi analisado antes e após a digestão, através da atividade antioxidante e do teor de polifenóis totais. A capacidade antioxidante foi determinada pelos ensaios ABTS (RE et al., 1999) e DPPH (LI et al., 2009) de acordo com as modificações de Saraiva et al. (2021). Os polifenóis totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton; Rossi, 1965). Os resultados da eliminação de radicais livres foram

expressos em porcentagem, e o teor de polifenóis totais, em mg de EAG (equivalente ao ácido gálico).

2.9. Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata. Foram calculadas médias e desvios-padrão para cada variável. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o modelo linear geral (GLM) com SPSS (v.15.0) (IBM SPSS Statistics, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Para diferenças estatisticamente significativas, foi utilizado o teste de Tukey com nível de significância de 5%.

3. Resultados e Discussão

3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil proteico de ISA determinado por SDS-PAGE é apresentado em Fig. 1. Observa-se uma banda proteica proeminente próxima a 45 kDa. Embora a identidade dessa proteína seja desconhecida, ela serve como um marcador de integridade da proteína após as etapas de processamento utilizadas. Outras proteínas podem estar presentes nos subprodutos folhosos de aspargos, como aquelas associados à clorofila e proteínas ligadas à membrana celular, no entanto, essas proteínas podem ter sido removidas durante as etapas processamento das folhas.

Em um estudo preliminar (Santos-Silva et al., 2024), foi realizado fracionamento de proteínas em ISA com base em sua solubilidade. Dentre as frações solúveis analisadas, a que apresentava maior solubilidade em soluções alcalinas foi predominante (glutelina 22,88%).

O perfil proteico total da SUF após o processo de isolamento proteico demonstrou preservação da integridade proteica e a eficácia do método utilizado na manutenção da composição proteica original, sem sinais de degradação significativa ou perda de frações essenciais.

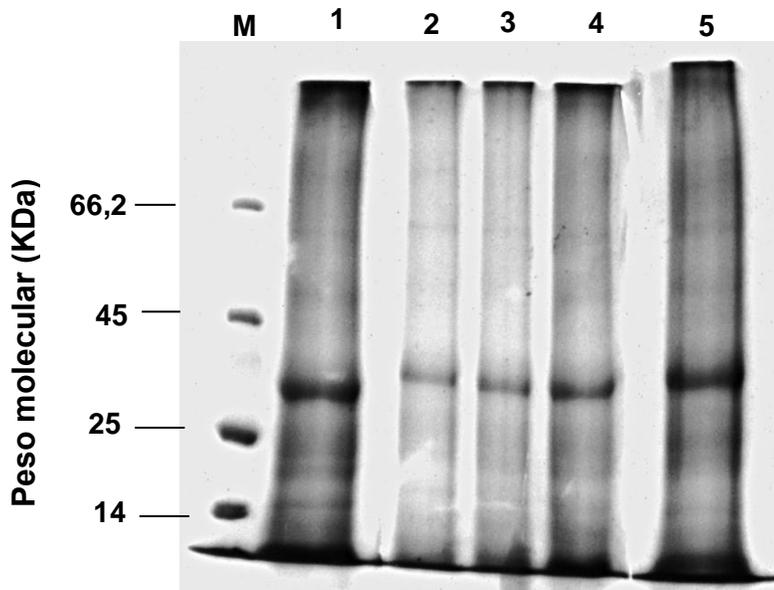


Figura 1. SDS-PAGE (12%) do isolado proteico de subprodutos folhosos de aspargos 0,5 μL (1) e pó de subprodutos folhosos de aspargos antes da extração 5 μL (2), 7,5 μL (3), 1,5 μL (4) e 25 μL (5), respectivamente. A coluna M contém o marcador de massa molecular, com as respectivas massas em KDa anotadas.

A ausência de mudanças perceptíveis no padrão proteico pode ser atribuída à manutenção da estabilidade conformacional da proteína. A análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do isolado proteico revelou a manutenção da estrutura secundária, sem alterações significativas que indicassem desnaturação ou perda expressiva de α -hélices e β -folhas após o processo de extração. No entanto, observou-se uma maior relevância da estrutura em β -volta, sugerindo possíveis rearranjos conformacionais durante a extração (Santos-Silva et al., 2024). Condições controladas, como temperatura moderada e pH estabilizado, desempenham um papel crucial na minimização

de mudanças estruturais e químicas. Esses fatores são cruciais para preservar tanto a funcionalidade quanto a solubilidade das proteínas, garantindo sua integridade durante os procedimentos de extração (Narayan, 2020).

3.2. Capacidade de gelificação

A MCG avalia a capacidade de uma proteína de formar géis; concentrações mais baixas indicam maior eficiência de gelificação. Conforme mostrado na Tabela 1, o ISA gelificou a uma concentração mínima de 18%. Este valor é superior aos 9% observados no concentrado de proteína da folha de rabanete (*Raphanus sativus* L.) (Kaur e Bhatia, 2022) e aos 14–16% no concentrado de proteína do grão-de-bico (Ghribi et al., 2015).

Tabela 1. Menor concentração de gelificação (MCG) de isolado de proteína de subprodutos folhosos de aspargos.

Repetição	% (p/v)									
	2%	4%	6%	8%	10%	12%	14%	16%	18%	20%
1	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+
2	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+

(-) sem gel; (±) gel fraco; (+) gel firme. A concentração na qual as três réplicas formaram um gel é considerada como MCG.

A formação de géis proteicos é influenciada por vários fatores, incluindo concentração de proteínas, força iônica, pH e possíveis interações sinérgicas com outros compostos (Raikos et al., 2014). A força do gel formado está diretamente relacionado à capacidade das proteínas de formar ou estabilizar uma rede tridimensional coesa por meio de ligações intermoleculares. Géis mais firmes resultam de redes proteicas densas, enquanto géis fracos ocorrem por agregação menos estruturada (Tang; Roos; Miao, 2024). Em aplicações alimentícias, como geleias, pudins, produtos cárneos e sobremesas, a capacidade de gelificação é uma propriedade altamente desejável.

A gelificação avaliada no pH natural em ISA foi próxima ao seu ponto isoelétrico (pH 3,2). Essa condição facilitou o processo de gelificação devido à redução da carga superficial das moléculas proteicas, que tende a se aproximar de zero nesse pH. No entanto, em pHs mais distantes do ponto isoelétrico, o aumento da carga superficial das moléculas intensifica as forças repulsivas, dificultando a formação de agregados e, conseqüentemente, de géis estruturados (Lawal, 2004). Por esse motivo, as concentrações mínimas de gelificação em outros pHs não foram avaliadas neste estudo.

3.3. Propriedades de formação de espuma

A capacidade de formação de espuma foi maior em pH 10 (Fig. 2A), mas não diferiu significativamente ($p > 0,05$) do pH 2 e pH 8. Neste pH houve uma maior exposição de regiões hidrofílicas e hidrofóbicas da proteína, o que colaborou para este aumento na espuma. Esse comportamento pode ser atribuído a solubilidade do ISA nesses valores de pH. Santos-Silva et al., (2024) verificaram que a solubilidade proteica do ISA é dependente do pH. A maior solubilidade das proteínas, resultante de alterações no pH, temperatura e/ou interação com solventes, favorece o seu desdobraimento e a formação de membranas proteicas interfaciais na interface ar-água, promovendo o encapsulamento de bolhas de ar. (Adebiyi; Aluko, 2011). Essa característica é importante para a produção de espumas alimentares (ex.: mousses, merengues) e massas fermentadas (pães, bolos).

O ISA não formou espuma em pH 4, possivelmente porque a solubilidade e a atividade superficial das proteínas diminuíram perto de seu ponto isoelétrico e sua capacidade de gerar repulsão eletrostática entre bolhas de gás também diminuiu. Resultados semelhantes foram encontrados em proteína de chá (Wang et al., 2014).

A estabilidade da espuma foi dependente do pH (Fig. 2B). Em pH 6, ISA mostrou maior estabilidade, embora a formação de espuma tenha sido reduzida. Esse comportamento pode

estar associado ao aumento da densidade de carga proteica nesse pH, o que favorece a estabilização da espuma por meio do aumento das repulsões eletrostáticas, dificultando a rápida coalescência das bolhas de ar (Adebiyi; Aluko, 2011). A estabilidade da espuma é a capacidade de uma espuma de manter sua forma e volume ao longo do tempo e é uma característica desejável em alimentos como cerveja, café e massas (Famuwagun et al., 2020).

Roger e Rawdkuen (2020) avaliaram a proteína da folha de moringa (*Moringa oleifera*) e encontraram maior estabilidade da espuma perto do ponto isoelétrico, comportamento semelhante ao observado neste estudo. Esse comportamento pode ser atribuído à formação de uma proteína mais espessa e rígida na interface ar-água, favorecida pela redução das repulsões eletrostáticas entre as moléculas da proteína.

A maior capacidade de formação de espuma foi em pH 10 (40 %) (Fig. 2A), demonstrando uma estabilidade de aproximadamente 13% após 10 minutos, enquanto em pH 2 manteve cerca de 15% da espuma após 60 minutos. Esses resultados sugerem que, embora a estabilidade da espuma seja um fator relevante, a quantidade inicial de espuma formada também deve ser considerada na avaliação da funcionalidade da proteína. Além disso, é importante considerar que a estabilidade da espuma foi medida em solução aquosa, mas a funcionalidade da proteína pode ser alterada em sistemas mais complexos, como matrizes alimentares sólidas ou semissólidas. Em produtos como massas, cremes e emulsões, a interação da proteína com outros componentes, como lipídios e carboidratos, pode modificar sua capacidade espumante e estabilidade.

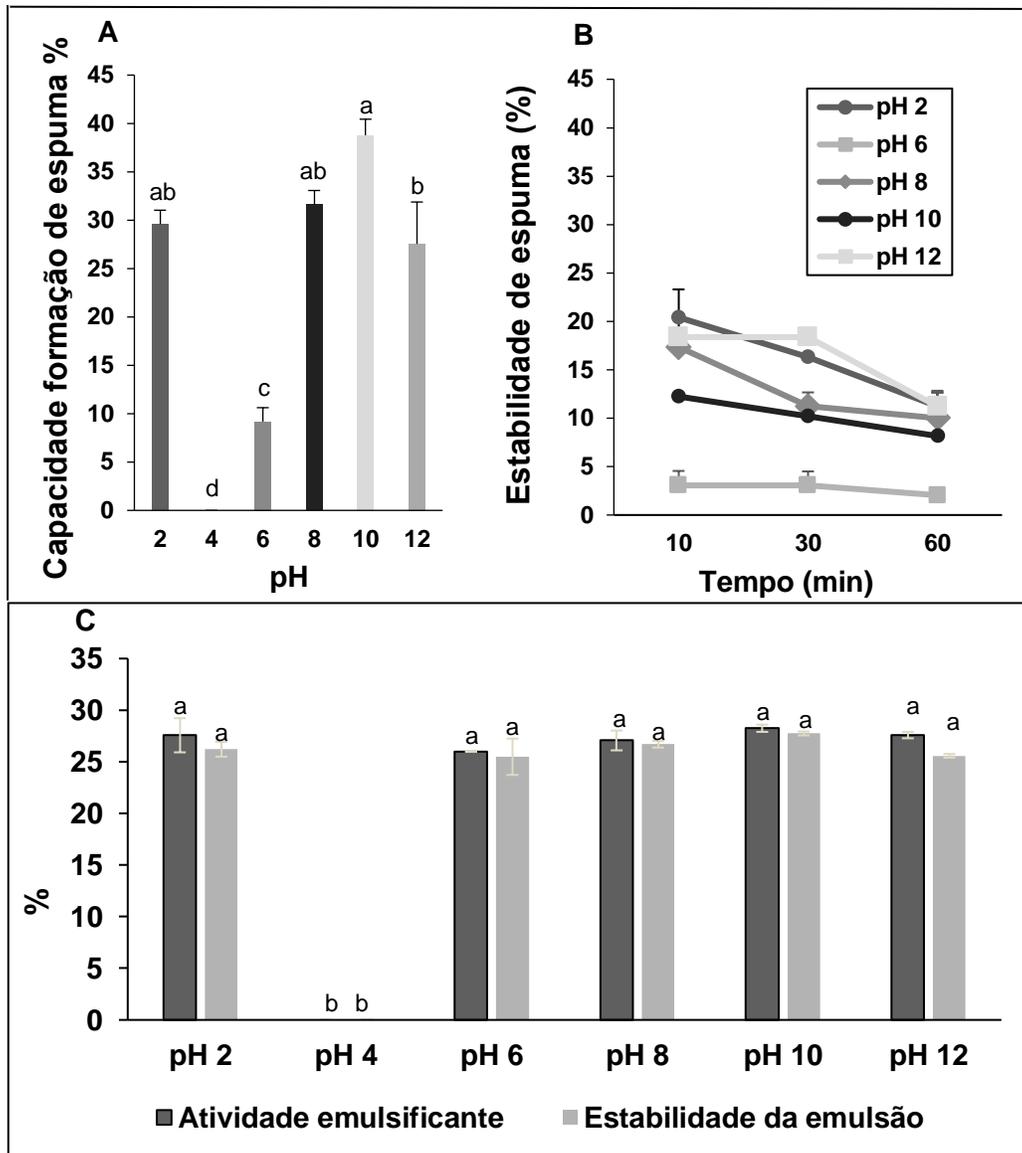


Figura 2. Propriedades de formação de espuma e de emulsificação de ISA (A) capacidade de formação de espuma B estabilidade da espuma e C atividade emulsificante e estabilidade da emulsão. Os valores são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

3.3. Propriedades emulsificantes

Neste estudo, foi observada a influência do pH na atividade emulsificante e na estabilidade da emulsão (Fig. 2C). Em pH 4, o isolado de subprodutos folhosos de aspargos não apresentou ambas as propriedades, sugerindo que a proximidade ao ponto isoelétrico reduz a capacidade de emulsificação devido à maior propensão à agregação de proteínas

nessa faixa de pH. As propriedades emulsificantes das proteínas estão diretamente relacionadas à sua estrutura molecular. As proteínas têm natureza anfifílica, com extremidades hidrofóbicas e hidrofílicas que permitem interações efetivas óleo-água, promovendo a estabilidade da emulsão (Blasco, Vinas e Villa, 2011).

Em pH 2, 6, 8, 10 e 12, a atividade emulsificante e a estabilidade da emulsão foram significativamente maiores (Fig. 2C) do que em pH 4, o que pode estar associado à distância do ponto isoelétrico, facilitando a solubilidade e a interação com as fases dispersas da emulsão. A capacidade emulsificante mede a habilidade de uma proteína de formar uma emulsão, enquanto a estabilidade da emulsão avalia a habilidade da proteína de manter a emulsão estável por um determinado período de tempo. Ambas as propriedades funcionais são essenciais não apenas para a formação e estabilização de emulsões de gordura em sistemas alimentares, mas também para uma ampla gama de aplicações, como em sorvetes, cremes, molhos e massas (Kaur e Bhatia, 2020). A modificação do pH pode alterar a conformação proteica, favorecendo a emulsificação ao influenciar a interação proteína-lipídio e a formação de interfaces estáveis. Nesse contexto, a presença da estrutura β -volta em ISA, pode desempenhar um papel relevante na estabilização dessas matrizes alimentares (Santos-Silva et al., 2024).

3.4. Análise de aminoácidos

O perfil de aminoácidos é importante para determinar a qualidade nutricional de uma proteína. Conforme mostrado na Tabela 2, o ISA apresentou 49,13% de aminoácidos essenciais. O organismo não é capaz de sintetizar aminoácidos essenciais, que devem ser obtidos por meio da dieta (Neinast; Murashig; Arany, 2019). Esse resultado foi superior ao encontrado no isolado de folha de amaranto (*Amaranthus spp.*) (42,92%), isolado de folha

de berinjela (*Solanum melongena*) (41,27%) e isolado de folha de abóbora canelada (*Cucurbita moschata*) (44,25%) (Famuwagun et al., 2020).

Os aminoácidos contendo enxofre, como metionina e cisteína, presentes no ISA são de grande relevância, pois esses compostos desempenham um papel essencial nas propriedades funcionais das proteínas, facilitando a formação de pontes dissulfeto que contribuem para a estabilidade estrutural da proteína (Ducrocq et al., 2020). Esses resultados destacam o potencial nutricional e funcional do ISA como fonte de proteína sustentável e de alta qualidade.

A presença de todos os aminoácidos essenciais avaliados no ISA reflete sua qualidade proteica relevante e alto potencial para contribuir com as necessidades proteicas. Ingredientes proteicos com perfis de aminoácidos essenciais apresentam benefícios relacionados à síntese proteica, recuperação muscular e manutenção da saúde geral. Além disso, os aminoácidos não essenciais mais abundantes no ISA foram o ácido glutâmico (10,07%) e o ácido aspártico (8,14%), ambos comumente encontrados em extratos proteicos vegetais. Esses aminoácidos exercem benefícios à saúde devido à sua capacidade de neutralizar os radicais livres, evitando a propagação de danos oxidativos (Yu et al., 2021).

O valor total de BCAAs observado no presente estudo (Tabela 2) expressa a qualidade proteica do ISA. Nas proteínas disponíveis comercialmente, os BCCAs estão presentes em 19,50% na caseína e 18,10% no isolado de proteína de soja (Hulmi; Lockwood; Stout, 2010). ISA tem quantidade semelhante aos BCCAs comerciais, fazendo dele um produto que pode ser comercializado como suplemento.

Os BCAAs são compostos por leucina, isoleucina e valina e desempenham papéis essenciais no metabolismo energético, na síntese de proteínas musculares e na recuperação após o esforço físico. Além disso, o perfil de BCAAs pode impactar positivamente a

percepção sensorial e as propriedades tecnológicas do ingrediente proteico, uma vez que esses aminoácidos contribuem para o sabor e a funcionalidade nas formulações de alimentos (Santos & Nascimento, 2019).

A qualidade da proteína pode ser avaliada pelo coeficiente de eficiência proteica (CEP), que apresenta boa correlação com os valores obtidos em experimentos *in vivo*. De acordo com a Tabela 2, os valores de CEP₁ e CEP₂ indicam que a composição de aminoácidos do ISA foi favorável (>1,5). Esses indicadores refletem como os aminoácidos leucina, prolina e tirosina contribuem para o CEP teórico, sendo sensíveis a qualquer alteração no teor de leucina, um aminoácido essencial na síntese proteica. Valores superiores aos encontrados neste estudo foram relatados para CEP₁ e CEP₂ no isolado de proteína de quinoa (2,22 e 2,19) e isolado de proteína de álbum (2,23 e 2,21), respectivamente (Mir; Riar; Singh, 2019).

Tabela 2. Aminoácidos presentes no isolado de proteína de subprodutos folhosos de aspargos.

Aminoácidos	% ISA
Essencial	
Histidina (His)	2,57
Treonina (Tre)	5,00
Valina (Val)	5,46
Metionina (Met)	2,09
Lisina (Lis)	13,90
Isoleucina (Iso)	4,78
Leucina (Leu)	8,50
Fenilalanina (Fen)	6,83
Não essencial	
Arginina (Arg)	6,88
Ácido aspártico (Asp)	8,14
Serina (Ser)	4,26
Ácido glutâmico (Glu)	10,07
Glicina (Gli)	5,84
Alanina (Ala)	5,40
Prolina (Pro)	4,31
Cisteína (Cis)	0,35
Tirosina (Tir)	5,63
Parâmetros	
Aminoácidos totais (AT)	63,19
Aminoácidos essenciais totais (AETs)	49,13
Aminoácidos totais de cadeia ramificada (BCCAs)	18,74
Coeficiente de eficiência proteica (CEP ₁)	1,64
Coeficiente de eficiência proteica (CEP ₂)	1,60

. ISA = Isolado proteico de subprodutos folhosos de aspargos.

Limitações inerentes ao método podem ter contribuído para os valores de aminoácidos observados neste estudo. O kit AccQ.Fluor (Waters®) tem sido amplamente utilizado, mas depende das etapas de extração, hidrólise e derivatização. Os processos de hidrólise ácida podem causar degradação parcial em aminoácidos que contêm enxofre ou aminoácidos aromáticos, resultando na subestimação de suas concentrações (Tyler, 2000).

3.5. Digestão gastrointestinal *in vitro* e avaliação do potencial bioativo

O modelo de digestibilidade *in vitro* pepsina-pancreatina quantifica a digestão, permitindo a avaliação dinâmica do processo digestivo e a investigação da biodisponibilidade de nutrientes. Esse sistema tem sido amplamente utilizado como uma alternativa viável aos testes *in vivo*, devido ao seu custo reduzido e à superação de questões éticas devido ao uso de modelos animais (Sousa et al., 2020).

Taninos presentes de 0,5 à 5 % na dieta pode reduzir a digestibilidade das proteínas e a absorção de minerais, dependendo da matriz alimentar, enquanto que taninos > 5 % na dieta pode ter forte efeito antinutricional podendo causar deficiência de ferro e prejudicar a digestão (Singh; Arora, 2023). O teor de tanino no ISA foi significativamente maior em comparação com o SUF (Tabela 3). Esse aumento pode ser explicado pelas condições utilizadas no processo de extração, que favoreceram a dissociação parcial dos complexos proteína-polifenóis e liberaram taninos previamente ligados às proteínas.

Embora os taninos sejam amplamente reconhecidos como antinutrientes devido à sua capacidade de formar complexos com proteínas que podem dificultar a digestão enzimática (Popova; Mihaylova, 2019), no caso do ISA, não houve comprometimento da digestibilidade da proteína, uma vez que a digestibilidade *in vitro* do ISA foi significativamente maior do que a do SUF (Tabela 3).

Além disso, taninos condensados ou hidrolisáveis podem ser facilmente liberados durante a digestão, contribuindo para o aumento da detecção de polifenóis (Serena-Romero, et al., 2023). Em ISA, observou-se um aumento no teor de polifenóis após o processo de digestão (Fig. 3B), indicando que a digestão favoreceu a liberação desses compostos.

A digestibilidade é um parâmetro chave para avaliar a qualidade nutricional de isolados proteicos. Tomé (2013) relata a digestibilidade das proteínas vegetais variando de

70 a 90%. A alta digestibilidade observada no ISA sugere degradação proteica e liberação de peptídeos e aminoácidos, que podem ser absorvidos no duodeno distal e íleo (Gong et al., 2022).

O resultado obtido na digestão enzimática do ISA foi superior 64,7%, quando comparado com a digestibilidade de isolado proteico de folhas de *Moringa oleifera* (Benhammouche et al., 2021) e é comparável à digestibilidade dos suplementos proteicos comerciais: concentrado de proteína do leite (87,2%), clara de ovo em pó (81,5%), isolado de proteína de ervilha (90,0%) e isolado de proteína de soja (89,2%) (Corgneau et al., 2019). As variações nos valores de digestibilidade entre os diferentes estudos podem ser atribuídas as diferenças na composição geral da proteína, principalmente na qualidade da proteína, e às condições de processamento da amostra.

Tabela 3. Digestibilidade e teor de taninos em SUF e ISA.

	Taninos (mg EAT/100g)	Digestibilidade (%)
SUF	19,39 ± 1,44 ^b	71,29 ± 1,19 ^b
ISA	82,05 ± 0,00 ^a	86,18 ± 0,58 ^a

Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

SUF = subprodutos folhosos dos espargos. ISA = Isolado proteico de subprodutos folhosos de aspargos.

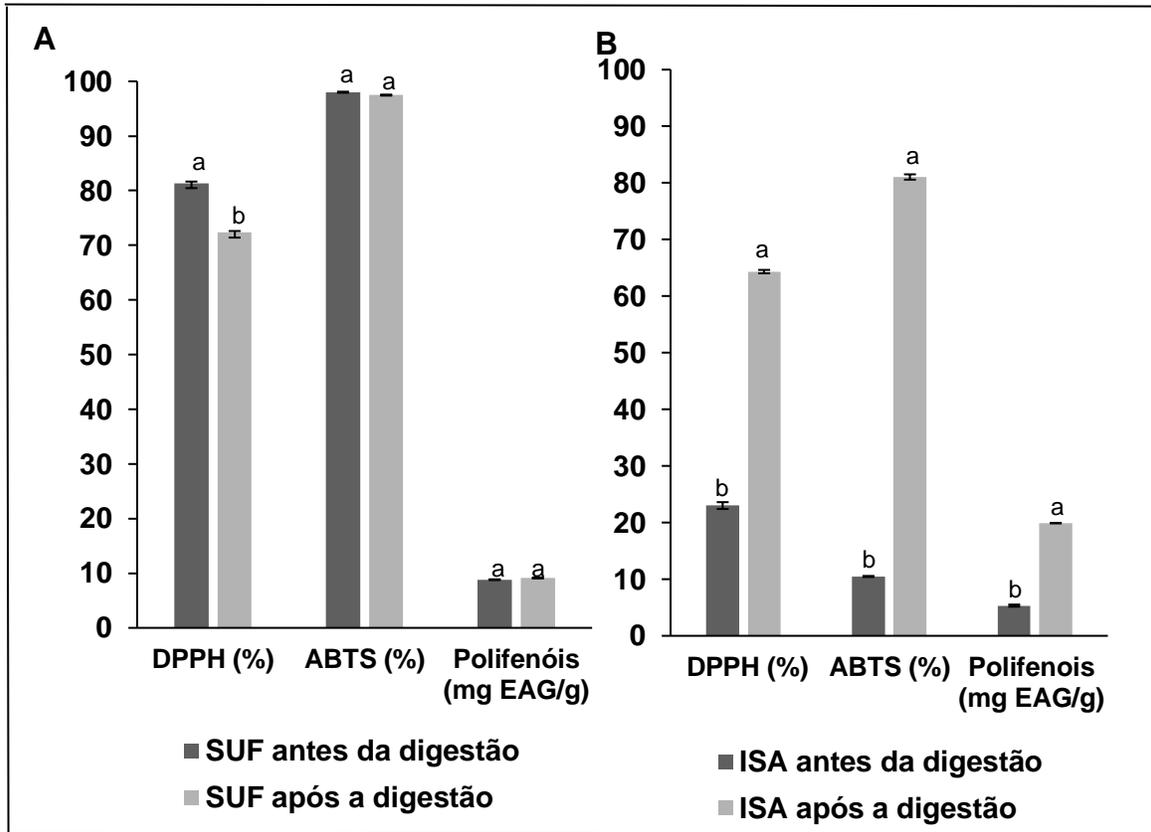


Figura 3. Efeito da digestão *in vitro* sobre a atividade antioxidante (DPPH e ABTS) (B) e o teor de polifenóis no SUF (A) e ISA (B).

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

SUF: subprodutos folhosos dos espargos, ISA: isolado proteico de subprodutos folhosos de aspargos, ABTS: 2,2 AZINO BIS (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), DPPH: 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil

A atividade antioxidante do ISA, avaliada antes e depois da digestão *in vitro*, aumentou significativamente de acordo com os ensaios ABTS e DPPH (Fig. 3B), enquanto a atividade antioxidante do SUF pelo ensaio DPPH diminuiu estatisticamente (Fig. 3A). A digestão enzimática de proteínas resulta em hidrólise de proteínas, liberando peptídeos e aminoácidos menores (Zhang et al., 2017). Esses compostos podem ter atividade antioxidante superior às proteínas intactas, devido à exposição de grupos funcionais com capacidade de neutralizar os radicais livres.

Além disso, a interação entre proteínas e compostos fenólicos pode influenciar a atividade antioxidante. A liberação de compostos fenólicos ligados à matriz proteica durante

a digestão pode contribuir para o aumento da capacidade antioxidante. Assim, a digestão enzimática do ISA, além de facilitar a digestão de peptídeos bioativos com potencial antioxidante, pode liberar compostos fenólicos associados (Fig. 3B), aumentando a capacidade antioxidante total, sugerindo que ISA, após a digestão, pode atuar como uma fonte eficaz de antioxidante, contribuindo para a neutralização dos radicais livres no organismo.

A digestão *in vitro* resultou em um aumento limitado de polifenóis totais em SUF (Fig. A), o que pode ser atribuído à menor liberação desses compostos durante o processo digestivo (Benhammouche et al., 2021). A digestão enzimática quebra as ligações covalentes que ligam os polifenóis às proteínas, liberando-as em sua forma livre, que é mais bioacessível e, conseqüentemente, facilita sua quantificação.

4. Conclusão

O isolado proteico obtido a partir de subprodutos folhosos de aspargos demonstrou ser uma alternativa viável e sustentável para aplicação na indústria alimentícia. Seu perfil de aminoácidos, com alta proporção de aminoácidos essenciais e boa digestibilidade, o posiciona como um ingrediente promissor para formulações proteicas de alta qualidade. Além disso, suas propriedades funcionais, como emulsificação e formação de espuma, ampliam seu potencial de aplicação em diferentes matrizes alimentares. A atividade antioxidante aumentada após a digestão sugere benefícios adicionais para a saúde, reforçando sua viabilidade como um ingrediente funcional. Esses resultados contribuem para a valorização de subprodutos agroindustriais, promovendo a economia circular e o desenvolvimento de soluções inovadoras para a produção sustentável de proteínas.

Fontes de financiamento

Este estudo foi apoiado pelo NAPI proteínas alternativas (processo: 198109614) e recebeu apoio financeiro da Fundação Araucária.

Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através da concessão de uma bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento de uma bolsa de pesquisa.

Referências

- Adebiyi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chemistry*, 128(4), 902-908.
- Almeida, C. C., Monteiro, M. L. G., da Costa-Lima, B. R. C., Alvares, T. S., & Conte-Junior, C. A. (2015). In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 7-11.
- Anoop, A. A., Pillai, P. K., Nickerson, M., & Ragavan, K. V. (2023). Plant leaf proteins for food applications: Opportunities and challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(1), 473-501.
- Atherton, P. J., Smith, K., Etheridge, T., Rankin, D., & Rennie, M. J. (2010). Distinct anabolic signalling responses to amino acids in C2C12 skeletal muscle cells. *Amino acids*, 38, 1533-1539.
- Benhammouche, T., Melo, A., Martins, Z., Faria, M. A., Pinho, S. C., Ferreira, I. M., & Zaidi, F. (2021). Nutritional quality of protein concentrates from *Moringa Oleifera* leaves and in vitro digestibility. *Food Chemistry*, 348, 128858.
- Blasco, L., Viñas, M., & Villa, T. G. (2011). Proteins influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast. *International Microbiology*, 2011, vol. 14, num. 2, p. 61-71.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Chitrakar, B., Zhang, M., & Adhikari, B. (2019). Asparagus (*Asparagus officinalis*): Processing effect on nutritional and phytochemical composition of spear and hard-stem byproducts. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 1-11.
- Corgneau, M., Gaiani, C., Petit, J., Nikolova, Y., Banon, S., Ritié-Pertusa, L., ... & Scher, J. (2019). Nutritional quality evaluation of commercial protein supplements. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2586-2594.
- dos Santos-Silva, A. C., Saraiva, B. R., Lazzari, A., Dos Santos, H., de Oliveira, É. L., Sato, F., ... & Matumoto-Pintro, P. T. (2024). Optimization and Characterization of Protein Extraction from Asparagus Leafy By-Products. *Foods*, 13(6), 894.
- Ducrocq, M., Boire, A., Anton, M., Micard, V., & Morel, M. H. (2020). Rubisco: A promising plant protein to enrich wheat-based food without impairing dough viscoelasticity and protein polymerisation. *Food Hydrocolloids*, 109, 106101.
- Famuwagun, A. A., Alashi, A. M., Gbadamosi, S. O., Taiwo, K. A., Oyedele, D. J., Adebooye, O. C., & Aluko, R. E. (2020). Comparative study of the structural and functional properties of protein isolates prepared from edible vegetable leaves. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 955-970.
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. biol. Chem*, 73(2), 627-650.
- Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., & Besbes, S. (2015). Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates. *Journal of Food Engineering*, 165, 179-188.
- Gong, X., Hui, X., Wu, G., Morton, J. D., Brennan, M. A., & Brennan, C. S. (2022). In vitro digestion characteristics of cereal protein concentrates as assessed using a pepsin-pancreatin digestion model. *Food research international*, 152, 110715.

- González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Silván, J. M., Mora-Escobedo, R., & Martínez-Villaluenga, C. (2018). Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. *Food chemistry*, *242*, 75-82.
- Gorissen, S. H., Crombag, J. J., Senden, J. M., Waterval, W. H., Bierau, J., Verdijk, L. B., & van Loon, L. J. (2018). Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino acids*, *50*, 1685-1695.
- Guo QingBin, G. Q., Wang NiFei, W. N., Liu HuanHuan, L. H., Li ZhenJing, L. Z., Lu LaiFeng, L. L., & Wang ChangLu, W. C. (2020). The bioactive compounds and biological functions of *Asparagus officinalis* L.-a review.
- Hulmi, J. J., Lockwood, C. M., & Stout, J. R. (2010). Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutrition & metabolism*, *7*, 1-11.
- Kaur, G., & Bhatia, S. (2022). Radish leaf protein concentrates: optimization of alkaline extraction for production and characterization of an alternative plant protein concentrate. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *16*(4), 3166-3181.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food chemistry*, *102*(4), 1317-1327.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, *227*(5259), 680-685.

- Lawal, O. S. (2004). Functionality of African locust bean (*Parkia biglobossa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chemistry*, 86(3), 345-355.
- Lee, J. W., Lee, J. H., Yu, I. H., Gorinstein, S., Bae, J. H., & Ku, Y. G. (2014). Bioactive compounds, antioxidant and binding activities and spear yield of *Asparagus officinalis* L. *Plant foods for human nutrition*, 69, 175-181.
- Li, W., Hydamaka, A., Lowry, L., & Beta, T. (2009). Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. *Open life sciences*, 4(4), 499-506.
- Mir, N. A., Riar, C. S., & Singh, S. (2019). Effect of pH and holding time on the characteristics of protein isolates from *Chenopodium* seeds and study of their amino acid profile and scoring. *Food Chemistry*, 272, 165-173.
- Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal feed science and technology*, 91(1-2), 3-20.
- Narayan, M. (2020). Revisiting the formation of a native disulfide bond: consequences for protein regeneration and beyond. *Molecules*, 25(22), 5337.
- Neinast, M., Murashige, D., & Arany, Z. (2019). Branched chain amino acids. *Annual review of physiology*, 81(1), 139-164.
- Ogunwolu, S. O., Henshaw, F. O., Mock, H. P., Santos, A., & Awonorin, S. O. (2009). Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut. *Food chemistry*, 115(3), 852-858.
- Pedroche, J., Yust, M. M., Lqari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., & Millán, F. (2004). *Brassica carinata* protein isolates: chemical composition, protein characterization and

- improvement of functional properties by protein hydrolysis. *Food chemistry*, 88(3), 337-346.
- Popova, A., & Mihaylova, D. (2019). Antinutrients in plant-based foods: A review. *The Open Biotechnology Journal*, 13(1).
- Raikos, V., Neacsu, M., Russell, W., & Duthie, G. (2014). Comparative study of the functional properties of lupin, green pea, fava bean, hemp, and buckwheat flours as affected by pH. *Food science & nutrition*, 2(6), 802-810.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Roger, R. A., & Rawdkuen, S. (2020). Properties of Moringa oleifera leaf protein from alkaline– acid extraction. *Food and Applied Bioscience Journal*, 8(1), 43-67.
- Santos, C. D. S., & Nascimento, F. E. L. (2019). Isolated branched-chain amino acid intake and muscle protein synthesis in humans: a biochemical review. *Einstein (Sao Paulo)*, 17(3), eRB4898.
- Saraiva, B. R., Anjo, F. A., Vital, A. C. P., & Matumoto-Pintro, P. T. (2021). Soluble protein isolate from brewing by-product (trub) using the Box-Behnken design. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(10), e15871.
- Serena-Romero, G., Iñot-Gutiérrez, A., Conde-Rivas, O., Lima-Silva, M. Y., Martínez, A. J., Guajardo-Flores, D., & Cruz-Huerta, E. (2023). Impact of In Vitro Digestion on the Digestibility, Amino Acid Release, and Antioxidant Activity of Amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) and Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) Proteins in Caco-2 and HepG2 Cells. *Antioxidants*, 12(12), 2075.

- Shahidi, F., & Peng, H. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*, 4, 11-68.
- Singh, J., & Arora, S. K. (2023). Antinutritional factors in plant based foods. *Int. J. Agric. Sci*, 191, 366-375.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sousa, R., Portmann, R., Dubois, S., Recio, I., & Egger, L. (2020). Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model. *Food Research International*, 130, 108996.
- Tang, Q., Roos, Y. H., & Miao, S. (2024). Structure, gelation mechanism of plant proteins versus dairy proteins and evolving modification strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 104464.
- Tomé, D. (2013). Digestibility issues of vegetable versus animal proteins: protein and amino acid requirements—functional aspects. *Food and nutrition bulletin*, 34(2), 272-274.
- Tyler, M. I. (2000). Amino acid analysis: an overview. *Amino acid analysis protocols*, 1-7.
- Wang, B., Jiang, Y., Liu, J., Zhang, W., Pan, S., & Mao, Y. (2014). Physicochemical and functional properties of tea protein. *International Journal of Food Properties*, 17(10), 2275-2283.
- Yu, X. Y., Zou, Y., Zheng, Q. W., Lu, F. X., Li, D. H., Guo, L. Q., & Lin, J. F. (2021). Physicochemical, functional and structural properties of the major protein fractions extracted from *Cordyceps militaris* fruit body. *Food Research International*, 142, 110211.
- Zatta Cassol, G., Rezende-de-Souza, J. H., Fogaça, F. H. D. S., Mellinger Silva, C., Pacheco, S., Rodríguez Pérez, J. L., ... & Savay-da-Silva, L. K. (2024). Influence of Delipidification

on Protein Concentrate Extracted from Fish By-Products: Technical Process, Nutritional Value, and Amino Acid Bioaccessibility. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 33(2), 111-126.

Zhang, Y., Zhou, F., Zhao, M., Ning, Z., Sun-Waterhouse, D., & Sun, B. (2017). Soy peptide aggregates formed during hydrolysis reduced protein extraction without decreasing their nutritional value. *Food & function*, 8(12), 4384-4395.