

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LARA CAMPOS BORIM

Digestão simulada *in vitro* e liberação de peptídeos bioativos de globulina total de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) da cultivar GB Cappuccino.

ALFENAS/MG

2026

LARA CAMPOS BORIM

Digestão simulada *in vitro* e liberação de peptídeos bioativos de globulina total de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) da cultivar GB Cappuccino.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Nutrição e Longevidade pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Nutrição e Longevidade.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Olga Luisa Tavano

ALFENAS/MG

2026

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Borim, Lara Campos.

Digestão simulada *in vitro* e liberação de peptídeos bioativos de globulina total de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) da cultivar GB Cappuccino / Lara Campos Borim. - Alfenas, MG, 2026.

86 f. : il. -

Orientador(a): Olga Luisa Tavano.

Dissertação (Mestrado em Nutrição e Longevidade) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2026.

Bibliografia.

1. Grão-de-bico. 2. Globulina. 3. Peptídeos bioativos. 4. Digestão simulada. 5. Atividade antioxidante. I. Tavano, Olga Luisa, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

LARA CAMPOS BORIM

DIGESTÃO SIMULADA *IN VITRO* E LIBERAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE GLOBULINA TOTAL DE GRÃO-DE-BICO (*CICER ARIETINUM L.*) DA CULTIVAR GB CAPPUCCINO

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Nutrição e Longevidade pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Nutrição e Longevidade.

Aprovada em: 20 de fevereiro de 2026.

Profa. Dra. Olga Luisa Tavano

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Alice Helena de Souza Paulino

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Tássia Batista Pessato

Instituição: Universidade da Califórnia em Los Angeles



Documento assinado eletronicamente por **Olga Luisa Tavano, Presidente**, em 10/03/2026, às 17:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifalmg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&i_d_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1727896** e o código CRC **97119A1A**. Folha de Aprovação 1727896 SEI 23087.001558/2026-42 / pg. 1

AGRADECIMENTOS

A minha família e aos meus amigos mais próximos, que sabem quem são, agradeço pela escuta atenta, pelas palavras de incentivo e pela presença constante. O apoio de vocês foi essencial para que eu seguisse adiante com coragem e serenidade. À Lorena, que esteve presente durante todo o processo de desenvolvimento desta dissertação, pelo cuidado, pela compreensão e pela parceria contínua, fundamentais para a realização deste trabalho. À minha avó, de maneira especial, por sempre ter sido meu alicerce, fonte de força, ensinamentos e incentivo, contribuindo de forma decisiva para minha formação pessoal e acadêmica.

Ao grupo de pesquisa ProtHea, pelas contribuições científicas, pelas trocas de conhecimento, pelas discussões construtivas e pelo ambiente de aprendizado que favoreceram o desenvolvimento deste estudo.

Ao senhor Osmar Artiaga sócio proprietário da AgroGarbanzo Produção Agrícola LTDA. por ceder generosamente as amostras de grão-de-bico utilizadas neste trabalho e possibilitar a pesquisa científica nesta área.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Olga Luisa Tavano, expresso minha mais profunda gratidão pela orientação dedicada, pelos ensinamentos generosos, pela paciência e pelas contribuições valiosas ao longo de todo o processo de construção deste trabalho. Seu olhar atento, crítico e, ao mesmo tempo, sensível foi fundamental não apenas para o desenvolvimento desta pesquisa, mas também para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Espero, sinceramente, poder refletir, ainda que em parte, a profissional inspiradora e admirável que você representa.

Por fim, manifesto meu reconhecimento à educação pública brasileira, que me acolheu desde a infância e se constituiu como base fundamental de minha trajetória acadêmica e de cada conquista alcançada. Às bolsas de Iniciação Científica do CNPq e à bolsa de mestrado da CAPES, deixo meu sincero agradecimento, pois sem esses investimentos este percurso não teria sido possível. Esta dissertação representa um retorno simbólico à sociedade por todo o apoio recebido e reafirma a importância de um projeto educacional comprometido com a transformação social e a equidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001; da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (APQ-01240-21 / APQ-02644-23); e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq/MCTI (421595/2023-0).

Não te apresses em chegar ao fim. O caminho da descoberta é feito de frestas e sombras, e é nelas que o saber se esconde. Se a resposta for o sol, a pergunta é o horizonte: quanto mais caminhamos em sua direção, mais ele nos ensina a grandeza do espaço que ainda nos resta percorrer.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

As proteínas de leguminosas têm despertado crescente interesse devido ao seu potencial para a liberação de peptídeos bioativos durante a digestão humana. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial de liberação de peptídeos bioativos a partir da fração globulina extraída do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) da cultivar GB Cappuccino, por meio de digestão gastrointestinal simulada *in vitro*, bem como avaliar suas bioatividades e a influência das faixas de peso molecular e dos compostos fenólicos. Para isso, os grãos foram submetidos a três tratamentos distintos para obtenção das farinhas: grão integral, grão descascado e grão descascado submetido à extração de compostos fenólicos com acetona 70%. A partir dessas farinhas, a fração globulina foi isolada, quantificada e caracterizada, sendo comparadas globulinas extraídas na presença e ausência de compostos fenólicos. Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão simulada, e os hidrolisados obtidos foram fracionados de acordo com o peso molecular dos peptídeos. As bioatividades avaliadas incluíram o potencial inibitório sobre a α -glicosidase, a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e a atividade antioxidante, determinada pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP. Os resultados demonstraram que a fração globulina constitui a principal fração proteica do grão-de-bico GB Cappuccino e apresenta elevada suscetibilidade à hidrólise enzimática, favorecendo a liberação de peptídeos de diferentes faixas de peso molecular. A presença ou ausência de compostos fenólicos não promoveu alterações significativas no perfil estrutural das globulinas. Os hidrolisados apresentaram potencial não inibitório sobre a α -glicosidase, porém relevante atividade antioxidante e consistente capacidade de inibição da ECA, com valores de IC_{50} semelhantes entre os diferentes grupos avaliados, indicando preservação da bioatividade independentemente do tratamento da farinha. Entretanto, as variações observadas no comportamento dose-resposta sugerem a necessidade de estudos adicionais para elucidar os mecanismos envolvidos, especialmente quanto à interação entre peptídeos e compostos fenólicos. De forma geral, os resultados indicam que as globulinas do grão-de-bico GB Cappuccino representam uma fonte promissora de peptídeos bioativos, com potencial aplicação no desenvolvimento de ingredientes funcionais e nutracêuticos.

Palavras-chave: grão-de-bico; globulina; peptídeos bioativos; digestão simulada; atividade antioxidante.

ABSTRACT

Legume proteins have attracted increasing interest due to their potential to release bioactive peptides during human digestion. In this context, this study aimed to investigate the potential release of bioactive peptides from the globulin fraction extracted from chickpea (*Cicer arietinum* L.) grains of the GB Cappuccino cultivar through *in vitro* simulated gastrointestinal digestion, as well as to evaluate their bioactivities and the influence of peptide molecular weight ranges and phenolic compounds. Initially, the globulin fraction was quantified and characterized, and globulins extracted in the presence and absence of phenolic compounds were compared. Subsequently, the samples were subjected to simulated digestion, and the resulting hydrolysates were fractionated according to peptide molecular weight. The evaluated bioactivities included inhibitory potential against α -glucosidase, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition, and antioxidant activity, determined by the ABTS, DPPH, and FRAP assays. The results showed that the globulin fraction is the main protein fraction of GB Cappuccino chickpea grains and exhibits high susceptibility to enzymatic hydrolysis, favoring the release of peptides with different molecular weight ranges. The presence or absence of phenolic compounds did not significantly affect the structural profile of the globulins. The hydrolysates did not exhibit inhibitory potential against α -glucosidase; however, they showed relevant antioxidant activity and consistent ACE inhibitory capacity, with similar IC_{50} values among the evaluated groups, indicating preservation of bioactivity regardless of flour treatment. Nevertheless, variations observed in dose–response behavior suggest the need for further studies to elucidate the mechanisms involved, particularly regarding interactions between peptides and phenolic compounds. Overall, the findings indicate that globulins from GB Cappuccino chickpea grains represent a promising source of bioactive peptides, with potential application in the development of functional foods and nutraceutical ingredients.

Keywords: chickpea; globulin; bioactive peptides; simulated digestion; antioxidant activity.

SUMÁRIO

| | | |
|----------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 14 |
| 2.1 | GRÃO-DE-BICO..... | 14 |
| 2.2 | PROTEÍNAS DE GRÃO-DE-BICO..... | 15 |
| 2.3 | CARACTERÍSTICAS DAS GLOBULINAS..... | 16 |
| 2.4 | PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE GRÃO-DE-BICO..... | 18 |
| 2.5 | HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E DIGESTÃO..... | 19 |
| 2.6 | FENÓLICOS E SUAS INFLUÊNCIAS NAS BIOATIVIDADES..... | 20 |
| 2.6.1 | Estresse oxidativo, compostos fenólicos e avaliação antioxidante..... | 20 |
| 2.6.2 | Peptídeos bioativos vs. compostos fenólicos..... | 23 |
| 2.7 | PROTEÍNAS E LONGEVIDADE HUMANA..... | 23 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 24 |
| 3.1 | Objetivo Geral..... | 24 |
| 3.2 | Objetivos Específicos..... | 25 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 25 |
| 4.1 | MATERIAL..... | 25 |
| 4.2 | MÉTODOS..... | 25 |
| 4.2.1 | Preparo das farinhas..... | 27 |
| 4.2.2 | Isolamento da fração globulina..... | 28 |
| 4.2.3 | Determinação de proteínas..... | 28 |
| 4.2.4 | Determinação de aminoácidos..... | 28 |
| 4.2.5 | Perfil de proteínas por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE)..... | 23 |
| 4.2.6 | Digestão proteica simulada <i>in vitro</i>..... | 29 |
| 4.2.7 | Determinação de alfa-amino grupos livres..... | 30 |
| 4.2.8 | Fracionamento do hidrolisado por faixa de peso molecular.... | 31 |
| 4.2.9 | Determinação de bioatividades <i>in vitro</i>..... | 31 |
| 4.2.9.1 | Inibição de alfa-glucosidade (amiloglucosidade)..... | 31 |
| 4.2.9.2 | Inibição da enzima conversora de angiotensina..... | 31 |

| | | |
|---------|-----------------------------|----|
| 4.2.9.3 | Atividade antioxidante..... | 32 |
| 4.2.10 | Análise estatística..... | 32 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 33 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 74 |
| | REFERÊNCIAS..... | 76 |

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda do mercado por proteínas alternativas as fontes de origem animal estão incentivando o aumento do uso de proteínas de grão-de-bico devido às suas altas propriedades funcionais (características tecnológicas e físico-químicas), perfil de sabor neutro e relativa ausência de toxinas e alérgenos (comparado com outras leguminosas) (Mokni Ghribi *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2008). O domínio das proteínas vegetais alternativas continua a se expandir, com as proteínas de leguminosas ganhando destaque mais por necessidade do que por escolha, devido aos seus benefícios nutricionais, hipoalergenicidade, rótulos de “sem glúten” e “não transgênicos”, acessibilidade, alta produtividade e versatilidade (Boukid *et al.*, 2019; Nosworthy; House, 2017). As proteínas de leguminosas também apresentam uma ampla gama de aplicações tecnológicas e biofuncionais, oferecendo numerosos benefícios à saúde (Boukid *et al.*, 2019; Glusac; Isaschar-Ovdat; Fishman, 2020; Sharif *et al.*, 2018).

O grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*) é a terceira leguminosa mais cultivada no mundo, com uma produção global de 15 milhões de toneladas, atrás apenas do feijão seco (27 milhões de toneladas) e da ervilha seca (16 milhões de toneladas) (FAO, 2020). Esta leguminosa é um alimento básico em diversas partes do mundo, especialmente em países africanos e asiáticos (Sofi *et al.*, 2020). Existem dois principais tipos de grão-de-bico, kabuli e desi, que diferem em composição química, cor, tamanho e distribuição geográfica (Boukid *et al.*, 2019). O grão-de-bico possui de 18 a 29% de proteína, 4 a 7% de lipídios e 50 a 60% de amido (Espinosa-Ramírez; Serna-Saldívar, 2019; Sofi *et al.*, 2020). Embora contenha fatores antinutricionais, técnicas de pré-tratamento e extração de proteínas podem reduzir ou eliminar esses componentes (Boukid, 2021).

A proteína do grão-de-bico destaca-se por seu alto volume de produção, baixo custo, excelente equilíbrio de aminoácidos essenciais, alta biodisponibilidade e baixa alergenicidade em comparação à soja (Wang; Chelikani; Serventi, 2018; Wang *et al.*, 2020; Xing *et al.*, 2020). Diversos estudos relatam atividades biológicas das proteínas de grão-de-bico, incluindo atividade antioxidante, antifúngica, antigênica e capacidade quelante de metais (Ghribi *et al.*, 2015; Kou *et al.*, 2013). Assim, a proteína de grão-de-bico é um ingrediente

promissor e benéfico para a saúde, adequado para o desenvolvimento de novos produtos (Glusac; Isaschar-Ovdat; Fishman, 2020; Xing *et al.*, 2020).

As proteínas do grão-de-bico são compostas principalmente por globulinas (~56 g/100 g de proteínas totais), albuminas (~12 g/100 g), glutelinas (~18 g/100 g), prolaminas (~3 g/100 g) e um pequeno percentual de proteínas insolúveis (Boukid, 2021). As globulinas, as principais proteínas de armazenamento do grão-de-bico, consistem em dois grupos principais: as proteínas tipo legumina, ou tipo 11S, e tipo vicilina, ou tipo 7S (Yust *et al.*, 2003).

A proteína do grão-de-bico é rica em aminoácidos essenciais, como lisina, isoleucina, triptofano e aminoácidos aromáticos totais (Alajaji; El-Adawy, 2006). Dentre os aminoácidos presentes, destacam-se a leucina (8,7 g/100 g de proteína), a arginina (8,3 g/100 g de proteína) e a lisina (7,2 g/100 g de proteína) (Lqbal *et al.*, 2006). No entanto, os principais aminoácidos limitantes são os sulfurados (metionina e cistina), seguidos da valina e treonina (Alajaji; El-Adawy, 2006). O computo químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade da proteína dos isolados de grão-de-bico (0,92) e concentrados (0,76) é maior do que a de proteínas de ervilha (0,73) e feijão comum (0,63-0,68), mas ligeiramente inferior aos isolados de proteína de soja (1,0) (Espinosa-Ramírez; Serna-Saldívar, 2019; Nosworthy; House, 2017; Pereira; Tavano, 2014). Isso confirma o elevado valor nutricional das proteínas de grão-de-bico e sua capacidade de competir com as proteínas mais comercializadas, como soja e ervilha (Boukid, 2021).

Proteínas, hidrolisados e peptídeos do grão-de-bico têm demonstrado ser uma fonte notável de peptídeos bioativos com atividades antioxidantes, hipolipidêmicas e hipocolesterolêmicas (Del Mar Yust *et al.*, 2012; Gupta; Bhagyawant, 2019; Shi *et al.*, 2019; Torres-Fuentes *et al.*, 2015). Esses peptídeos apresentam importantes atividades antioxidantes, baseadas em eliminação de radicais livres e habilidades quelantes de metais, além de potenciais anti-inflamatórios, efeitos antiproliferativos, atividades antibacterianas e inibidoras da enzima conversora de angiotensina (Boschin *et al.*, 2014; Ghribi *et al.*, 2015; Jamdar; Deshpande; Marathe, 2017).

Peptídeos derivados de leguminosas têm demonstrado atividade quelante de cobre e propriedades antioxidantes com potencial para inibir a peroxidação lipídica mediada por cobre (Torres-Fuentes *et al.*, 2015; Torres-Fuentes; Alaiz;

Vioque, 2011, 2012). Esses estudos indicam o grande potencial dos hidrolisados de proteína de grão-de-bico como ingredientes bioativos, abrindo novas oportunidades para o desenvolvimento de nutracêuticos e alimentos funcionais (Del Mar Yust *et al.*, 2012; Torres-Fuentes *et al.*, 2015).

Além das propriedades antioxidantes, peptídeos derivados de leguminosas têm demonstrado relevante potencial anti-hipertensivo por meio da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), reduzindo a formação de angiotensina II e contribuindo para a modulação da pressão arterial. Estudos recentes destacam que hidrolisados proteicos de leguminosas constituem fontes promissoras de peptídeos com atividade inibitória da ECA, reforçando seu potencial aplicação como ingredientes funcionais e nutracêuticos voltados à prevenção e ao manejo da hipertensão arterial (Tawalbeh *et al.*, 2023).

O processo digestivo *in vivo* não apenas contribui para a biodisponibilidade de nutrientes, mas também representa um mecanismo fundamental para a geração de compostos bioativos *in vitro* com potenciais aplicações nutracêuticas. A liberação de peptídeos bioativos ocorre, em grande parte, por meio da hidrólise enzimática das proteínas durante o processo de digestão gastrointestinal. Nesse contexto, enzimas como pepsina, tripsina e quimotripsina atuam sequencialmente na clivagem das cadeias polipeptídicas, promovendo a liberação de fragmentos peptídicos com potenciais efeitos fisiológicos (Chakrabarti; Guha; Majumder, 2018). Essa liberação pode ocorrer *in vivo*, ao longo do trato digestivo, ou *in vitro*, em condições simuladas de digestão, permitindo o estudo da digestibilidade e bioatividade desses peptídeos (Bohn *et al.*, 2018).

Vários estudos científicos têm apontado para as propriedades bioativas distintas encontradas em hidrolisados proteicos e peptídeos derivados de leguminosas, cujas características têm sido associadas a fatores que influenciam a longevidade. Este estudo em particular direciona seu foco para uma nova variedade de grão-de-bico, denominada GB Cappuccino, caracterizada por sua coloração marrom. Registrada em 18 de janeiro de 2023, no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) este novo cultivar pode apresentar composição diferenciada e potencial significativo para introdução no mercado nacional.

Grãos de coloração marrom ou mais escura em seu tegumento costumam apresentar propriedade bioativas associadas aos seus componentes fenólicos,

em comparação aos grãos de tegumento de coloração amarelada ou creme (Diniz *et al.*, 2023). As alterações físico-químicas causadas por compostos fenólicos podem determinar propriedades biológicas importantes, incluindo a digestibilidade e utilização de proteínas alimentares, bem como a atividade de enzimas digestivas (Seczyk *et al.*, 2019). Desta forma se faz necessário investigar as origens das bioatividades e se outros componentes do grão também se diferenciam como potenciais promotores da saúde em comparação aos grãos de coloração creme, visto que estes são importantes objetos de pesquisa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GRÃO-DE-BICO

O grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*) é amplamente reconhecido como uma fonte de proteína de alta qualidade e possui um perfil nutricional significativo para a nutrição humana (Pande *et al.*, 2005). Segundo o autor, sua diversidade inclui principalmente duas variedades distintas: "Desi" e "Kabuli". A predominância do tipo "Desi" cobre aproximadamente 80-85% da área total dedicada a essa leguminosa, com os principais países produtores situados na África e Ásia. Por outro lado, a variedade "Kabuli" é preponderante em regiões como Europa, Norte da África, Ásia Ocidental e América do Norte, representando uma parcela menor, porém significativa, da produção global (Pande *et al.*, 2005).

Dentre as diferenças entre os genótipos (desi e kabuli) as análises do perfil fenólico identificaram a presença de ácidos hidroxibenzóicos, flavan-3-óis, ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides, com destaque para compostos como ácido gálico, miricetina, quercetina, catequina e isorhamnetina (Quintero-Soto *et al.*, 2018). Esses estudos confirmaram que a atividade antioxidante está fortemente associada ao teor de fenólicos totais e flavonoides. Além disso, pesquisas comparativas entre os genótipos Desi e Kabuli revelaram que as variedades Desi possuem concentrações significativamente maiores de fenólicos e flavonoides, resultando em maior atividade antioxidante (Diniz *et al.*, 2023; Heiras-Palazuelos *et al.*, 2013; Quintero-Soto *et al.*, 2018; Segev *et al.*, 2010). Essa superioridade foi corroborada por Jameel *et al.* (2021), que

destacaram o potencial dos grãos Desi como fontes naturais de antioxidantes, com possíveis benefícios para reforço do sistema imunológico, auxílio no controle da diabetes, redução de processos inflamatórios (Jameel; Hameed; Shah, 2021).

Conforme atestado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o grão-de-bico apresenta uma elevada concentração de polissacarídeos não amiláceos e uma baixa densidade calórica. Lentilhas, feijões e grão-de-bico são reconhecidos como fontes significativas de minerais, vitaminas e fibras, sendo recomendados como componentes essenciais de uma dieta saudável para todas as faixas etárias. Destaca-se que o grão-de-bico possui um valor nutricional substancial e potencial para ser empregado como um alimento funcional no tratamento de diversas condições patológicas (Kerem *et al.*, 2007).

Na análise de sua composição, apresenta predominantemente amido como principal carboidrato, variando entre 41% a 50% (Hirdyani, 2014). Quanto à proteína bruta, esta varia entre 12,4% a 31,5%. Lipídios são encontrados em proporções menores, aproximadamente 6%, principalmente compostos por ácidos graxos insaturados como os ácidos linoleico e oleico. Além disso, o grão-de-bico é uma fonte de vitaminas do complexo B, incluindo riboflavina, niacina, tiamina e folato, além de conter vitamina A e seu precursor β -caroteno. Sua composição também engloba fitoesteróis, como o β -sitosterol, campesterol e stigmasterol, e micronutrientes como cálcio, magnésio, fósforo e potássio (Hirdyani, 2014).

O grão-de-bico se distingue entre as demais leguminosas devido ao seu teor proteico e de aminoácidos. A proteína presente no grão tem sido reconhecida como possuidora de maior valor nutricional em comparação com as proteínas de outras leguminosas (Jukanti *et al.*, 2012).

2.2 PROTEÍNAS DE GRÃO-DE-BICO

Após os cereais, as leguminosas são reconhecidas como um grupo alimentar de significativa importância, mundialmente consideradas uma alternativa viável à carne, devido à sua acessibilidade econômica e sustentabilidade ambiental. O grão-de-bico, em particular, destaca-se por conter proteínas de alta qualidade, caracterizadas por uma maior biodisponibilidade

nutricional (Kaur *et al.*, 2019).

Albuminas e globulinas representam as principais classes de proteínas encontradas nas leguminosas. As proteínas do grão são compostas principalmente de globulinas (cerca de 48%). Essas proteínas podem ser classificadas de diferentes formas como por exemplo por sua solubilidade (Tavano; Neves, 2008). Outras proteínas presentes, como prolaminas e glutelinas, são encontradas em proporções menores. As prolaminas são caracterizadas por um alto conteúdo de glutamina e prolina, sendo solúveis em álcool. Por sua vez, as glutelinas apresentam maiores concentrações de cisteína e metionina, dois aminoácidos de importância significativa para a saúde humana. Além disso, as glutelinas são solúveis em meio redutor, incluindo soluções salinas, básicas, ácidas e detergentes (Rachwa-Rosiak; Nebesny; Budryn, 2015).

Na avaliação das seis variedades de grão-de-bico, analisou-se que o teor proteico dessas variedades varia entre 20,9% e 25,27%. Dentre essas variedades, os teores de albumina, globulina, glutelina e prolamina foram, respectivamente, de 8,39% a 12,31%, 53,44% a 60,29%, 3,12% a 6,89%, e 19,38% a 24,40% (Dhawan *et al.*, 1991). As distintas solubilidades que definem essas frações são considerações cruciais na seleção de fontes proteicas para aplicações na indústria alimentícia. Por exemplo, a solubilidade em meio aquoso, uma característica proeminente das albuminas, é particularmente relevante no processo de extração de proteínas para a produção de bebidas à base de vegetais (Yust *et al.*, 2010).

2.3 CARACTERÍSTICAS DAS GLOBULINAS

As principais proteínas do grão-de-bico são a globulina e a albumina, representando 62,16% e 19,76% do total de proteínas, respectivamente (Kaur; Prasad, 2021). As globulinas vegetais podem ser classificadas em tipo vicilina (7S), tipo convicilina (15S) e tipo legumina (11S) (Tavano; Neves, 2008).

A globulina apresenta maior estabilidade durante o armazenamento prolongado em comparação com a albumina, possivelmente devido à ausência de açúcares covalentemente ligados, que na albumina atraem e retêm água, aumentando seu teor de umidade (Osemwota; Alashi; Aluko, 2022). Além disso, a globulina possui um teor de proteína bruta significativamente maior (92,62%)

em relação à albumina (64,38%), padrão também observado em farinhas de feijão e lentilha (Mundi; Aluko, 2013; Osemwota; Alashi; Aluko, 2022). O menor teor proteico da albumina pode estar associado à sua maior concentração de carboidratos, especialmente glicoproteínas (Nwachukwu; Aluko, 2018).

De acordo com Ye *et al.* (2024) a composição de aminoácidos da globulina difere daquela relatada por Paredes-López; (1991), com menor conteúdo de aminoácidos sulfurados. No entanto, seu teor de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) é semelhante ao dos isolados proteicos de grão-de-bico Paredes-López; (1991). A globulina também apresenta maior proporção de aminoácidos hidrofóbicos, essenciais para a estrutura e função das membranas celulares (Naghdi *et al.*, 2023), além de elevados níveis de aminoácidos não essenciais, como ácido glutâmico, ácido aspártico e prolina, que podem ser metabolizados em glicose, tornando-a uma fonte valiosa de energia (Nateghpour *et al.*, 2021).

As globulinas exibem baixa solubilidade em pH entre 3,0 e 9,0, comportamento semelhante ao observado em proteínas de inhame (Van Wyk; Amonsou, 2021) e ervilha (Adebiyi; Aluko, 2011). Essa característica está relacionada ao seu alto teor de aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos. Em condições neutras, sua solubilidade (40,2%) é comparável à do isolado proteico de soja (40,8%), indicando seu potencial para aplicações na indústria alimentícia (Hu *et al.*, 2010).

A hidrofobicidade da superfície proteica é crucial para interações moleculares e dobramento proteico, influenciando diretamente suas funções (Chanphai; Bekale; Tajmir-Riahi, 2015). A maioria das proteínas globulares possui cadeias laterais hidrofóbicas internas, limitando sua funcionalidade superficial (Tang *et al.*, 2021). Modificações estruturais podem expor resíduos hidrofóbicos, melhorando suas propriedades (Tang *et al.*, 2021).

As globulinas dessa leguminosa podem ser subdivididas em tipo legumina (11S) e tipo vicilina (7S) (Shevkani *et al.*, 2019). Estudos indicam que a funcionalidade dessas proteínas é influenciada por sua composição e conformação (Cui *et al.*, 2020; Kiosseoglou; Paraskevopoulou, 2011; Ladjal-Ettoumi *et al.*, 2016; Lam *et al.*, 2018).

As globulinas do grão-de-bico destacam-se por sua estabilidade, alto teor proteico e perfil de aminoácidos favorável, além de propriedades funcionais

promissoras para aplicações alimentícias, similares às da proteína de soja. Sua estrutura e hidrofobicidade desempenham um papel fundamental em suas interações e funcionalidade, tornando-as alvo de pesquisas para otimização tecnológica.

2.4 PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO GRÃO-DE-BICO

Os peptídeos bioativos são sequências peptídicas, geralmente compostas por 2 a 20 resíduos de aminoácidos, derivadas de proteínas maiores, que exibem propriedades bioativas notáveis, caracterizadas por efeitos benéficos sobre sistemas biológicos específicos (Ulug; Jahandideh; Wu, 2021).

Numerosos peptídeos bioativos demonstram uma capacidade multifuncional, apresentando uma gama diversificada de mecanismos de ação, o que resulta na manifestação de múltiplas atividades fisiológicas. Os peptídeos bioativos oriundos de fontes alimentares emergem como candidatos promissores na concepção de produtos alimentícios funcionais e/ou nutracêuticos destinados à mitigação e gestão de patologias crônicas. Várias investigações documentam a síntese e descrição de peptídeos bioativos dotados de propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, anti-obesidade, antimicrobianas e imunomoduladoras (Chakrabarti; Guha; Majumder, 2018; Erdmann; Cheung; Schröder, 2008; Udenigwe; Aluko, 2012).

Entre os diferentes peptídeos bioativos descritos na literatura, destacam-se aqueles provenientes de leguminosas com atividade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina (ECA), amplamente investigados devido ao seu potencial anti-hipertensivo (Tawalbeh *et al.*, 2023). Proteínas de leguminosas, como globulinas e albuminas, quando submetidas à hidrólise enzimática ou à digestão gastrointestinal, podem liberar sequências peptídicas capazes de interagir com o sítio ativo da ECA, inibindo a conversão da angiotensina I em angiotensina II, um potente vasoconstritor, além de reduzir a degradação da bradicinina, favorecendo efeitos vasodilatadores. A atividade inibitória desses peptídeos está frequentemente relacionada à sua estrutura primária, especialmente à presença de aminoácidos hidrofóbicos, aromáticos ou com carga positiva na região C-terminal, que aumentam sua afinidade pela enzima. Considerando que a hipertensão arterial é uma das doenças crônicas não

transmissíveis mais prevalentes no mundo, a identificação de peptídeos derivados de proteínas de leguminosas com potencial inibitório sobre a ECA apresenta elevada relevância científica e nutracêutica, configurando-se como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de alimentos funcionais voltados à prevenção e ao manejo dessa condição (Korhonen; Pihlanto, 2006; Udenigwe; Aluko, 2012; Chakrabarti; Guha; Majumder, 2018; Ulug; Jahandideh; Wu, 2021).

Desta forma, nos últimos anos, observa-se um aumento significativo do interesse científico na identificação de sequências peptídicas bioativas específicas, com potencial para mitigar ou prevenir o surgimento de doenças crônicas (Korhonen; Pihlanto, 2006). Segundo os autores, peptídeos bioativos provenientes de proteínas alimentares podem ser gerados por meio de diversos processos, incluindo a hidrólise enzimática empregando enzimas proteolíticas derivadas de fontes vegetais ou microbianas, a hidrólise realizada por enzimas digestivas simuladas em condições gastrointestinais, ou por meio da fermentação utilizando culturas iniciadoras apropriadas. Além disso, alguns estudos têm explorado abordagens combinadas desses métodos para a produção de peptídeos com atividade biológica.

2.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E DIGESTÃO

A hidrólise enzimática representa o método predominante para a geração de peptídeos bioativos, caracterizando-se por suas vantagens, tais como a utilização de condições de produção moderadamente controladas e isentas de solventes orgânicos e compostos químicos nocivos. Diversas enzimas provenientes de animais (tripsina, pepsina, quimotripsina, prostasina, gastricsina, elastase 1, elastase de neutrófilos, entre outras), vegetais (papaína, ficina, bromelaína, etc.) e microrganismos (Alcalase, Neutrase, Everlase, Protamex, Flavourzyme, Quimosina, etc.) têm sido empregadas com sucesso na hidrólise de proteínas (Lorenzo *et al.*, 2018).

As substâncias ingeridas oralmente passam por um processo de metabolização que envolve diversas enzimas digestivas, iniciando na cavidade oral, prosseguindo para o estômago e, por fim, ocorrendo nos intestinos delgado e grosso. No organismo humano, diversas enzimas proteolíticas participam

desse processo, exercendo influência significativa na modificação irreversível do perfil peptídico desses produtos. De fato, muitas formulações de peptídeos bioativos são inicialmente desenvolvidas por meio de uma simulação do ambiente digestivo presente no trato gastrointestinal, onde o tratamento com proteases resulta na geração de peptídeos "ativos", os quais são liberados da estrutura da proteína nativa (Chakrabarti; Guha; Majumder, 2018).

A digestão gastrointestinal constitui um processo multifacetado, caracterizado por reações físico-químicas, que visa à desintegração dos alimentos mediante a ação de diferentes enzimas, resultando na liberação de nutrientes passíveis de absorção e utilização pelo organismo. No caso das proteínas suscetíveis à digestão, estas sofrem hidrólise, culminando na formação de uma ampla gama de peptídeos e aminoácidos. A compreensão detalhada do processo de digestão proteica é de suma importância, uma vez que exerce influência direta sobre o valor nutricional dos alimentos, além do fato de que os produtos resultantes da degradação proteica podem possuir relevância fisiológica. Nesse contexto, os protocolos de digestão *in vitro* surgem como ferramentas valiosas para a predição da digestibilidade das proteínas, bem como para a avaliação das alterações estruturais que estas sofrem em condições simuladas de fisiologia gastrointestinal (Bohn *et al.*, 2018).

A digestibilidade é comumente empregada como uma métrica na avaliação da eficiência da proteólise e na disponibilidade das proteínas. Destarte, as proteínas com alta digestibilidade são consideradas mais propícias para a absorção humana, visto que apresentam uma maior quantidade de aminoácidos disponíveis para absorção, proporcionando, conseqüentemente, benefícios nutricionais ampliados (Santos-Hernández *et al.*, 2020).

As globulinas geralmente apresentam resistência a digestão, esta característica vem sendo considerada na sua forma nativa (*in natura*), ou seja, sem sofrer processamento térmico, como proteínas de baixa digestibilidade com resistência a digestão. Mas, embora no aspecto nutricional a resistência a digestão seja considerada uma característica negativa, resistir a digestão pode ser indicativo de um material com potencial liberação de peptídeos bioativos, a resistência a hidrólises posteriores à digestão podem garantir que estes peptídeos alcancem de forma íntegra seu local de ação (Ramani *et al.*, 2021).

2.6 FENÓLICOS E SUAS INFLUÊNCIAS NAS BIOATIVIDADES

Além das proteínas e peptídeos bioativos, os compostos fenólicos presentes no grão-de-bico vêm ganhando destaque por seus efeitos promotores da saúde humana. Dentre esses compostos, destacam-se flavonoides, taninos, estilbenos e ácidos fenólicos, sintetizados principalmente no cotilédone da semente e na casca, que exercem papel crucial na prevenção do estresse oxidativo e de doenças crônicas não transmissíveis (Heleno *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2014).

2.6.1 Estresse Oxidativo, Compostos Fenólicos e Avaliação Antioxidante

A produção de energia no organismo humano, essencial para manutenção da vida, ocorre por meio de diversas reações bioquímicas acopladas à geração de adenosina trifosfato (ATP), sendo a cadeia respiratória mitocondrial e o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) os principais processos envolvidos. Esses sistemas metabólicos, embora eficientes, também levam inevitavelmente à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – reactive oxygen species) e radicais livres como subprodutos (Phaniendra; Jestadi; Periyasamy, 2015). As ROS incluem moléculas como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet OH$), que, quando não adequadamente controladas, promovem a oxidação de biomoléculas celulares.

Apesar de serem tradicionalmente associadas ao dano celular, as ROS exercem funções fisiológicas importantes. Elas atuam na defesa imunológica contra patógenos, na sinalização celular e na modulação de processos como proliferação, diferenciação e morte celular programada (Sies, 2015; Zhang *et al.*, 2016). No contexto fisiológico, as ROS regulam vias como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K), além de controlarem a expressão de genes relacionados à inflamação, apoptose e resposta antioxidante (Hajam *et al.*, 2022).

No entanto, o excesso de ROS quando sua geração supera a capacidade do sistema antioxidante endógeno caracteriza uma condição conhecida como estresse oxidativo. Nessa situação, estruturas fundamentais como lipídeos de membrana, proteínas, mitocôndrias e o DNA tornam-se alvos de oxidação, o que

contribui para a fisiopatologia de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo aterosclerose, diabetes, alzheimer, parkinson e neoplasias (Schieber; Chandel, 2014; Simioni *et al.*, 2018).

Para neutralizar as ROS e manter a homeostase redox, o organismo dispõe de um complexo sistema antioxidante, que pode ser classificado em enzimático (incluindo superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não enzimático, composto por moléculas como ácido ascórbico, tocoferóis, polifenóis e peptídeos bioativos. Esses antioxidantes atuam por diferentes mecanismos, entre eles a doação de elétrons ou átomos de hidrogênio, a quelatação de metais de transição e a regeneração de outros antioxidantes (Sies, 2015; Simioni *et al.*, 2018).

Em estudos *in vitro*, diferentes ensaios têm sido empregados para avaliar a capacidade antioxidante de compostos naturais, sendo os métodos ABTS e FRAP amplamente utilizados. O ensaio ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) é baseado na formação de um radical catiônico estável (ABTS^{•+}), de coloração azul-esverdeada, obtido por reação com persulfato de potássio. A capacidade antioxidante é medida pela redução do ABTS^{•+} em presença dos antioxidantes da amostra, com consequente diminuição da absorbância em 734 nm. Trata-se de um método sensível e versátil, capaz de quantificar compostos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos, atuando principalmente por mecanismos de transferência de elétrons (ET), embora também envolva mecanismos de transferência de hidrogênio (HAT) (Apak *et al.*, 2016; Re *et al.*, 1999).

Por outro lado, o método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) quantifica a capacidade redutora de um antioxidante com base na redução do complexo férrico (Fe³⁺-TPTZ) a ferroso (Fe²⁺-TPTZ), gerando um complexo azul que absorve a 593 nm. O FRAP reflete exclusivamente a atividade antioxidante por mecanismo de transferência de elétrons, em condições de pH ácido (3,6), sendo, portanto, limitado à detecção de antioxidantes com potencial redutor significativo sob essas condições (Benzie; Strain, 1996; Huang; Boxin; Prior, 2005).

A principal distinção entre os métodos reside, portanto, no tipo de radical ou íon oxidante utilizado, no pH da reação e na amplitude dos mecanismos que são capazes de detectar. O ABTS é mais abrangente e sensível a uma variedade

maior de compostos, enquanto o FRAP fornece resultados mais específicos para compostos redutores em condições ácidas. Ambos, no entanto, apresentam limitações e, quando usados em conjunto, oferecem uma caracterização mais completa da atividade antioxidante de uma amostra (Miller; Rice-Evans, 1996; Prior; Wu; Schaich, 2005).

Além de peptídeos, tocoferóis e carotenoides, os fenólicos totais são componentes chave na atividade antioxidante do grão-de-bico (Hussein *et al.*, 2020). Estudos demonstram uma correlação direta entre a concentração de fenólicos e a capacidade antioxidante. Por exemplo, Hussein Hend *et al.* (2020) observaram que uma amostra contendo 3,44 mg de equivalentes de ácido gálico por grama apresentou 80,64% de inibição do radical DPPH, reforçando a relação entre fenólicos e atividade antioxidante. Essa associação também foi evidenciada em iogurtes suplementados com farinha de grão-de-bico, que apresentaram aumento significativo na capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP, atribuído principalmente aos flavonoides do grão (Fernandez-Orozco *et al.*, 2009; Trigueros; Wojdyło; Sendra, 2014).

2.6.2 Peptídeos bioativos vs. Compostos fenólicos.

Os estudos revisados demonstram que tanto os peptídeos bioativos quanto os compostos fenólicos do grão-de-bico exercem funções antioxidantes e moduladoras da saúde (Heiras-Palazuelos *et al.*, 2013; Quintero-Soto *et al.*, 2018; Segev *et al.*, 2010). No entanto, uma questão crucial permanece, qual desses componentes tem um papel mais determinante nas bioatividades observadas. Peptídeos bioativos são reconhecidos por sua ação específica em vias metabólicas, como inibição de enzimas pró-inflamatórias e modulação da pressão arterial (Chakrabarti; Guha; Majumder, 2018; Erdmann; Cheung; Schröder, 2008; Udenigwe; Aluko, 2012). Compostos fenólicos, por sua vez, destacam-se pela elevada capacidade antioxidante e proteção contra danos oxidativos, especialmente nas variedades desi (Sczek, 2019).

Estudos futuros que isolem e comparem a contribuição relativa de cada grupo podem esclarecer se os benefícios são predominantemente mediados por peptídeos bioativos ou se os fenólicos desempenham um papel mais decisivo. Essa investigação não apenas aprofundaria o entendimento científico, mas

também orientaria estratégias de melhoramento genético e aplicações nutracêuticas, potencializando o grão-de-bico como um alimento funcional.

2.7 PROTEÍNAS E LONGEVIDADE HUMANA

Nos últimos anos, a alimentação tem sido objeto de investigação não apenas como uma fonte de energia e nutrientes essenciais para o adequado desenvolvimento e funcionamento do organismo, mas também como uma fonte de compostos bioativos que potencialmente exercem efeitos positivos na saúde humana (Jakubczyk; Baraniak, 2014). As proteínas desempenham um papel crucial na dieta, uma vez que fornecem aminoácidos necessários para as funções orgânicas adequadas e podem servir como precursores de peptídeos bioativos. Estes peptídeos, resultantes do processamento dos alimentos ou liberados durante a digestão gastrointestinal, podem exibir atividade fisiológica (Vermeirssen; Camp; Verstraete, 2004).

Doenças como doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, câncer, entre outras, têm uma prevalência global significativa. Historicamente, o tratamento primário para essas condições tem sido farmacêutico, o que pode acarretar em toxicidade medicamentosa (Girgih *et al.*, 2014). Além disso, o uso prolongado de medicamentos está associado a efeitos colaterais adversos, contribuindo para uma deterioração da saúde e um aumento dos custos com cuidados médicos. Diante desse cenário, há uma crescente necessidade de abordagens preventivas por meio de escolhas de estilo de vida saudáveis e estratégias terapêuticas precoce. Nesse contexto, as fontes naturais de alimentos que contêm peptídeos bioativos podem desempenhar um papel significativo na prevenção de doenças, reduzindo assim os custos globais com saúde e diminuindo a dependência de tratamentos medicamentosos (Girgih *et al.*, 2014).

Os peptídeos bioativos têm demonstrado influenciar positivamente diversos sistemas do corpo humano, incluindo o sistema imunológico, cardiovascular, gastrointestinal e nervoso (Hajfathalian *et al.*, 2018). Para exercer benefícios à saúde, é necessário que os biopeptídeos (BPs) atravessem a barreira gastrointestinal e alcancem o tecido ou órgão alvo. Os peptídeos alimentares manifestam bioatividades por meio da modulação de diversos

mecanismos e vias moleculares, sendo que suas propriedades bioativas são influenciadas pela sequência, comprimento, hidrofobicidade e composição. Além disso, os peptídeos alimentares são geralmente considerados mais seguros do que as drogas sintéticas. Portanto, os biopeptídeos provenientes de fontes alimentares têm potencial para serem utilizados como alimentos saudáveis ou nutracêuticos no manejo, prevenção de diversas doenças e promoção da longevidade (Hajfathalian *et al.*, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial de liberação de peptídeos bioativos da globulina extraída do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) da cultivar GB Cappuccino através da digestão humana simulada.

3.2 Objetivos específicos

- a) Obter farinhas de grão-de-bico a partir de três matrizes distintas: grãos integrais, grãos submetidos à remoção do tegumento e grãos descascados submetidos previamente à extração de compostos fenólicos com solução de acetona 70% (v/v).
- b) Quantificar e caracterizar a fração globulina dos grãos do cultivar GB Cappuccino;
- c) Avaliar o perfil de hidrólise da fração globulina frente à digestão simulada *in vitro*;
- d) Avaliar as bioatividades dos hidrolisados proteicos, considerando o potencial de inibição de alfa-glicosidase, potencial anti-hipertensivo (inibição de enzima conversora de angiotensina) e o potencial antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP);
- e) Analisar a influência das faixas de peso molecular dos peptídeos nas bioatividades;
- f) Avaliar a possível influência dos componentes fenólicos nas características e bioatividades dos peptídeos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) da cultivar GB Cappuccino, tipo Desi, proveniente 2º Lote recebido em outubro de 2022, cedido pela Agro Garbanzo Produção Agrícola LTDA. (Cristalina, GO). Após o recebimento, os grãos foram armazenados sob refrigeração (4 °C) até o momento das análises.

4.2 MÉTODOS

A Figura 1 sintetiza as principais etapas deste estudo, que são a seguir detalhadas.

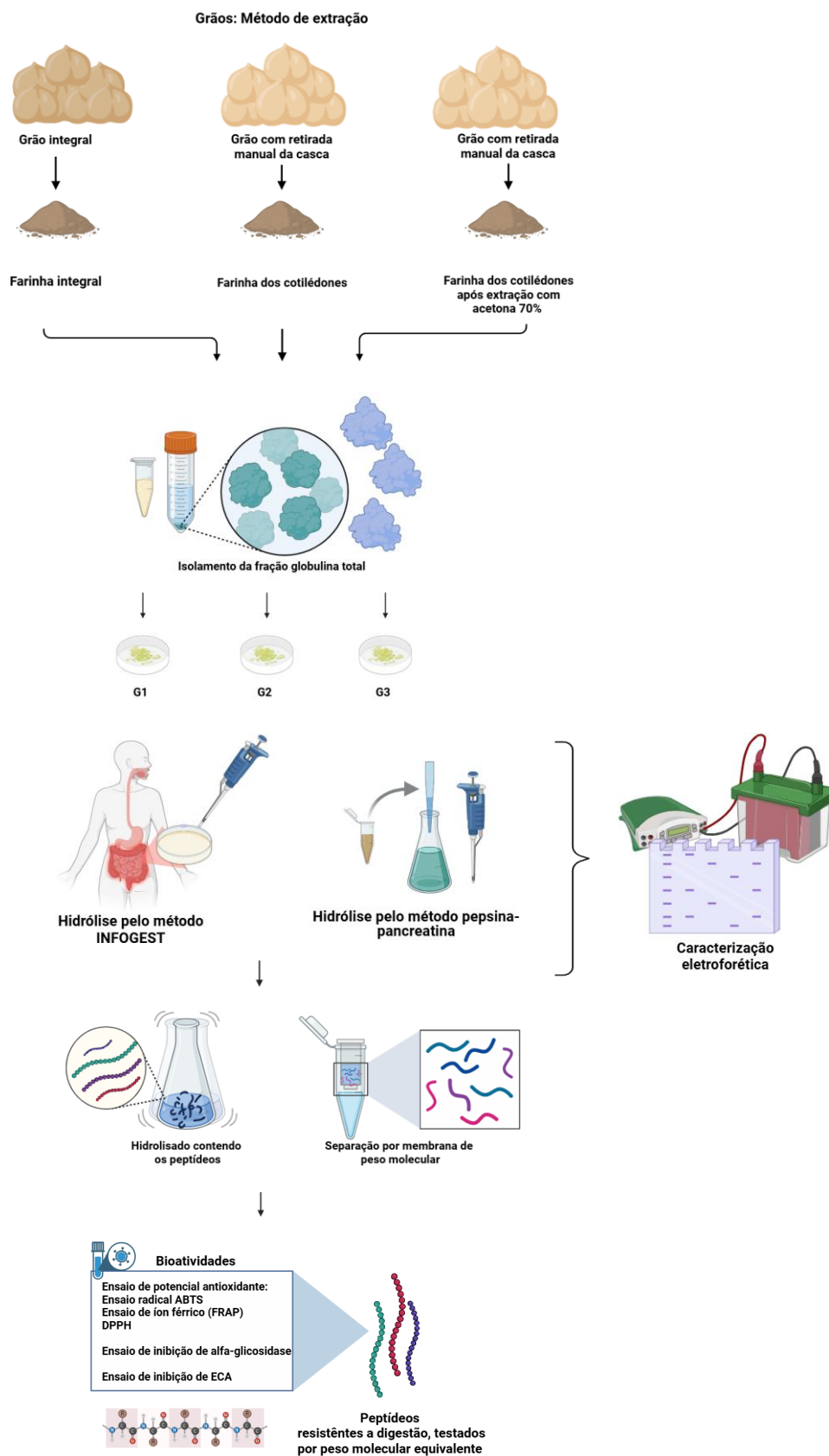


Figura 1 – Esquema geral das principais etapas do trabalho.
Fonte: a autora (2025).

4.2.1 Preparo das farinhas

Os grãos crus foram submetidos a um processo de limpeza manual e então submetidos a três tipos de tratamentos para produção de farinhas a serem destinadas à extração da globulina total.

Farinha 1: os grãos integrais foram triturados em moinho de facas modelo Pulverisette 14 (Fritsch, Alemanha) e homogeneizados até obtenção de uma farinha fina, alcançando uma granulometria adequada, passando por um tamiz de 80 mesh. A farinhas integral obtida foi empregada no isolamento da fração globulina total intitulada G1, conforme descrito no item 3.2.2.

Farinha 2: os grãos integrais foram primeiramente descascados de forma manual e então submetidos ao mesmo tratamento descrito para a farinha 1. A farinha de cotilédones obtida foi empregada no isolamento da fração globulina total intitulada G2, conforme descrito no item 3.2.2.

Farinha 3: Para a extração da globulina total sem presença de compostos fenólicos, foi utilizada a farinha 2 de cotilédones após ser submetida à extração com solução de acetona a 70% (v/v) na proporção de 1:10 (m/v, farinha:solução de acetona), seguindo o descrito por Segev *et al.* (2010). Após agitação orbital por 30 minutos a temperatura ambiente a suspensão foi centrifugada. Foram centrifugados a 7.000 rpm ($\approx 6.519 \times g$) por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e re-extraída com acetona 70% (1:10 m/v). O resíduo sólido (pellet), composto pela fração insolúvel da farinha, foi disposto em placas de Petri cobertas com papel e deixado para secagem natural à temperatura ambiente, visando seu uso futuro. A farinha assim obtida foi utilizada para extração da globulina total intitulada G3, conforme descrito no item 3.2.2.

Com o objetivo de facilitar a identificação e comparação entre as amostras de globulinas isoladas a partir de diferentes tratamentos da farinha de grão-de-bico, foram adotadas as seguintes nomenclaturas padronizadas:

- a) G1: globulina isolada da farinha integral de grão-de-bico;
- b) G2: globulina isolada da farinha obtida a partir de grãos descascados;
- c) G3: globulina isolada da farinha proveniente da farinha de cotilédones após a extração de compostos fenólicos com acetona 70%.

4.2.2 Isolamento da fração globulina

Para realizar o isolamento da globulina total foi adotado o método descrito por Tavano e Neves, (2008), a partir de cada farinha descrita em 3.2.1.

Cada farinha foi igualmente submetida a extração com solução de NaCl 0,5 mol/L (na proporção 1:10 p/v), agitação orbital por 30 minutos a temperatura ambiente, e seguida de centrifugação a 6.519 g por 40 minutos. O sobrenadante foi reservado e o processo repetido outras duas vezes. Os três sobrenadantes combinados, que continham as proteínas solúveis em sal, foram preservados, enquanto o resíduo foi descartado. As proteínas solúveis em sal presentes no sobrenadante foram então divididas em frações de albumina e globulina por meio de diálise contra água destilada por 24 h, com trocas sucessivas da água. O precipitado contendo as globulinas totais foi recuperado por centrifugação a 6.519 g por 40 minutos e utilizado para as análises após liofilização.

4.2.3 Determinação de proteínas

A quantificação do teor de nitrogênio foi realizada conforme o procedimento estabelecido pelo método de Kjeldahl, conforme descrito no manual da AOAC (1955). A concentração de proteína foi determinada utilizando-se o fator de conversão 6,25.

4.2.4 Determinação de aminoácidos

O perfil de aminoácidos totais da globulina foi determinado no Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas/SP, Brasil. A determinação foi realizada com pré-coluna, liberados após hidrólise ácida (6 mol/L), sob aquecimento (110 °C por 20 h), seguida de cromatografia líquida, utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japão), de acordo com White, Hart e Fry (1986). Os aminoácidos foram dissolvidos em diluente e introduzidos em uma coluna C18 Luna/Phenomenex (250 mm × 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex Inc., Torrence, EUA), com detector UV ajustado para 254 nm (Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão).

A quantificação foi realizada por comparação com o padrão de

aminoácidos da Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA), utilizando-se o ácido DL-2-aminobutírico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como padrão interno, conforme Hagen *et al.* (1989).

Os resíduos de triptofano foram determinados após hidrólise das amostras com pronase e reação com p-dimetilaminobenzaldeído, de acordo com Spies (1967). As análises foram realizadas em duplicata, aceitando-se diferenças não superiores a 4%, e os dados são apresentados como a média das duas determinações.

4.2.5 Perfil de proteínas por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético dos extratos aquosos e frações isoladas foi verificado em gel de dodecil sulfato de sódio e poliácrlamida (SDS-PAGE), de acordo com o método de Laemmli, (1970), usando 12% para gel de separação e 4% para gel de concentração. Os géis foram corados com uso de Coomassie brilliant blue G-250 e descoradas com solução de metanol-ácido acético.

4.2.6 Digestão proteica simulada *in vitro*

O perfil de hidrólise da globulina isolada frente às enzimas digestivas foi determinado de duas formas. Primeiramente realizou-se a hidrólise utilizando-se apenas as enzimas digestivas pepsina e pancreatina, de forma sequencial, conforme descrito por Akesson e Stahmann (1964), visando a observação do comportamento de hidrólise ao longo do processo de digestão. Neste ensaio a globulina foi por 3 horas sob ação da pepsina, seguidas de mais 24h sob ação da pancreatina, com tomada de alíquotas de tempos em tempos. A reação foi interrompida por fervura por 5 minutos, seguida de centrifugação 7.000 rpm/15 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação do número de alfa amino grupos liberados em solução, conforme descrito em 4.2.7, representando o número de ligações peptídicas rompidas.

Para expressão da digestibilidade proteica *in vitro* e observação do potencial bioativo dos peptídeos liberados pela digestão, realizou-se o ensaio conforme o protocolo estabelecido pelo método INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al.*,

2019). A reação foi interrompida por fervura por 5 minutos, seguida de centrifugação 7.000 rpm/15 min. Os sobrenadantes foram utilizados nos ensaios.

Para cálculo da digestibilidade, o percentual de hidrólise foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\%H\ OPA = \frac{(AA)}{AAtm} \times 100$$

Onde:

AA = total de alfa amino grupos livres determinados na amostra;

AAtm = total de mol aminoácidos na amostra (considerando-se que cada aminoácido apresenta um alfa amino grupo a ser liberado). O número total de mol de aminoácidos da amostra foi determinado através da análise do aminograma, obtido conforme descrito em 4.2.4.

Para ambos protocolos de hidrólise proteica um branco de enzimas foi preparado, sem adição das amostras, para que se pudesse descontar seus resultados daqueles efetivamente advindos das amostras. Para todos os ensaios com hidrolisados apresentados neste trabalho esse desconto do tubo branco foi realizado.

4.2.7 Determinação de alfa-amino grupos livres

Os extratos foram analisados quanto a presença de alfa amino grupos livres, que indicam número de ligações peptídicas rompidas. Foi utilizado reagente OPA (o-ftaldialdeído), conforme descrito por (Church *et al.*, 1983) adicionando-se diretamente à 130 µl de amostra 1 ml de reagente OPA, preparado no dia do ensaio (25 ml de tetraborato de sódio 100 nM, 2,5 ml de dodecilssulfato de sódio 20%, 40mg de OPA em 1 ml de metanol, 100 µl de β-mercaptoetanol, volume final de 50 ml ajustados com água destilada). Após exatos 2 minutos de reação as absorvâncias foram lidas a 340 nm contra branco da reação. Uma curva analítica do aminoácido L-leucina foi utilizada para os cálculos e os resultados foram expressos em mol de α-amino grupos/ml de amostra.

4.2.8 Fracionamento do hidrolisado por faixa de peso molecular

Os hidrolisados proteicos coletados foram subsequentemente fracionados por faixas de peso molecular passando por membranas de filtração molecular Amicon Ultra-15 (Merck Millipore, Burlington, MA, EUA), seguindo método descrito em Uraipong; Zhao, 2016. O hidrolisado de globulina foi primeiro filtrado através de uma membrana Amicon Ultra-15 com MWCO (peso molecular de corte) de 10 kDa. Após centrifugação a 14.000rpm por 10 minutos, o material retido na membrana e contendo peptídeos >10 kDa, foi recuperado realizando-se a centrifugação com as membranas invertidas a 1000rpm por 5 minutos, ademais foi adicionado 50ul de água destilada e repetido o processo com a membrana invertida para garantir a completa recuperação dos peptídeos. O filtrado foi carregado em outra membrana Amicon Ultra-15 com MWCO de 3 kDa. Após centrifugação o material retido na membrana (peptídeos de 3-10 kDa) foram recuperados e o filtrado, (peptídeos <3 kDa) foram reservados.

4.2.9 Determinação de bioatividades *in vitro*

As amostras dos diferentes hidrolisados produzidos tiveram suas propriedades bioativas determinadas, conforme descrito a seguir.

4.2.9.1 Inibição de alfa-glicosidade (amiloglicosidade)

A atividade inibitória da alfa-glicosidase foi avaliada seguindo o método descrito por Diniz *et al.*,(2025), com modificações. Foram incubados 10 µL de alfa-glicosidase com 10 µL dos extratos por 10 minutos, seguidos da adição de 20 µL de uma solução de amido a 1%. Após 20 minutos de incubação a 37°C, a hidrólise do amido foi monitorada pela quantificação dos açúcares redutores liberados, utilizando o método do ácido dinitrossalicílico (DNS) com leitura a 540 nm. Para determinar a atividade enzimática sem inibição (considerada como 100% de atividade), utiliza-se água destilada em substituição aos extratos. Os resultados foram expressos em termos de porcentagem de atividade inibitória.

4.2.9.2 Inibição da enzima conversora de angiotensina

A atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi realizada com base no método descrito por Holmquist *et al* (1969), utilizando FAPGG (N-[3-(2-furil)acrilóil]-L-fenilalanil-glicil-glicina) como substrato, com algumas modificações: 10 µL de ACE (50 mU·mL⁻¹) e 40 µL de extratos. Após 5 minutos, foram adicionados 750 µL de FAPGG-F7131-Sigma (0,5 mM) e a reação foi monitorada a 340 nm por 30 minutos, com leituras feitas no tempo zero e a cada 5 minutos. Para a atividade da ECA não inibida (100% de atividade) foi utilizada água destilada em substituição ao extrato. Os resultados foram expressos como IC50.

4.2.9.3 Atividade antioxidante

Ensaio de Radical ABTS+: Para a determinação por ABTS(2,2'-azinobis (3-etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico)), primeiramente o radical ABTS+ foi gerado pela incubação de 7 mmol/l de ABTS com 2.4 mmol/l de persulfato de potássio por 16 horas ao abrigo de luz, como descrito por Shalaby e Shanab (2013). A solução de ABTS foi então diluída até 0.700 de absorvância a 734 nm. Brevemente: as amostras foram utilizadas em alíquotas de até 250 µl aos quais foram acrescentados 750 µl de solução de ABTS. As absorvâncias foram lidas após reação com as amostras por 60 minutos ao abrigo de luz. Uma curva de referência de TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carboxylic Acid) na faixa de concentração de 0 a 7 nmol foi preparada e os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de TROLOX por mg de globulina.

Para o ensaio de Íon Férrico (FRAP) o potencial antioxidante dos extratos aquosos foi adicionalmente determinado utilizando a reação com íon férrico, conforme descrito por Ahn; Kim; Je, 2014. As leituras foram realizadas a 414nm.

A determinação por DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) foi realizada conforme descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). Brevemente: as amostras foram utilizadas em alíquotas de até 250 µl aos quais foram acrescentados 1000 µl de solução de DPPH 0,06 mM, em etanol 80%. As absorvâncias foram determinadas a 517 nm após incubação por 30 minutos ao abrigo de luz. Uma

curva de referência de TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carboxylic Acid), na faixa de concentração de 0 a 7nmol foi preparada e os resultados foram expressos em μmol de equivalentes de TROLOX por mg de globulina.

3.2.10 Análise estatística

As análises foram realizadas no software PAST. Para a avaliação da normalidade dos dados foi usado teste de Shapiro-Wilk. Identificada a normalidade dos dados, a comparação de resultados de três ou mais amostras independentes foi feita com o uso de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey. Para amostras dependentes relativas à comparação do efeito do processamento sequencial do grão (íntegro, descascado e descascado extraído com acetona) usou-se análise de variância de medidas repetidas (ANOVA), com identificação das diferenças por meio de comparações múltiplas pareadas (teste de Tukey). Adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas do grão-de-bico são predominantemente constituídas por globulinas, que representam cerca de 43%, quase 50% da proteína total do grão, configurando-se como a principal fração proteica (Borim *et al.*, 2026). De acordo com Borim *et al.* (2026), essa fração é composta majoritariamente por globulinas do tipo legumina (11S), que correspondem a mais de 80% do total de globulinas, enquanto as globulinas do tipo vicilina (7S) representam aproximadamente 17%. Essa distribuição evidencia não apenas a relevância quantitativa das globulinas na composição proteica do grão-de-bico, mas também o papel central da fração legumina na determinação das propriedades estruturais, nutricionais e biofuncionais dessas proteínas.

A Figura 2 apresenta o perfil eletroforético obtido por SDS-PAGE das globulinas de grão-de-bico GB Cappuccino, incluindo a fração total (globulina total), bem como suas frações isoladas tipo 7S (tipo vicilina) e tipo 11S (tipo legumina). Esta análise permite observar com maior clareza as diferenças no padrão das frações presentes na globulina total.

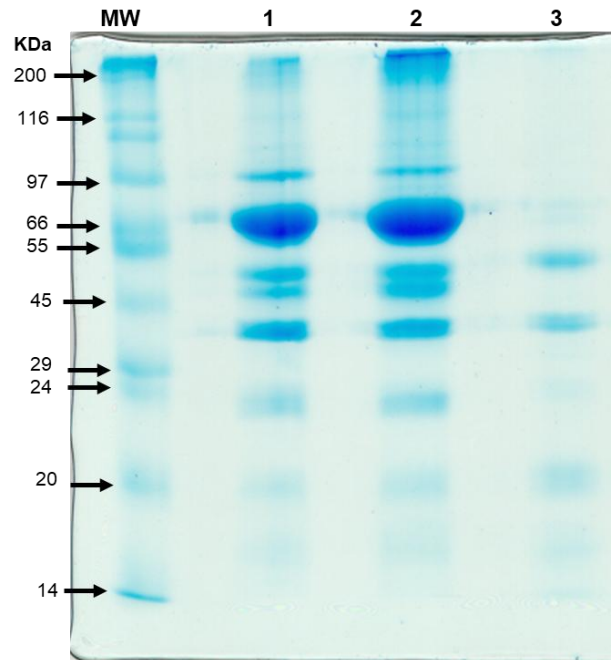


Figura 2. SDS-PAGE de frações de globulina isoladas do grão-de-bico var. GB Cappuccino em condições não redutoras. Faixas: MW – Marcadores de peso molecular; 1 – Globulinas totais; 2 – Globulinas do tipo legumina (tipo 11S); 3 – Globulinas do tipo vicilina (tipo 7S).

Fonte: a autora (2025).

A amostra de globulina total (Figura 2) exibe um padrão proteico amplo, com diversas bandas distribuídas ao longo do gel, refletindo a presença combinada das frações tipo vicilina (7S) e tipo legumina (11S), além de possíveis subunidades menores. As bandas mais proeminentes localizam-se na faixa intermediária do gel, correspondendo às subunidades principais dessas globulinas. As bandas mais representativas dessas proteínas aparecem no intervalo de 29 a 97 kDa, destacando-se uma banda intensa próxima de 66 kDa. Em contraste, a fração semelhante à vicilina exibiu predominantemente bandas abaixo de 55 kDa. Esses achados corroboram estudos prévios que descrevem padrões eletroforéticos semelhantes para globulinas de diferentes cultivares de

grão-de-bico (Neves; Silva; Lourenço, 2004).

A Figura 3 apresenta o perfil eletroforético da globulina total antes e após a tratamento com β -mercaptoetanol. Após o tratamento redutor, observa-se que a fração parece conter tantoproteínas monoméricas, cujas bandas permaneceram inalteradas, quanto proteínas multiméricas, evidenciadas pelas modificações em determinadas bandas. De forma marcante, a banda intensa próxima de 66 kDa praticamente desaparece, enquanto surgem novas bandas na região de cerca de 20 kDa.

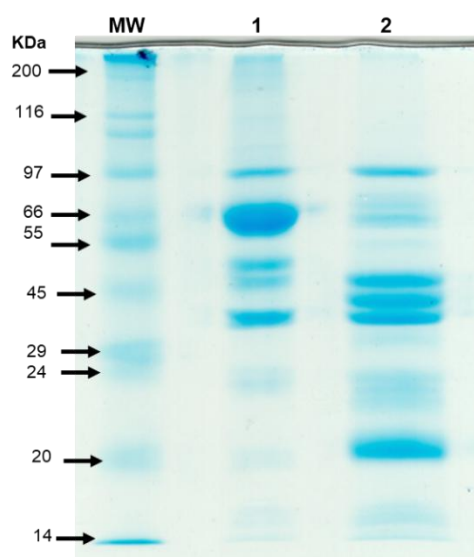


Figura 3. SDS-PAGE da globulina total isolada do grão-de-bico var. GB Cappuccino em condições não redutoras (1) e redutoras (2). MW: Marcadores de peso molecular.

Fonte: a autora (2025).

De acordo com Duranti, (2006), a fração 7S apresenta bandas características entre 45 e 50 kDa, com uma proteína trímica de armazenamento comum em leguminosas. As bandas nesta faixa indicam a presença dominante das subunidades da vicilina, e sua menor intensidade em relação à fração 11S é compatível com relatos de que essa fração representa cerca de 30% das globulinas do grão-de-bico (Neves; Silva; Lourenço, 2004).

Por sua vez, a fração tipo 11S (tipo legumina) apresenta bandas muito intensas, especialmente na região intermediária do gel, compatíveis com a forma monomérica da legumina dissociada sob condições redutoras. De acordo com

Lásztity, (1996) e Sánchez-Vioque *et al.*, (1999) nessa fração também são visíveis bandas correspondentes às subunidades α e β , que compõem o monômero da legumina e são conectadas por uma única ligação dissulfeto na forma nativa. A intensidade e a nitidez das bandas nesta fração confirmam a predominância da legumina na globulina total, corroborando relatos anteriores que indicam que a fração 11S é a principal globulina do grão-de-bico, representando cerca de 60% da proteína total de armazenamento (Chavan; Kadam; Salunkhe, 1987; Singh *et al.*, 1988).

O perfil de aminoácidos da globulina total evidencia uma composição característica de proteínas de leguminosas, com predomínio de aminoácidos não essenciais, especialmente ácido glutâmico (19,47 g/100 g de proteína) e ácido aspártico (12,95 g/100 g de proteína). Esses aminoácidos são reconhecidos como constituintes majoritários de grão-de-bico, refletindo a elevada proporção de resíduos carregados negativamente, os quais influenciam propriedades tecnológicas e funcionais dessas proteínas, como solubilidade e capacidade de interação com água.

Tabela 1. Perfil de aminoácidos da fração globulina total isolada do grão-de-bico da cultivar GB Cappuccino.

| Aminoácidos | (g/100g de proteína) | | | | Recomendação 1 da FAO/OMS/UNU |
|---------------------------|----------------------|------------------|----------|---------|---|
| | Média | Desvio Padrão | Infantil | Criança | Criança mais velha, adolescente e adulto |
| Não essencial: | - | - | - | - | - |
| Ácido aspártico | 12,95 | 0,00 | - | - | - |
| Ácido glutâmico | 19,47 | 0,00 | - | - | - |
| Serina | 6,07 | 0,01 | - | - | - |
| Prolina | 4,26 | 0,02 | - | - | - |

| | | | | | |
|----------------------------|-----------------------|------|-----|------|------|
| Glicina | 3,63 | 0,02 | - | - | - |
| Alanina | 3,89 | 0,03 | - | - | - |
| Arginina | 10,87 | 0,03 | | | |
| Essencial: | - | - | - | - | - |
| Treonina | 2,80 (0,90) | 0,03 | 4,4 | 3,1 | 2,5 |
| Valina | 4,07 (0,95) | 0,03 | 5,5 | 4,3 | 4,0 |
| Metionina + Cistina | 1,81 <u>(0,67)</u> | - | 3,3 | 2,7 | 2,3 |
| <i>Metionina</i> | 1,06 | 0,00 | - | - | - |
| <i>Cistina</i> | 0,75 | 0,01 | - | - | - |
| Isoleucina | 4,22 | 0,01 | 5,5 | 3,2 | 3,0 |
| Leucina | 7,55 | 0,01 | 9,6 | 6,6 | 6,1 |
| Tirosina + Fenilalanina | 9,33 | - | 9,4 | 5,2 | 4,1 |
| <i>Tirosina</i> | 2,46 | 0,01 | - | - | - |
| <i>Fenilalanina</i> | 6,87 | 0,01 | - | - | - |
| Triptofano | 0,64 (0,75) | 0,00 | 1,7 | 0,85 | 0,66 |
| Lisina | 5,74 | 0,01 | 6,9 | 5,7 | 4,8 |
| Histidina | 2,70 | 0,00 | 2,1 | 2,0 | 1,6 |
| | - | - | - | - | - |
| Total essencial | 38,86 | - | - | - | - |
| Hidrofóbico total | 36,19 | - | - | - | - |
| Hidrofílico total | 63,81 | - | - | - | - |
| Total de BCAA 2 | 15,84 | - | - | - | - |
| Aromático total | 9,97 | - | - | - | - |

¹ Recomendação da FAO/OMS/UNU para cada aminoácido indispensável (FAO, 2013) para as faixas etárias de “Bebê” (do nascimento aos 6 meses), “Criança” (de 6 meses a 3 anos) e “Criança maior, adolescente e adulto” (g/100g de proteína). Os resultados entre parênteses representam o Escore Químico dos aminoácidos em relação à recomendação da FAO para crianças pequenas. O valor sublinhado representa o primeiro aminoácido limitante considerando a recomendação para “criança pequena”. ² BCAA: aminoácidos de cadeia ramificada

No que se refere aos aminoácidos essenciais, a amostra apresentou teor total de 38,86 g/100 g de proteína. Destacam-se os elevados teores de leucina (7,55 g/100 g), isoleucina (4,22 g/100 g) e valina (4,07 g/100 g), resultando em um conteúdo total de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) de 15,84 g/100 g de proteína.

Entretanto, assim como amplamente descrito para proteínas de leguminosas, observou-se limitação nos aminoácidos sulfurados (metionina + cistina), cujo teor total foi de 1,81 g/100 g de proteína, valor inferior às recomendações da FAO/OMS/UNU para crianças pequenas. Esse comportamento é consistente com os achados de Xiao *et al.* (2022) e de outros estudos recentes que apontam a deficiência de aminoácidos sulfurados como uma característica intrínseca das proteínas do grão-de-bico, independentemente do tipo botânico (desi ou kabuli). Além disso, o triptofano (0,64 g/100 g de proteína) também se apresentou como aminoácido limitante, especialmente quando comparado às exigências nutricionais para populações infantis, corroborando tendências observadas na literatura internacional.

A comparação com estudos recentes que exploraram detalhadamente a composição de aminoácidos do grão-de-bico revela que a cultivar GB Cappuccino apresenta valores de lisina (5,74 g/100 g de proteína) compatíveis ou ligeiramente superiores aos relatados para outras variedades desi. Esse aspecto é nutricionalmente relevante, uma vez que a lisina é frequentemente limitante em cereais, reforçando o potencial do grão-de-bico como componente estratégico em dietas baseadas em combinações leguminosa-cereal. Trabalhos recentes destacam que essa complementaridade aminoacídica contribui para a melhoria do valor biológico global das proteínas da dieta,

De forma geral, o perfil de aminoácidos do grão-de-bico desi GB Cappuccino apresenta elevada similaridade com os dados reportados na literatura para outras cultivares, confirmando a estabilidade composicional das proteínas da espécie *Cicer arietinum* L. (XIAO *et al.*, 2022; ONDER *et al.*, 2023).

Embora a limitação de aminoácidos sulfurados e de triptofano represente uma restrição nutricional clássica das leguminosas, essa característica tem sido consistentemente observada em diferentes cultivares de grão-de-bico, independentemente do tipo botânico ou da origem geográfica (TAVANO *et al.*, 2008; TAVANO *et al.*, 2016). Ademais, evidências recentes indicam que dietas com restrição de metionina podem estar associadas a efeitos metabólicos benéficos, incluindo melhora da sensibilidade à insulina, redução do estresse oxidativo e potencial promoção da longevidade, o que confere relevância adicional às proteínas do grão-de-bico sob a perspectiva funcional e nutracêutica (MALUNGA *et al.*, 2014; ONDER *et al.*, 2023). Assim, os resultados obtidos indicam que a globulina da cultivar GB Cappuccino apresenta não apenas valor nutricional compatível com o descrito na literatura, mas também potencial para aplicação em estratégias alimentares voltadas à saúde e ao desenvolvimento de ingredientes proteicos de origem vegetal (XIAO *et al.*, 2022).

Um outro aspecto importante de proteínas é seu comportamento frente à digestão, sendo seu potencial de hidrólise um fator bastante relacionado a este perfil. Assim, a globulina total isolada foi estudada quanto a seu perfil frente as principais enzimas de digestão proteica humana (pepsina e pancreatina).

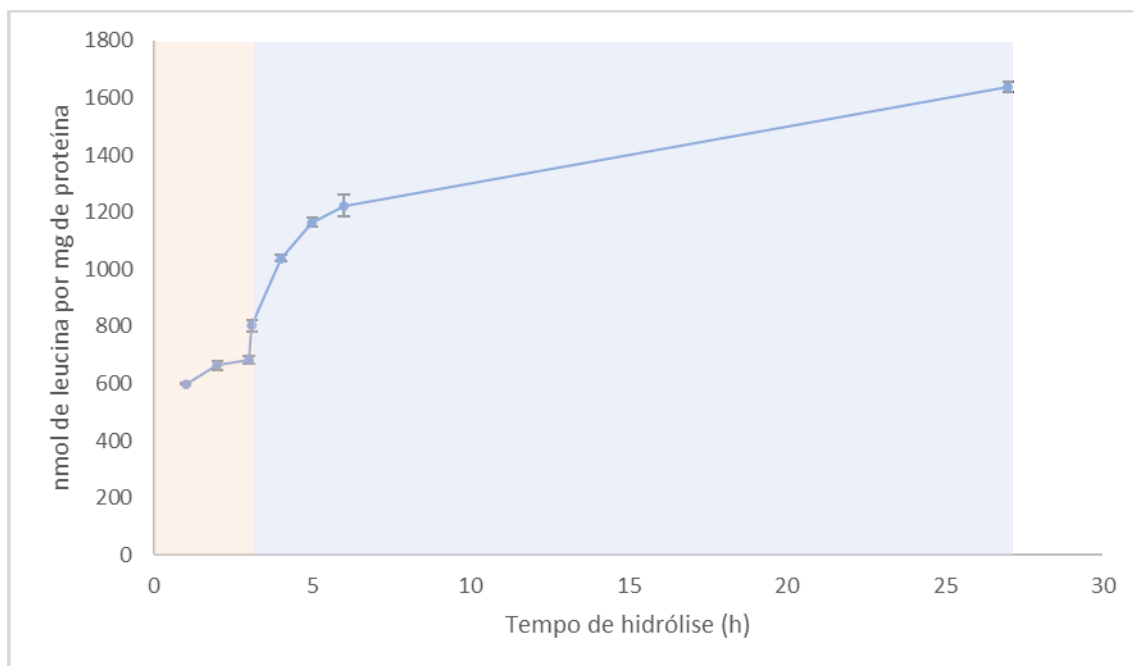


Figura 4. Perfil de hidrólise das globulinas totais de grão-de-bico (cultivar GB Cappuccino) durante a digestão simulada com uso das enzimas pepsina

(representando seu comportamento frente a fase gástrica: fundo rosa) e pancreatina (representando seu comportamento frente a fase intestinal: fundo azul). Os dados representam a média de três repetições. As barras representam os desvios padrões.

Fonte: a autora (2025).

A digestibilidade das proteínas de leguminosas é profundamente influenciada por suas características conformacionais e estruturais, que determinam a acessibilidade das enzimas durante a proteólise. No caso das globulinas, é amplamente reconhecido que esse grupo apresenta menor susceptibilidade à ação enzimática quando comparado a outras proteínas presentes em alimentos. Estudos demonstram que as globulinas de diversas leguminosas tendem a resistir à pepsina durante a etapa gástrica, sendo, no entanto, degradadas em peptídeos menores e aminoácidos ao longo da fase intestinal (Tan *et al.*, 2022). De forma semelhante, pesquisas envolvendo vicilinas apontam que essas proteínas sofrem hidrólise parcial frente às enzimas digestivas, e que o processamento térmico pode aumentar a sua vulnerabilidade à degradação quando comparado ao seu estado nativo (Tavano & Neves, 2008).

Essa resistência inicial à proteólise parece estar associada à organização altamente compacta e estável da estrutura secundária das globulinas, que limita o acesso das proteases a regiões específicas de clivagem. Além disso, em condições ácidas, como as encontradas no estômago, essas proteínas podem formar agregados robustos, o que reforça seu comportamento resiliente frente à digestão. Durante o avanço da digestão, a ação enzimática tende a romper parcialmente essa estrutura organizada, promovendo rearranjos conformacionais que aumentam o conteúdo de cadeias aleatórias; paralelamente, o estabelecimento de novas ligações de hidrogênio intramoleculares pode, em alguns casos, dificultar ainda mais a hidrólise completa (Kang *et al.*, 2023).

Outro ponto importante é o papel das estruturas em folha β , características das proteínas de leguminosas. Há evidências de que um teor mais elevado desse arranjo secundário está associado a maior resistência proteolítica, sendo observada uma relação inversa entre o conteúdo de folha β e

a digestibilidade *in vitro* (Yang *et al.*, 2016). Além disso, as interações entre proteínas e sua propensão à agregação interferem diretamente no processo digestivo. É relatado que, quando submetidas a condições de desnaturação térmica, globulinas podem formar agregados mais frouxos e desordenados, predominantemente estabilizados por interações não covalentes, mudanças essas que tendem a favorecer a digestão intestinal (Zhang *et al.*, 2022). Outras interações, como aquelas mediadas por hidrofobicidade superficial e estruturas em folha β , também desempenham papel relevante na agregação durante a extração, o processamento e mesmo durante a digestão gástrica (He *et al.*, 2021). Em paralelo, o teor reduzido de cisteína em globulinas contribui para menor formação de ligações dissulfeto, o que pode facilitar a digestão, uma vez que essas ligações são determinantes na formação de agregados proteicos altamente resistentes (Picariello *et al.*, 2023).

O estado conformacional da proteína antes e durante a digestão é, portanto, determinante para o grau de hidrólise observado. O desdobramento das cadeias polipeptídicas está associado ao aumento da hidrofobicidade superficial, característica que favorece o acesso das enzimas digestivas e amplia a extensão da clivagem peptídica. Esse comportamento já foi documentado em proteínas de soja e ervilha, nas quais maior exposição de domínios hidrofóbicos resultou em incremento expressivo da digestão (Tang *et al.*, 2022). De modo complementar, a solubilidade das proteínas ao longo do processo digestivo também se mostra variável e dependente do ambiente e da composição proteica. Condições típicas do estômago, como acidez elevada, presença de pepsina e forças mecânicas associadas à agitação, podem favorecer a liberação de proteínas e peptídeos solúveis. Em grão-de-bico, há relatos de incremento da solubilidade após as fases gástrica e intestinal (Liu *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2022), possivelmente relacionado à formação de peptídeos menores, à exposição de resíduos ionizáveis previamente ocultos no núcleo proteico ou à repulsão eletrostática que inibe a formação de agregados insolúveis (Gao *et al.*, 2024).

À luz desses aspectos estruturais e físico-químicos, o comportamento da globulina total isolada frente à digestão simulada pode ser melhor compreendido. Ao avaliar o perfil de hidrólise frente às principais enzimas da digestão proteica humana, pepsina e pancreatina, observa-se um aumento contínuo e significativo

na liberação de grupos α -amino ao longo do tempo, indicando clivagem progressiva das ligações peptídicas, especialmente após a adição da pancreatina (Figura 4). Nos primeiros 5 minutos de hidrólise pancreática, verifica-se um incremento acentuado do grau de hidrólise (GH), seguido de uma desaceleração após aproximadamente 5 horas, sugerindo uma rápida liberação inicial de peptídeos mais acessíveis e, posteriormente, a persistência de fragmentos mais resistentes à ação enzimática.

Essa cinética reflete a atividade combinada e a especificidade das enzimas utilizadas. A pepsina, uma aspartil-protease ativa em pH ácido (1,5–3,0), atua preferencialmente em ligações envolvendo resíduos hidrofóbicos aromáticos, como fenilalanina, triptofano e tirosina (Altun; Cetinus, 2007; Castañeda-Valbuena *et al.*, 2022), resultando na liberação inicial de peptídeos hidrofóbicos, frequentemente associados a elevada bioatividade antioxidante (Nwachukwu; Aluko, 2019). A pancreatina, por sua vez, consiste em um complexo enzimático contendo endopeptidases (tripsina, quimotripsina e elastase) e exopeptidases (carboxipeptidases A e B), que atuam sinergicamente em pH neutro a levemente alcalino, promovendo uma clivagem mais extensiva e menos específica dos peptídeos previamente gerados (Syarmila *et al.*, 2014).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Figura 5) reforça essa interpretação ao revelar padrões distintos de digestão ao longo do tempo, permitindo acompanhar a cinética de clivagem das globulinas totais. Durante a fase gástrica simulada, observam-se bandas proeminentes de peso molecular intermediário, que demonstram resistência relativa à ação isolada da pepsina, mesmo após 4 horas de digestão. Tal comportamento é coerente com achados em outras matrizes vegetais, como frações proteicas de arroz, nas quais bandas persistentes também foram observadas após digestão gástrica simulada (Zhu *et al.*, 2008).

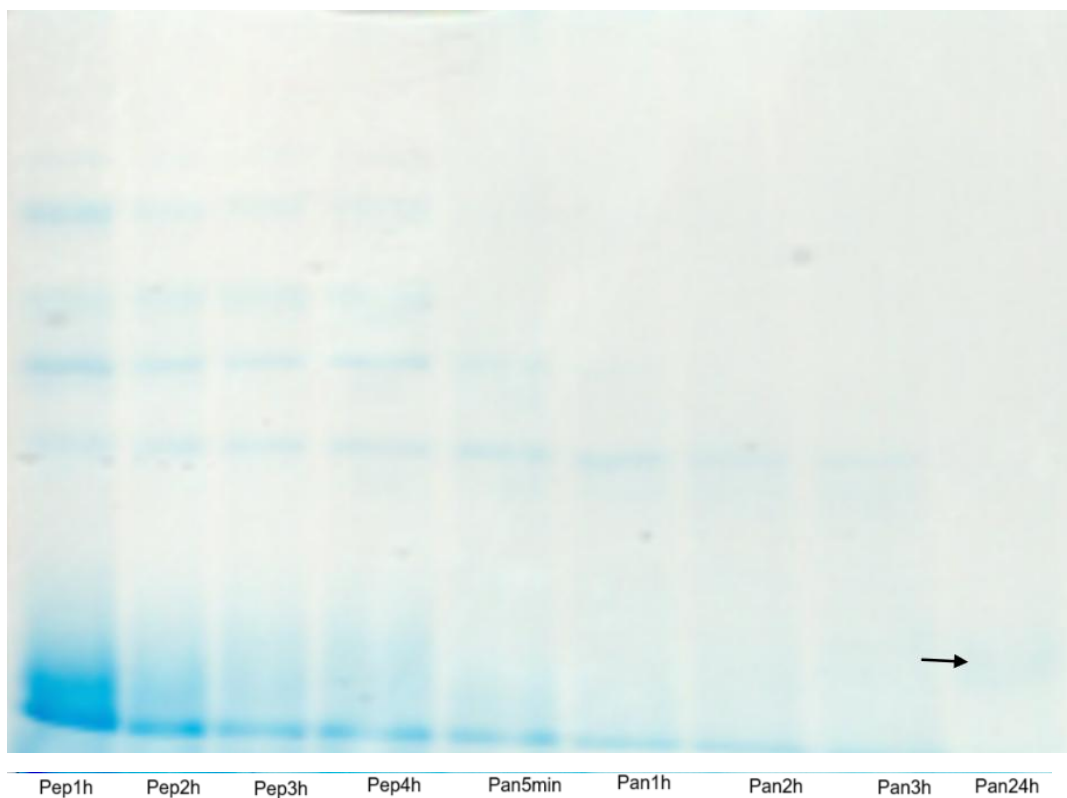


Figura 5. Perfil eletroforético (SDS-PAGE a 12%) da fração proteica globulina do grão-de-bico (tipo GB Cappuccino) submetida à hidrólise enzimática simulada pelas enzimas digestivas pepsina (1 h, 2 h, 3 h e 4 h) e pancreatina (5 min, 1 h, 2 h, 3 h e 24 h).

Fonte: a autora (2025).

Com a introdução da pancreatina, mesmo após apenas 5 minutos de incubação, ocorre redução evidente na intensidade das bandas de alto peso molecular, evidenciando a eficácia das endopeptidases pancreáticas na degradação de estruturas proteicas mais resistentes à pepsina. No entanto, bandas de menor peso molecular permanecem visíveis até aproximadamente 3 horas de digestão, sendo completamente hidrolisadas apenas após 24 horas, o que demonstra a resistência relativa de determinados peptídeos à ação enzimática combinada. Em estudos conduzidos por Lou *et al.* (2014), essa resistência foi atribuída à presença de estruturas secundárias estáveis ou à baixa acessibilidade enzimática.

Notavelmente, após 24 horas de hidrólise com pancreatina, observa-se o surgimento de uma banda específica, ausente nos demais tempos, com

mobilidade eletroforética compatível com peptídeos de baixo peso molecular (<10 kDa). Esse padrão é semelhante ao descrito por Tavano e Neves (2008), que relataram a formação de uma banda em torno de 20 kDa após 120 minutos de hidrólise da vicilina nativa de grão-de-bico com quimotripsina. Tal similaridade sugere que a banda detectada após 24 horas possa representar um fragmento específico da vicilina, liberado tardiamente em função da resistência conformacional inicial dessa proteína ao processo digestivo.

De acordo com Shi *et al.* (2019), a persistência de determinadas bandas durante a digestão está diretamente relacionada à conformação estrutural das proteínas e à especificidade das enzimas envolvidas na hidrólise, padrão semelhante ao observado por Resurreccion *et al.* (1993), que relataram a presença de resíduos proteicos resistentes mesmo após longos períodos de digestão *in vitro*. De maneira geral, observa-se a hidrólise progressiva das globulinas ao longo do tempo, com rápido desaparecimento das bandas de alto peso molecular após a ação da pancreatina e persistência temporária de fragmentos de baixo peso molecular, os quais são completamente degradados apenas em tempos prolongados de incubação.

Portanto, os resultados corroboram que o sistema de hidrólise pepsina-pancreatina é eficaz na digestão progressiva das proteínas do grão-de-bico GB Cappuccino, ao mesmo tempo em que evidencia a influência marcante da estrutura proteica na cinética de hidrólise. A manutenção temporária de fragmentos resistentes sugere que a digestão dessas proteínas pode favorecer a liberação de peptídeos estáveis e potencialmente bioativos, aspecto que será explorado nas seções subsequentes potencial funcional, conforme se observará a seguir.

Os hidrolisados obtidos ao longo do processo de digestão simulada foram avaliados quanto à sua capacidade de eliminação do radical ABTS⁺. A figura 6 apresenta os resultados.

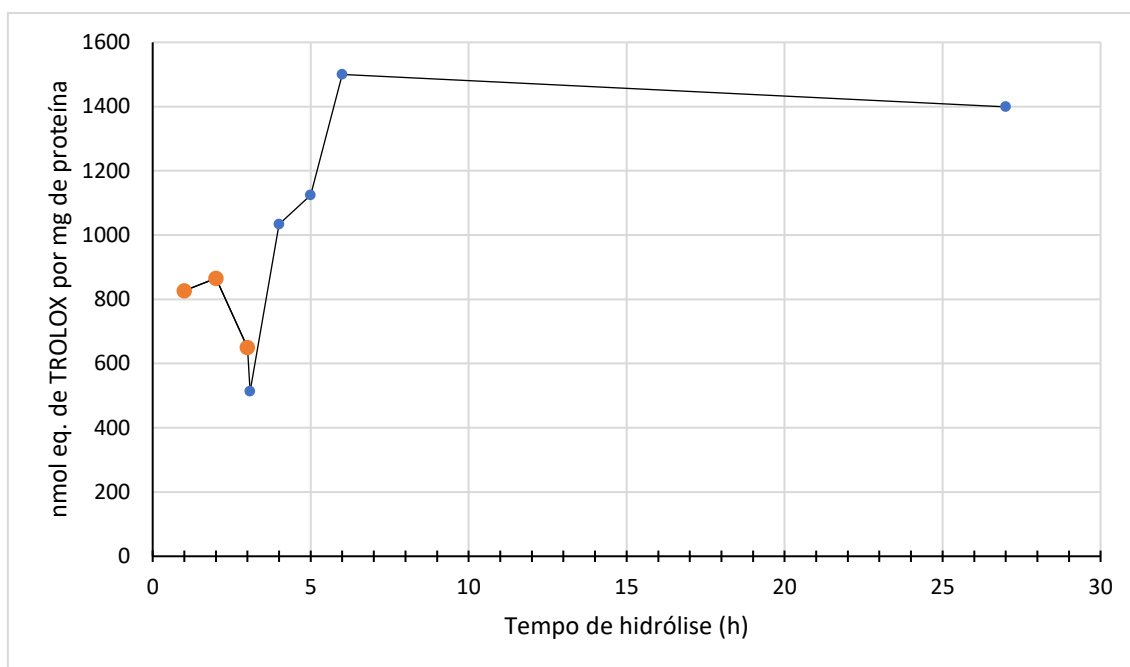


Figura 6. Atividade antioxidante do hidrolisado da fração globulina total do grão-de-bico (cultivar GB Cappuccino), obtido por digestão enzimática simulada com sequencia de pepsina (3 h) e pancreatina (24 h). A atividade foi determinada pelo método ABTS e os resultados expressos em nmol de equivalentes de TROLOX por mg de globulina do hidrolisado.

Fonte: a autora (2025).

De acordo com os dados, as amostras com maior grau de hidrólise apresentaram os maiores valores de eliminação do radical ABTS, sugerindo que a formação de peptídeos menores potencializou a capacidade antioxidante. Este achado está em consonância com outros estudos que destacam a eficácia de peptídeos de menor peso molecular (geralmente entre 500 e 1500 Da) na neutralização de radicais livres (Kou *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2008; Pihlanto-Leppälä, 2000). A combinação dessas enzimas permite simular a digestão gastrointestinal humana e pode ser explorada como estratégia biotecnológica para produção de hidrolisados com propriedades bioativas, como observado também por Sheriff *et al.* (2014) e Shiao *et al.* (2021).

O perfil observado é coerente com a literatura, que demonstra que diferentes enzimas, ao clivarem ligações específicas, liberam peptídeos com características distintas (Tavano, 2013). A liberação progressiva de peptídeos

com maior potencial antioxidante em tempos mais longos pode estar associada pelo acúmulo de fragmentos ricos em aminoácidos hidrofóbicos ou aromáticos, como tirosina, histidina, metionina e triptofano, sabidamente associados à capacidade de neutralização de radicais livres (Rajapakse *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2016). Aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr, Phe), sulfurados (Cys, Met) e imidazólicos (His) apresentam elevada capacidade de doar hidrogênio e estabilizar os radicais (Elias; Kellerby; Decker, 2008; Rajapakse *et al.*, 2005). A presença desses resíduos confere aos peptídeos não apenas reatividade antioxidante, mas também maior estabilidade estrutural, o que os torna mais eficientes que os aminoácidos livres isolados.

Além disso, a atuação sinérgica de resíduos específicos, como a sequência Pro-His-His, previamente descrito por Chen *et al.*, (1996), também pode estar contribuindo para os altos níveis de atividade antioxidante observados nas frações com maior grau de hidrólise. Observa-se aumento da atividade antioxidante com o avanço do tempo de hidrólise, especialmente após o início da ação da pancreatina, refletindo a importância tanto da extensão da hidrólise quanto da composição específica dos peptídeos gerados.

Estudos realizados por Del Mar Yust *et al.* (2012); Kou *et al.* (2013); Megías *et al.* (2007) e Torres-Fuentes *et al.* (2015) também identificaram peptídeos derivados do grão-de-bico como promissores agentes antioxidantes, reforçando o potencial da espécie como fonte natural de bioativos. A nossa investigação com a cultivar GB Cappuccino complementa esses achados, revelando que a digestão humana pode ser eficiente para liberação desses compostos. O padrão observado é semelhante ao descrito por Sonklin *et al.*, (2018), que demonstraram aumento na atividade antioxidante de hidrolisados de feijão-mungo até determinado tempo de hidrólise, com estabilização do potencial antioxidante em tempos prolongados, sugerindo saturação da capacidade enzimática ou limitação de substrato.

A literatura ainda evidencia que a digestão gastrointestinal simulada, como a realizada com pepsina e pancreatina, é capaz de liberar peptídeos bioativos em condições próximas às fisiológicas, com propriedades comparáveis às aquelas observadas em antioxidantes sintéticos (Barbana; Boye, 2011; Kamran *et al.*, 2023). Tais resultados são particularmente importantes considerando que a globulina de grão-de-bico representa a fração proteica majoritária e de alta

qualidade nutricional.

Nas últimas décadas, a geração de peptídeos antioxidantes por meio da hidrólise enzimática de proteínas alimentares tem despertado significativo interesse, devido ao seu potencial nutracêutico e funcional. Estudos indicam que hidrolisados proteicos oriundos de diferentes matrizes alimentares, como pescado (Bougatef *et al.*, 2010), soja (Moure; Domínguez; Parajó, 2006), leite (Tsoptom *et al.*, 2011) e farelo de arroz (Zhang *et al.*, 2010), exibem alta capacidade antioxidante, sendo eficazes na neutralização de radicais livres, na quelagem de metais e na inibição de processos oxidativos. Tais propriedades tornaram-se ainda mais relevantes diante das preocupações sobre os efeitos adversos de antioxidantes sintéticos, como BHA, BHT e propilgalato (Samaranayaka *et al.* 2008).

Diniz *et al* (2025), ao avaliarem a composição química de 20 genótipos brasileiros de grão-de-bico dos tipos desi e kabuli, incluindo a cultivar GB Cappuccino, observaram que os compostos fenólicos exercem importante função antioxidante. De acordo com o estudo, a cultivar GB Cappuccino, do tipo desi e com coloração marrom intensa, apresentou cerca de 9,21% de tegumento em relação à massa total da semente, sendo esse tegumento responsável por 5.527,08 µg EAG/g de fenólicos totais e 1.563,17 µg EC/g de flavonoides.

Os resultados indicaram que sementes com maiores teores de fenólicos totais e flavonoides apresentaram maior atividade antioxidante, tanto nos tegumentos quanto nas sementes inteiras. Destaca-se que grãos com tegumentos de coloração mais intensa apresentaram níveis significativamente mais elevados de antioxidantes.

Siqueira *et al* (2025), demonstraram que grande parte desses compostos fenólicos podem se solubilizar facilmente em água. Isto nos indica que estes compostos podem, além de estar presentes no sobrenadante da extração das globulinas, entrar em contato com as globulinas durante esse processo. De acordo com Seczyk *et al* (2019), a formação de complexos proteína-fenólicos pode exercer influência significativa sobre a estrutura da proteína, sua solubilidade, hidrofobicidade, dentre outros fatores. Esses compostos fenólicos, ao se ligarem às proteínas, podem bloquear determinados resíduos de aminoácidos, promovendo alterações nas propriedades físico-químicas das mesmas. Esse processo, além de alterar o perfil de hidrólise de proteínas, tem

sido relacionado, a modificações nas propriedades funcionais e biológicas das proteínas (Seczyk *et al.*, (2019), o que poderia ser um fator confundidor na conclusão de que as globulinas seriam as responsáveis pela atividade antioxidante observada.

Assim, no presente trabalho, observou-se o comportamento das globulinas isoladas considerando-se a remoção de compostos fenólicos naturalmente presentes na matriz, especialmente através da remoção da casca e também realização da extração adicional dos componentes fenólicos do cotilédone antes da extração das globulinas (Figura 7). No estudo conduzido por Riaz *et al.* (2010), diferentes solventes foram avaliados quanto à sua eficiência na extração de compostos fenólicos a partir de grãos de grão-de-bico colorido. Os autores observaram que a acetona 70% apresentou maior rendimento na extração de polifenóis totais em comparação com outros solventes, como metanol e etanol em concentrações similares, sendo também eficaz na obtenção de extratos com elevada atividade antioxidante. A superioridade da acetona 70% foi atribuída à sua polaridade intermediária, que favorece a solubilização tanto de compostos fenólicos hidrofílicos quanto ligeiramente hidrofóbicos. Com base nesses resultados, este estudo adotou a acetona 70% como solvente de escolha para extração de compostos fenólicos presentes nos grãos.

A Figura 7 ilustra o aspecto visual das membranas de diálise contendo os três diferentes sobrenadantes da extração das globulinas obtidos a partir das três farinhas preparadas a partir do grão-de-bico (cultivar GB Cappuccino) submetidos aos processo de redução da presença de compostos fenólicos.



Figura 7. Aparência das membranas de diálise contendo os sobrenadantes das extrações de globulinas, pós-diálise, conforme descrito em Material e Métodos (item 3.2.2): (1) extração da globulina G1, obtida a partir de grãos íntegros com casca; (2) extração da globulina G2, isolada de grãos descascados (cotilédones); (3) extração da globulina (G3) isolada de cotilédones após a extração de compostos fenólicos com acetona 70% (v/v).

Fonte: a autora (2025).

Observa-se que a membrana que corresponde à extração de G1 apresenta um sobrenadante levemente amarelado, com precipitado mais facilmente visualizado no fundo da membrana, indicando que as globulinas

foram mais facilmente precipitadas ao longo do processo. No entanto, nas amostras correspondentes às extrações de G2 e G3, apresentam uma coloração opaca e esbranquiçada. Este aspecto visual sugere redução de extração de compostos com coloração amarronzada, característicos das cascas dos grãos, e que globulinas devem permanecer mais facilmente suspensas no líquido dialisado durante o próprio processo de diálise.

A diálise é frequentemente utilizada para promover a precipitação seletiva de globulinas, separando-as de outras proteínas como as albuminas. Aluko e Rotimi (2023) e Malik e Saini (2017), observaram que a remoção de compostos fenólicos pode influenciar a solubilidade e o comportamento de agregação das proteínas, especialmente em função de alterações no pH e da diminuição da hidrofobicidade superficial. Segundo esses autores, esse processo pode resultar em maior solubilidade proteica em ampla faixa de pH (3–11), dificultando a precipitação. Apesar de preliminares, os achados observados nesta pesquisa indicam certa semelhança com esses relatos, e a necessidade de uma investigação mais aprofundada sobre o papel dos fenólicos nas interações proteína-proteína durante a etapa de diálise.

Chang *et al.*, (2012) relatou que a presença de componentes como cascas e compostos fenólicos podem estabilizar as estruturas proteicas através de interações hidrofóbicas, reduzindo sua solubilidade em meio aquoso. Ademais, futuramente serão avaliados os percentuais de rendimento para melhor compreensão sobre a recuperação da globulina com diferentes condições de extração.

A Figura 8 apresenta o perfil eletroforético das globulinas totais isoladas das três diferentes farinhas, buscando-se verificar se houve alteração desse perfil com a modificação da matriz de extração. Observa-se um padrão de bandas bastante consistente entre as três amostras analisadas: G1, G2 e G3.

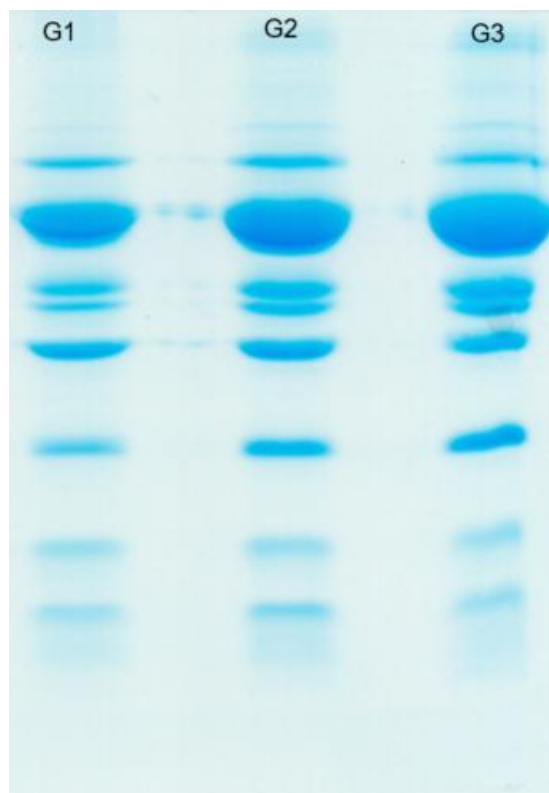


Figura 8. SDS -PAGE de globulinas totais de de grão-de-bico isoladas a partir de três diferentes matrizes: . (G1) Globulina isolada da Farinha do grão inteiro; (G2) globulina isolada da farinha obtida a partir de grãos descascados manualmente, antes do processo de moagem; (G3) globulina isolada da farinha proveniente de cotilédones de grãos descascados manualmente, após a extração de compostos fenólicos utilizando solução de acetona 70% (v/v). Gel de 12 % de acrilamida com amostras não tratadas com mercaptoetanol.

Fonte: a autora (2025).

Notavelmente, a comparação entre os três perfis eletroforéticos demonstra uma uniformidade significativa no padrão de bandas, o que evidencia que os diferentes tratamentos aplicados, como a remoção da casca (rica em compostos fenólicos) e a extração com acetona 70%, não alteraram substancialmente a composição das globulinas em termos de suas subunidades proteicas.

Dessa forma, os resultados apresentados reforçam que, apesar das variações nas farinhas utilizadas (inteira, sem casca, e sem casca com extração com acetona 70%), a fração globulina isolada apresenta um perfil proteico

altamente conservado. Esta constatação é relevante tanto do ponto de vista funcional quanto tecnológico, uma vez que confirma a integridade estrutural das globulinas após etapas de processamento e remoção de componentes da matriz.

Já a Figura 9 apresenta o perfil eletroforético das globulinas de grão-de-bico da cultivar GB Cappuccino, obtido por SDS-PAGE nas mesmas condições aplicadas à análise anterior, porém com gel de 20 cm, sendo o anterior com gel de 10 cm (Figura 8). Esse teste foi realizado para se conferir a separação entre as bandas, uma vez que o gel de 20 cm poderia permitir maior deslocamento entre as proteínas.

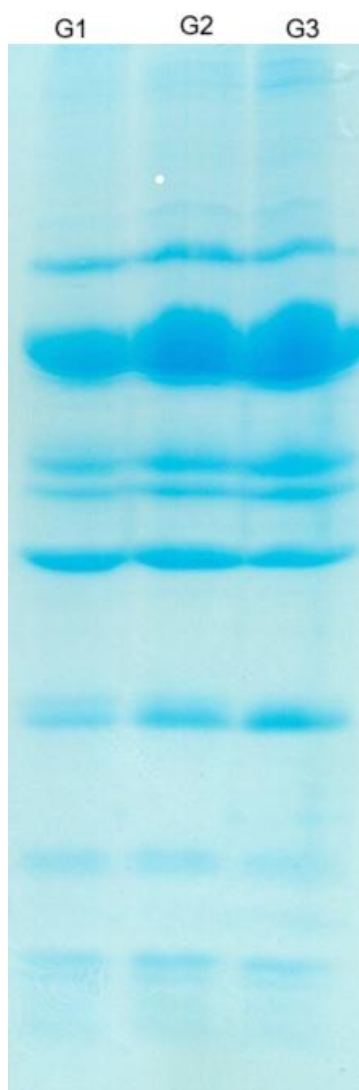


Figura 9. SDS -PAGE a doze por cento (gel de 20cm) de isolados de proteína de grão-de-bico globulina. (G1) Globulina isolada da Farinha do grão inteiro; (G2) globulina isolada da farinha obtida a partir de grãos descascados manualmente, antes do processo de moagem; (G3) globulina isolada da farinha proveniente de

cotilédones de grãos descascados manualmente, após a extração de compostos fenólicos utilizando solução de acetona 70% (v/v).

Fonte: a autora (2025).

As três amostras analisadas G1, G2 e G3 apresentam novamente um padrão de bandas altamente semelhante (Figura 9), confirmando a reprodutibilidade e uniformidade da composição proteica extraída, independentemente da dimensão do gel. Essa semelhança reforça que a resolução obtida com o gel de 10 cm é adequada para a caracterização das globulinas.

Uma vez que estudos demonstram que a presença de compostos fenólicos podem promover ligações cruzadas com as proteínas e reduzir sua solubilidade, por dificultar a ação das enzimas digestivas (Santos-Hernández *et al.*, 2020), cada uma das três globulinas isoladas foi submetida ao protocolo de digestão simulada *in vitro* para observação do efeito desse processo de redução dos fenólicos tanto no potencial de hidrólise como nas bioatividades estudadas.

A Figura 10 ilustra o grau de hidrólise das três globulinas em função das etapas do protocolo INFOGEST.

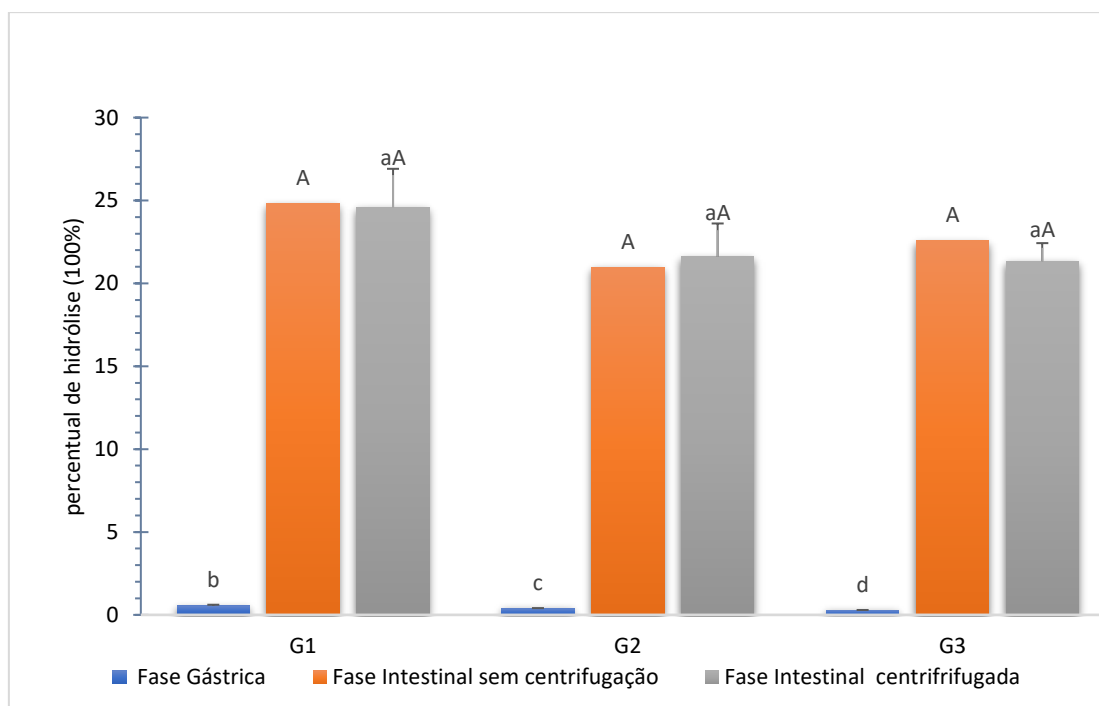


Figura 10 – Percentual de hidrólise (100%) das globulinas do grão-de-bico tipo Desi (G1 – globulina total; G2 – globulina obtida após remoção da casca; G3 –

globulina submetida à extração adicional de compostos fenólicos com acetona 70%) ao longo das diferentes etapas do protocolo INFOGEST (fase gástrica, fase intestinal sem centrifugação e fase intestinal centrifugada). Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três repetições. Letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatisticamente significativa entre as amostras entre as etapas de digestão (minúsculas) e entre as amostras da fase intestinal (maiúsculas) com e sem centrifugação ($p < 0,05$).

Fonte: a autora (2025).

Na fase gástrica, observou-se baixo grau de hidrólise para as três globulinas. Esses resultados confirmam a baixa suscetibilidade das globulinas à digestão gástrica, atribuída à sua estrutura compacta e à limitada ação da pepsina sob condições ácidas, conforme amplamente descrito na literatura para proteínas de reserva de leguminosas (Tavano & Neves, 2008; Tan *et al.*, 2022). Embora os valores absolutos sejam reduzidos, a análise estatística indicou pequenas diferenças, porém significativas, entre as amostras ($p < 0,05$), sendo G1 superior a G2, que foi superior a G3.

Em contraste, a fase intestinal promoveu um aumento expressivo e estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na hidrólise de todas as globulinas, evidenciando que a maior extensão da hidrólise ocorreu após a ação das enzimas pancreáticas. Entre as globulinas não houve diferença significativa na fase intestinal, após hidrólise com a pancreatina, o que foi diferente do esperado para as amostras extraídas na ausência de fenólicos, com base nos relatos de que proteínas com menor interação com outros compostos tendem a apresentar maior suscetibilidade à hidrólise gastrointestinal (Yang *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2023).

Ao final dos processos de digestão e interrupção das reações por fervura, as amostras foram centrifugadas, como descrito em Material e Métodos. Porém, estes sobrenadantes foram comparados com seus respectivos sem centrifugar. A comparação revelou valores muito próximos para todas as amostras, sem diferenças estatisticamente significativas entre as formas de hidrolisados ($p > 0,05$). Esse resultado indica que a centrifugação não alterou substancialmente a concentração de grupos α -amino (Figura 10), sugerindo que a maior parte dos

peptídeos gerados durante a digestão intestinal permaneceu solúvel. Esse comportamento reforça que, mesmo sem atingir 100% de hidrólise, os fragmentos peptídicos formados apresentaram elevada solubilidade, característica associada à redução do tamanho molecular e à exposição de resíduos hidrofílicos ao longo da digestão enzimática. A elevada solubilidade dos peptídeos é um aspecto relevante do ponto de vista nutricional e funcional, uma vez que favorece a absorção intestinal e o potencial bioativo e de aplicação desses fragmentos (Liu *et al.*, 2023; Gao *et al.*, 2024).

A análise eletroforética das frações de globulina (G1, G2 e G3) submetidas ao protocolo INFOGEST permitiu avaliar visualmente as alterações no perfil proteico ao longo das fases gástrica e intestinal da digestão *in vitro*.

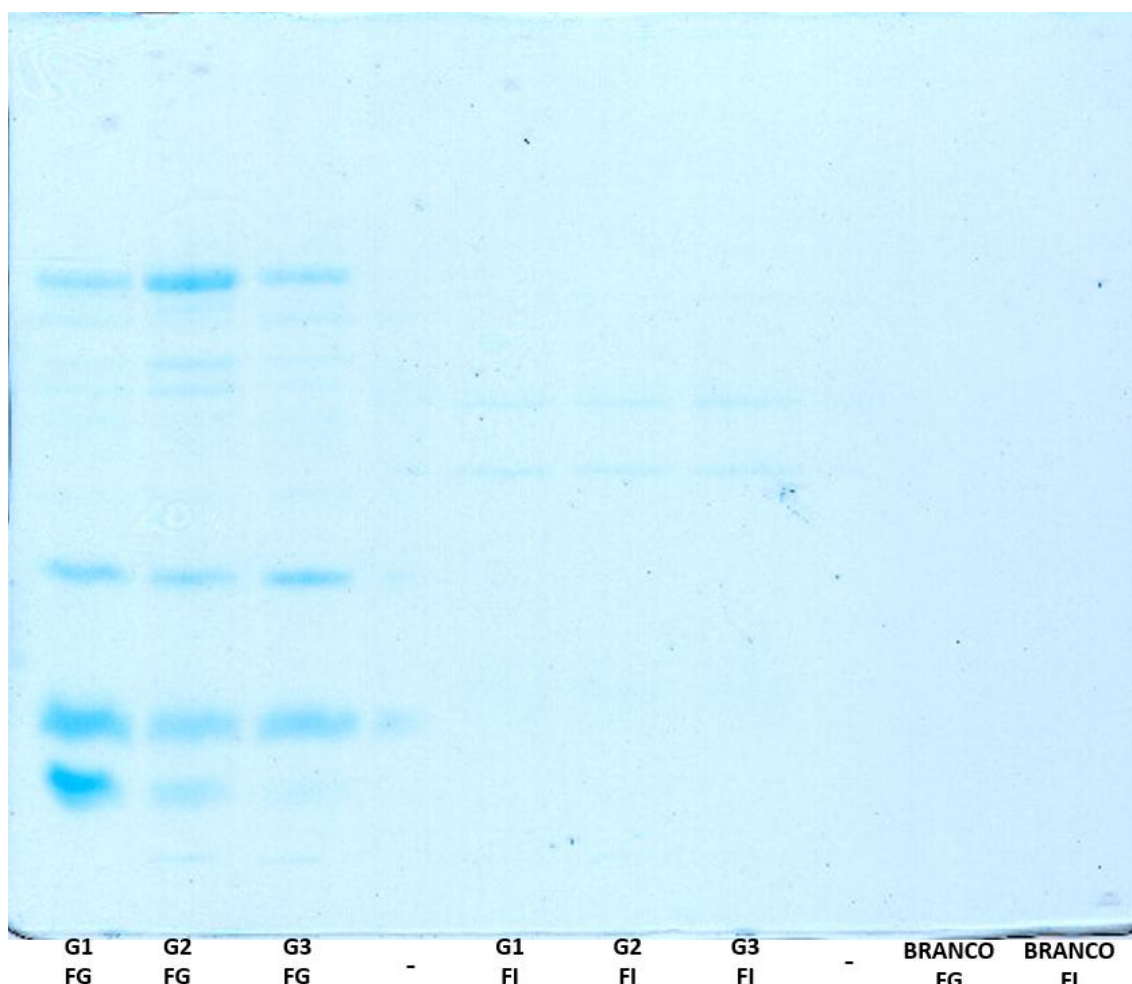


Figura 11. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das frações de globulinas do grão-de-bico (G1: globulina total; G2: globulina sem casca; G3: globulina sem casca com remoção de fenólicos) submetidas ao protocolo *in vitro* de digestão gastrointestinal INFOGEST. As amostras foram coletadas após a fase gástrica

com pepsina (FG) e após a fase intestinal com pancreatina (FI). “Branco FG” e “Branco FI” correspondem aos controles sem adição de proteínas, apenas com as enzimas respectivas.

Fonte: a autora (2025).

Conforme observado no gel (Figura 11), durante a fase gástrica observou-se a manutenção da maioria das bandas de alta massa molecular em todas as amostras analisadas, indicando limitada degradação proteolítica nessa etapa. Esse comportamento confirma a reconhecida resistência das globulinas à digestão gástrica, atribuída à sua estrutura compacta e à baixa acessibilidade dos sítios de clivagem sob condições ácidas (Tavano; Neves, 2008; Tan *et al.*, 2022). Estudos que empregaram SDS-PAGE para monitorar a digestão *in vitro* de proteínas de leguminosas também relataram alterações pouco expressivas no perfil eletroforético após a fase gástrica, reforçando a baixa eficiência da pepsina na hidrólise dessas proteínas (Minekus *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2023).

Observa-se, nas três primeiras colunas correspondentes à fase gástrica (FG), a presença de bandas na região de menor peso molecular, destacando-se uma banda mais intensa em G1, com redução de intensidade em G2 e ausência aparente em G3. Esse padrão sugere que, durante a digestão gástrica, a globulina total (G1) apresentou maior suscetibilidade à ação da pepsina, favorecendo a formação de estruturas proteicas de menor massa molecular. A menor intensidade observada em G2 e o desaparecimento dessa banda em G3 indicam que as condições associadas à remoção do tegumento e à extração prévia de compostos fenólicos podem ter influenciado a disponibilidade ou a exposição dos sítios de clivagem enzimática, resultando em menor formação ou maior degradação desses fragmentos específicos. Esses achados qualitativos corroboram os dados quantitativos, nos quais foi observada diferença estatisticamente significativa entre as amostras G1, G2 e G3 na fase gástrica, reforçando que os tratamentos aplicados às matrizes influenciaram o perfil de hidrólise proteica.

Com a progressão para a fase intestinal, caracterizada pela ação da pancreatina, observou-se redução significativa da intensidade das bandas de alta massa molecular, acompanhada do surgimento de bandas menos intensas

em regiões de menor peso molecular ou do desaparecimento quase completo das bandas originais. Esse padrão eletroforético indica a ocorrência de hidrólise proteica mais intensa durante a digestão intestinal, resultado da ação combinada de enzimas pancreáticas como tripsina e quimotripsina, as quais apresentam maior afinidade por proteínas globulares previamente desnaturadas ou parcialmente expostas durante a fase gástrica (Minekus *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2022).

Esse resultado está em concordância com os dados quantitativos de liberação de grupos α -amino e equivalentes de leucina, que indicaram maior grau de hidrólise para essa fase. Com o gel de 12%, ainda é possível observar-se algumas bandas (Figura 11), o que demonstra que os hidrolisados contam com peptídeos resistentes à digestão

A persistência de bandas observadas após a exposição das amostras à pancreatina pode indicar a formação de fragmentos peptídicos relativamente resistentes à proteólise pancreática, o que não implica necessariamente em completa degradação enzimática, mas sim na geração de peptídeos de maior estabilidade frente às enzimas digestivas, os quais têm sido associados, na literatura, a potenciais atividades biológicas benéficas. De fato, estudos de digestão gastrointestinal *in vitro* mostram que determinadas sequências peptídicas liberadas após a ação de pepsina e enzimas pancreáticas podem resistir à degradação enzimática e manter a integridade suficiente para exercer atividades fisiológicas, como inibição de enzimas digestivas, atividade antioxidante e efeitos anti-inflamatórios em modelos celulares (Tsugami *et al.*, 2018; Adjonu *et al.*, 2022).

Por exemplo, foi demonstrado que hidrolisados pancreáticos de proteínas do soro de leite apresentam peptídeos com propriedades antioxidantes e mitogênicas que são mantidas mesmo após digestão pancreática simulada, evidenciando que fragmentos relativamente resistentes podem atuar sobre vias celulares relevantes para a saúde (Adjonu *et al.*, 2022). Além disso, frações peptídicas com pesos moleculares entre 5–10 kDa, típicas de produtos de digestão pancreática, mostraram capacidade de inibir enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos e assim potencialmente contribuir para efeitos antidiabéticos, o que reforça o valor nutracêutico de peptídeos resistentes à completa proteólise gastrointestinal (Tsugami *et al.*, 2018).

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) constitui um processo natural do metabolismo celular, podendo ser intensificado em condições de inflamação, estresse ambiental ou disfunção mitocondrial (Sies; Jones, 2020). O desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante endógena caracteriza o estresse oxidativo, condição associada a danos estruturais a lipídios, proteínas e DNA, além de contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas, como câncer, enfermidades cardiovasculares, diabetes mellitus e patologias neurodegenerativas (Guo *et al.*, 2014; Torres-Fuentes *et al.*, 2015; Elshafei, 2020). Nesse contexto, cresce o interesse por compostos bioativos capazes de atuar como sequestradores de radicais ou quelantes de metais pró-oxidantes, entre eles peptídeos derivados de leguminosas (Zhang *et al.*, 2018; Rizzo, 2020).

Os resultados obtidos nos ensaios ABTS e FRAP demonstraram que os hidrolisados proteicos apresentaram atividade antioxidante mensurável, com diferenças entre as fases digestivas simuladas, corroborando estudos que indicam o potencial antioxidante de peptídeos derivados da hidrólise de proteínas de leguminosas (Samaei *et al.*, 2020; Wen *et al.*, 2020).

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método ABTS agora considerando-se os hidrolisados das três amostras de globulinas totais, com o objetivo de investigar o efeito das diferentes etapas da digestão gastrointestinal simulada sobre a capacidade de sequestro de radicais livres das globulinas extraídas na presença e ausência dos fenólicos. A figura 12 apresenta resultados obtidos.

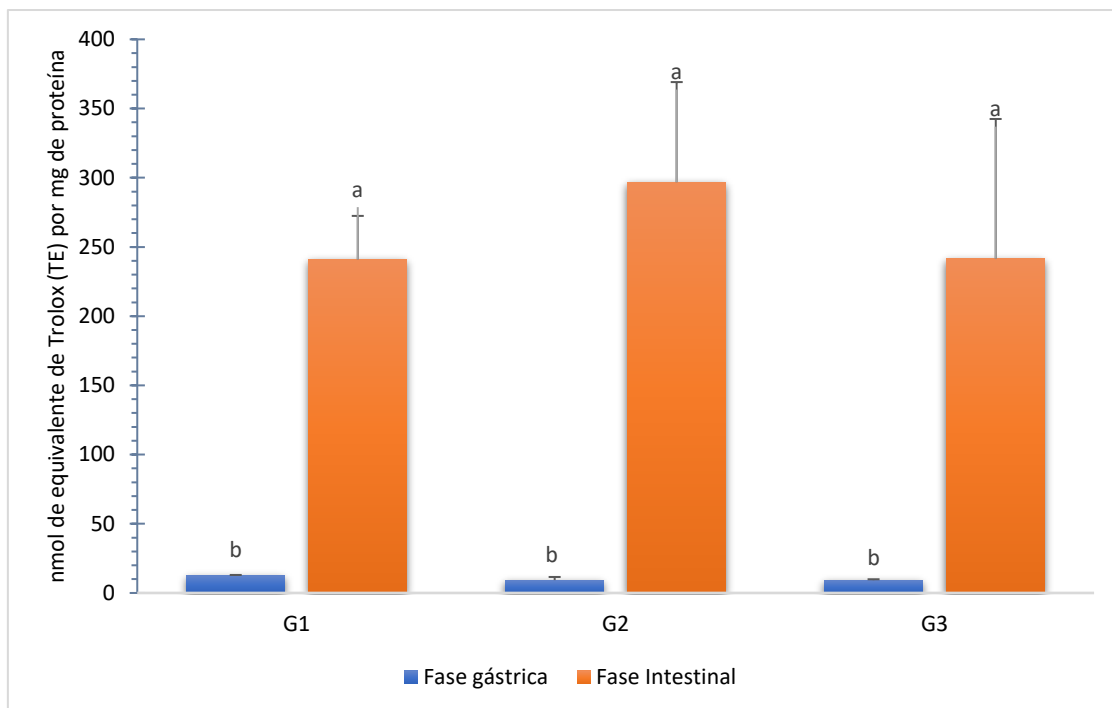


Figura 12. Atividade antioxidante da globulina total isolada de grão-de-bico (cultivar GB capuccinno) após digestão simulada pelo método do INFOGEST e determinada pelo método ABTS. Os dados foram expressos como média \pm desvio-padrão de três repetições, em nmol de equivalente de TROLOX por mg de globulina, para os grupos G1, G2 e G3 (G1: globulina total; G2: globulina sem casca; G3: globulina sem casca com remoção de fenólicos) Letras iguais sobre as barras indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$)

Fonte: a autora (2025).

Os valores médios de capacidade antioxidante determinados pelo método ABTS na fase gástrica variaram entre 9,28 e 12,69 nmol TROLOX (TE)/mg de globulina, enquanto na fase intestinal observou-se um aumento expressivo, com valores entre 241,04 e 296,81 nmol TE/mg de globulina, correspondendo a um incremento superior a 20 vezes entre as fases.

Foi observada ausência de diferença significativa entre os grupos G1, G2 e G3 dentro de cada fase avaliada conforme observado a Figura 12. Esse comportamento está de acordo com estudos que indicam que a hidrólise enzimática no ambiente intestinal favorece a formação de peptídeos de menor peso molecular, estruturalmente mais eficientes na neutralização do radical

ABTS^{•+}, devido à maior mobilidade eletrônica e à capacidade de doação de hidrogênio ou elétrons (Torres-Fuentes *et al.*, 2011; Megías *et al.*, 2007).

Em estudos comparativos, Evangelho *et al.* (2021) relataram aproximadamente 68% de inibição do radical ABTS para hidrolisados de globulina de feijão, enquanto Ngoh e Gan (2016) observaram 53,33% para hidrolisados de soja obtidos com Protamex. Embora expressos em unidades distintas, os resultados do presente estudo indicam elevada capacidade antioxidante, possivelmente relacionada ao perfil peptídico formado durante a digestão intestinal simulada, que pode ter favorecido a liberação de aminoácidos como His, Tyr, Arg e Asp, bem como peptídeos contendo resíduos hidrofóbicos (Gly, Phe e Val), reconhecidos por conferir maior estabilidade ao radical (Ghribi *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2011).

A atividade antioxidante observada na fase intestinal, associada à ausência de diferenças estatísticas entre os grupos, reforça a relevância fisiológica desses peptídeos e indica que todos os hidrolisados avaliados apresentam potencial antioxidante advindo do material proteico dos grãos, independentemente da atividade de seus compostos fenólicos.

Ainda em relação a atividade antioxidante dos hidrolisados, a figura 13 representa os valores obtidos pelo método de FRAP. Na fase gástrica os resultados variaram de 1,29 a 1,61 mmol TE/mg, enquanto após a fase gástrica seguida da fase intestinal os valores aumentaram significativamente, situando-se entre 3,62 e 4,11 mmol TE/mg, novamente evidenciando que a digestão intestinal potencializa a capacidade redutora dos hidrolisados.

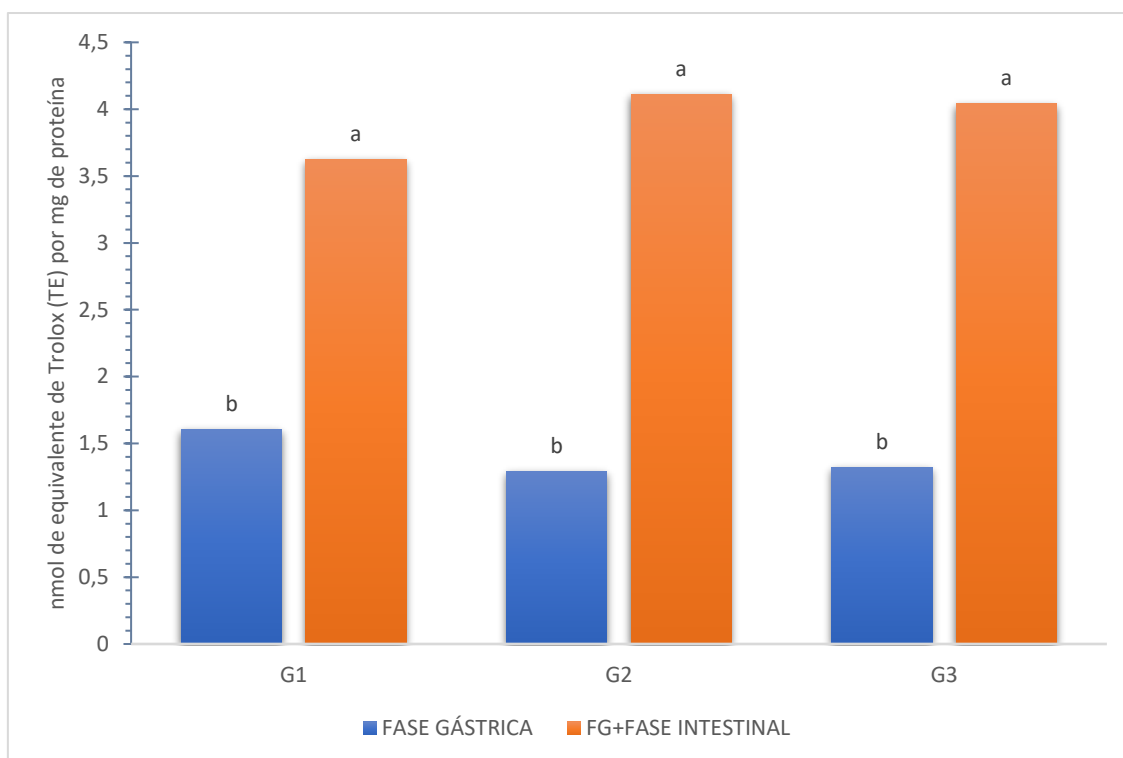


Figura 13 – Capacidade antioxidante determinada pelo método FRAP dos hidrolisados proteicos nas fases gástrica e gástrica seguida da fase intestinal (FG + FI), expressa como média em nmol de equivalente de TROLOX (TE) por mg de proteína, para os grupos G1, G2 e G3 (G1: globulina total; G2: globulina sem casca; G3: globulina sem casca com remoção de fenólicos). Letras iguais sobre as barras indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Fonte: A autora (2025).

As análises estatísticas indicaram ausência de diferença significativa entre os grupos em ambas as fases avaliadas, reforçando a observação do comportamento antioxidante semelhante entre os hidrolisados. Esse incremento da atividade redutora pode ser atribuído à liberação de peptídeos e aminoácidos com maior potencial antioxidante ao longo da digestão intestinal, especialmente Asp, que atua na redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} em função da carga negativa do grupo carboxila (Ghribi *et al.*, 2015), e Arg, reconhecida por seu papel como doador de prótons (Zhang *et al.*, 2011). Adicionalmente, aminoácidos como Ala e Gly contribuem para o aumento da solubilidade e da flexibilidade estrutural dos peptídeos, favorecendo a interação com o complexo férrico.

Resultados semelhantes foram reportados por Piñuel *et al.* (2019) e Santos Aguilar e Soares Castro (2017), que descreveram elevado poder redutor em hidrolisados de grão-de-bico ricos em Asp e Arg. Embora inferiores aos valores observados em hidrolisados purificados de globulina (1323–5185 $\mu\text{mol TE/g}$) descritos por Evangelho *et al.* (2021), os resultados obtidos neste estudo são compatíveis com aqueles provenientes de hidrolisados submetidos à digestão gastrointestinal simulada, condição que representa de forma mais fidedigna o comportamento fisiológico desses peptídeos.

A atividade antioxidante dos hidrolisados foi também verificada com uso de DPPH, porém não foi possível detecção nas condições aqui adotadas.

Tabela 2 – Atividade antioxidante determinada pelo método DPPH dos hidrolisados proteicos obtidos após as fases gástrica e intestinal da digestão gastrointestinal simulada. (G1: globulina total; G2: globulina sem casca; G3: globulina sem casca com remoção de fenólicos). N/D*: atividade antioxidante não detectada nas condições experimentais adotadas.

| Amostra | Atividade antioxidante pelo método DPPH |
|-----------------------------------|---|
| Hidrolisado de fase gástrica G1 | N/D* |
| Hidrolisado de fase intestinal G1 | N/D* |
| Hidrolisado de fase gástrica G2 | N/D* |
| Hidrolisado de fase intestinal G2 | N/D* |
| Hidrolisado de fase gástrica G3 | N/D* |
| Hidrolisado de fase intestinal G3 | N/D* |

Fonte: a autora.

A ausência de atividade detectável no ensaio DPPH não implica ausência de capacidade antioxidante, mas reflete limitações intrínsecas ao método. O radical DPPH• apresenta baixa solubilidade em água e elevada estabilidade estrutural, o que tende a subestimar a atividade de peptídeos hidrofílicos ou de baixo peso molecular (Rizzo, 2020). Assim, a combinação dos métodos ABTS e

FRAP fornece uma avaliação mais abrangente e fisiologicamente relevante da atividade antioxidante.

Além da atividade antioxidante, outras bioatividades foram também testadas. A atividade inibitória da α -glicosidase foi avaliada nos extratos provenientes da fase gástrica e intestinal da digestão *in vitro* (INFOGEST) das globulinas, conforme metodologia descrita por Diniz *et al.*, (2013).

Tabela 3 – Avaliação da atividade inibitória da enzima α -glicosidase dos hidrolisados proteicos obtidos após as fases gástrica e intestinal da digestão gastrointestinal simulada (INFOGEST). (G1: globulina total; G2: globulina sem casca; G3: globulina sem casca com remoção de fenólicos) *Não foi detectada inibição da enzima α -glicosidase nas condições experimentais adotadas.

| Amostra | Atividade inibitória de α -glicosidase |
|-----------------------------------|---|
| Hidrolisado de fase gástrica G1 | N/D* |
| Hidrolisado de fase intestinal G1 | N/D* |
| Hidrolisado de fase gástrica G2 | N/D* |
| Hidrolisado de fase intestinal G2 | N/D* |
| Hidrolisado de fase gástrica G3 | N/D* |
| Hidrolisado de fase intestinal G3 | N/D* |

Fonte: a autora (2025).

Nas condições experimentais empregadas, não foi detectada atividade inibitória significativa da α -glicosidase. A ausência de inibição observada neste estudo contrasta com achados da literatura que relatam atividade inibitória da α -glicosidase em hidrolisados de grão-de-bico, especialmente após processos adicionais como cozimento e ultrafiltração (Mojica *et al.*, 2015; Castañeda-Pérez *et al.*, 2019). Estudos comparativos entre leguminosas demonstram que o grão-de-bico apresenta maior potencial inibitório quando submetido a tratamento térmico, comportamento também observado para feijões e feijão-fradinho, sugerindo que o calor pode promover alterações estruturais nas proteínas, facilitando a liberação de peptídeos bioativos durante a digestão (Mojica *et al.*,

2015; Castañeda-Pérez *et al.*, 2019). Além disso, a ultrafiltração de hidrolisados obtidos por digestão com pepsina-pancreatina tem sido associada ao aumento significativo da capacidade inibitória da α -glicosidase, reforçando a importância do fracionamento por peso molecular para potencializar essa atividade biológica (Mojica *et al.*, 2015; Castañeda-Pérez *et al.*, 2019).

Evidências adicionais indicam que peptídeos de menor peso molecular apresentam maior atividade inibitória tanto para a α -amilase quanto para a α -glucosidase, em razão do aumento da afinidade entre o peptídeo e o sítio ativo da enzima. De acordo com Castañeda-Pérez *et al.* (2019), frações peptídicas de baixo peso molecular apresentam maior capacidade de interação com enzimas digestivas envolvidas no metabolismo de carboidratos, sugerindo que a ausência de fracionamento no presente estudo pode ter limitado a detecção de atividade inibitória.

Um fator relevante considerado foi o efeito da concentração das amostras e portanto do efeito dose-resposta. Dessa forma, os resultados aqui apresentados devem ser interpretados à luz dessas limitações experimentais, não refletindo necessariamente a ausência de potencial bioativo do grão-de-bico GB Cappuccino, mas sim as condições específicas sob as quais o estudo foi conduzido, indicando a necessidade de investigações futuras mais abrangentes para a adequada elucidação do seu potencial. Prova disso foi que, ao se concentrar as amostras ao se adotar o sistema de filtração por membranas de fracionamento por peso molecular, as amostras ao serem novamente testadas para a atividade de inibição da ECA foram todas responsivas, como se apresentará a seguir.

A separação dos peptídeos gerados durante a digestão intestinal (INFOGEST) das globulinas do grão-de-bico cultivar GB Cappuccino permitiu avaliar a distribuição dos grupos α -amino livres entre diferentes faixas de peso molecular, fornecendo informações adicionais sobre a extensão e o padrão da hidrólise proteica, além de fornecer dados sobre suas bioatividades (Figura 14).

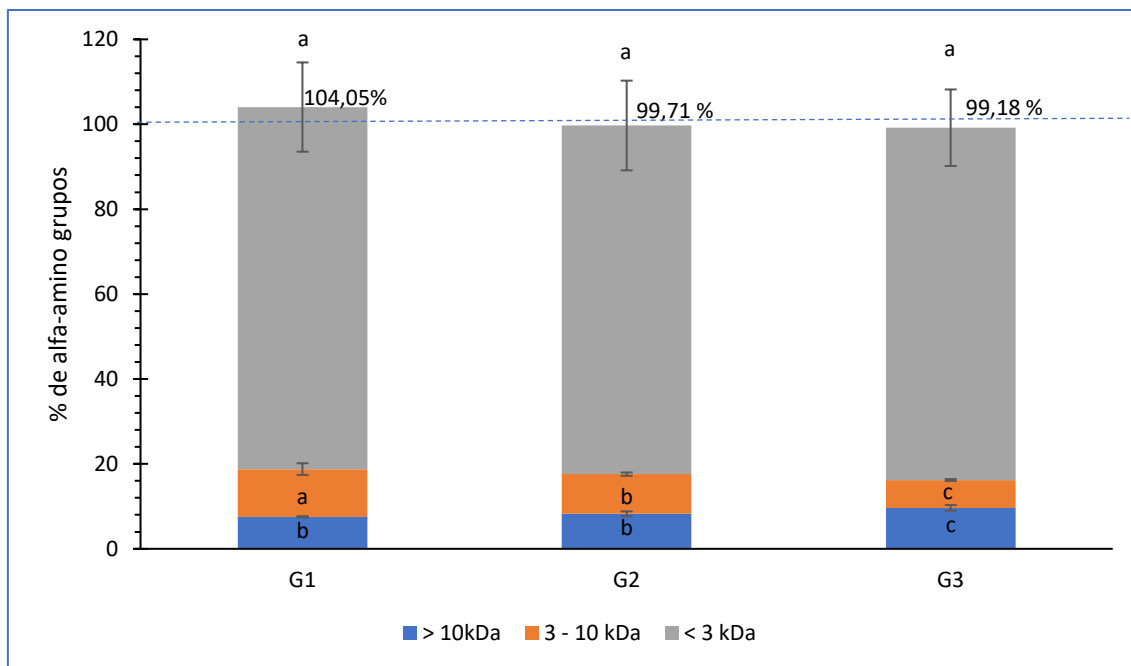


Figura 14 – Percentual de distribuição entre as faixas e taxa de recuperação total (valor sobrescrito) dos fragmentos proteicos gerados após separação por peso molecular. (G1: globulina total; G2: globulina sem casca; G3: globulina sem casca com remoção de fenólicos). Letras iguais sobre as barras indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Fonte: a autora (2025).

A quantificação de grupos α -amino é amplamente empregada como indicador indireto da clivagem de ligações peptídicas e da formação de peptídeos menores ao longo da digestão *in vitro* (Adler-Nissen, 1986; Nielsen *et al.*, 2001), porém pode também fornecer informação sobre o número de fragmentos e aminoácidos livres presentes nas amostras, ao se considerar que cada cadeia proteica, peptídeo ou aminoácido livre apresenta apenas um grupamento alfa amino livre. A análise da distribuição dos grupos α -amino entre as frações de peso molecular revelou um padrão semelhante para todas as amostras, com predominância expressiva da fração < 3 kDa, representando mais de 80 % dos fragmentos presentes nos hidrolisados (Figura 14).

Esse padrão é amplamente reportado para proteínas vegetais submetidas à digestão gastrointestinal simulada, nas quais a ação combinada de endopeptidases e exopeptidases favorece a geração de peptídeos de baixo peso

molecular (Minekus *et al.*, 2014; Picariello *et al.*, 2015). A predominância de grupos α -amino na fração <3 kDa indica que a digestão intestinal promoveu uma hidrólise extensiva das globulinas, resultando majoritariamente na formação de peptídeos pequenos e aminoácidos livres. Peptídeos nessa faixa de peso molecular apresentam maior solubilidade e eficiência de absorção intestinal, além de serem frequentemente associados a atividades biológicas, como propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas (Korhonen & Pihlanto, 2006; Udenigwe & Aluko, 2012).

As frações de maior peso molecular (>10 kDa e 3–10 kDa) apresentaram valores consideravelmente menores de grupos α -amino em comparação à fração <3 kDa, indicando que parte das proteínas ou peptídeos intermediários resistiu à ação das enzimas digestivas. Esse comportamento pode ser atribuído à estrutura altamente organizada das globulinas, caracterizadas por elevado conteúdo de folhas β e interações intermoleculares que dificultam o acesso das proteases a determinados sítios de clivagem (Yang *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2023). Ainda assim, a detecção de grupos α -amino nessas frações sugere a ocorrência de hidrólise parcial, com formação de peptídeos intermediários, conforme descrito para globulinas de outras leguminosas (Tavano & Neves, 2008; Tan *et al.*, 2022).

Observou-se uma significativa, porém pequena variação na detecção do número de fragmentos por faixa de peso molecular entre as amostras das globulinas, considerando-se as faixas de 3-10 kDa e >10 kDa (Figura 14). O material dessas faixas representam cerca de 18% do total de fragmentos detectados nos hidrolisados. Embora a variação entre as amostras e representatividade destas faixas sejam baixas, podem ajudar a explicar as variações encontradas para as atividades de inibição de ECA apresentadas na Figura 15.

Ainda sobre os dados da Figura 14, estes também indicam que a recuperação dos fragmentos das membranas foi eficiente, alcançando-se valores bastante próximos de 100% de recuperação, aqui calculada pela comparação entre o total de alfa amino grupos detectados no hidrolisado antes de ser fracionado (100%) e a somatória dos alfa amino grupos detectados entre as três faixas de peso molecular para a amostra. Porém, a pequena diferença de recuperação entre as faixas de peso molecular podem também ter interferido no

resultado observado.

A atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA), quando testada nos hidrolisados, não pode ser detectada, porém quando a atividade inibitória da ECA dos peptídeos obtidos a partir da fração globulina foi repetida com utilização das amostras fracionadas por peso molecular, os dados revelaram inibição detectável (Tabela 4 e Figura 15), o que indicou um comportamento dependente tanto da concentração quanto do peso molecular das frações peptídicas avaliadas.

A análise de inibição da ECA em função das diferentes faixas de peso molecular dos peptídeos (<3 kDa, 3–10 kDa e >10 kDa), permitiu isolar o efeito do tamanho molecular sobre a bioatividade (Figura 15).

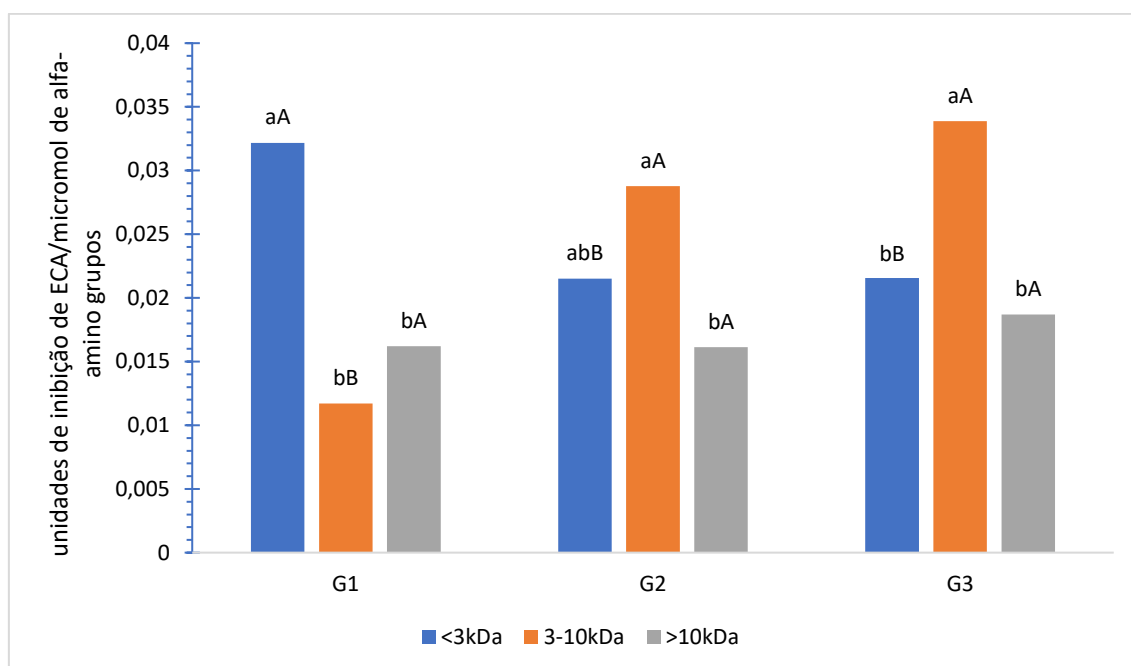


Figura 15 – Inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) em diferentes amostras, de acordo com as faixas de massa molecular dos peptídeos (<3 kDa, 3–10 kDa e >10 kDa), já descontado o branco de enzimas e expressos em unidades de inibição de ECA/micromol de alfa-amino grupos. (G1: globulina total; G2: globulina sem casca; G3: globulina sem casca com remoção de fenólicos). Letras iguais sobre as barras indicam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as frações da mesma amostra (minúsculas) e para uma mesma fração entre as amostras (maiúsculas).

Fonte: a autora (2026).

Os resultados da atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) indicam que o comportamento das frações peptídicas da globulina da cultivar GB Cappuccino varia de acordo com a faixa de massa molecular e com o grupo avaliado (Figura 15), não sendo observado um padrão único de aumento proporcional da inibição com o tamanho dos peptídeos. Quando os dados são expressos em unidades de inibição de ECA por micromol de grupos α -amino, o grupo G1 apresentou maior atividade na fração <3 kDa (0,03218), significativamente superior ($p < 0,05$) às frações de 3–10 kDa (0,01171) e >10 kDa (0,01621), as quais não diferiram entre si. Para o grupo G2, a maior atividade foi observada na fração intermediária de 3–10 kDa (0,02876), diferindo estatisticamente da fração >10 kDa (0,01614), enquanto a fração <3 kDa (0,02151) apresentou comportamento intermediário, não diferindo significativamente das demais. Já no grupo G3, a fração de 3–10 kDa apresentou a maior atividade inibitória (0,03388), significativamente superior às frações <3 kDa (0,02157) e >10 kDa (0,01870), que não diferiram estatisticamente entre si.

Esses resultados demonstram que a maior atividade inibitória da ECA não está necessariamente associada às frações de menor massa molecular, contrariando um padrão frequentemente descrito na literatura. Em vez disso, os dados sugerem que, para a cultivar GB Cappuccino, as frações de 3–10 kDa desempenham papel central na inibição da ECA, especialmente nos grupos G2 e G3, possivelmente em função de sequências peptídicas específicas e de uma combinação favorável entre comprimento da cadeia, composição de aminoácidos e conformação estrutural (Ramlal *et al.*, 2022; Chávez-Ontiveros *et al.*, 2022). Claramente se considerarmos que o total e fragmentos presentes na faixa de fragmentos < 3 kDa, que representam cerca de 8 vezes mais do que o número de fragmentos de outras faixas (Figura 14), os peptídeos desse conjunto serão os maiores responsáveis pela atividade do hidrolisado. Porém não necessariamente apresentam, por unidade, as maiores potências de inibição.

A normalização da atividade pelo número de grupos α -amino reforça a relevância qualitativa das características dessas frações, evidenciando que peptídeos de massa intermediária apresentam elevada eficácia específica e

devem ser melhor estudados. Segundo Figueroa-Salcido *et al.* (2025), peptídeos maiores podem atuar como inibidores não competitivos ou interagir com sítios secundários da ECA, o que pode explicar a elevada atividade observada nas frações de 3–10 kDa. Do ponto de vista fisiológico, essas frações também são promissoras por atuarem como reservatórios de peptídeos bioativos, capazes de serem progressivamente clivados durante a digestão gastrointestinal, prolongando o efeito anti-hipertensivo *in vivo* (GUPTA *et al.*, 2022). Assim, os resultados posicionam as frações peptídicas de 3–10 kDa da globulina da cultivar GB Cappuccino como alvos estratégicos para novos estudos sobre esses fragmentos e seu potencial para o desenvolvimento de ingredientes funcionais com potencial anti-hipertensivo.

Uma vez que os peptídeos da faixa < 3kDa são amplamente citados na literatura como de maior potencial anti-hipertensivo, a determinação do IC₅₀ foi também realizada para esta fração (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de IC₅₀ referentes à inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) pelos peptídeos obtidos da fração globulina do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), cultivar GB Cappuccino (tipo desi), em micromoles de grupos α-amino, determinados a partir das equações de regressão linear. (G1: globulina total; G2: globulina sem casca; G3: globulina sem casca com remoção de fenólicos).

| Amostra | IC50(em micromol de α-amino grupos) |
|-------------------|--|
| G1<3KDa | 122,79 |
| G2<3kDa | 105,07 |
| G3<3kDa | 121,36 |

Fonte: a autora (2026).

A análise complementar dos dados expressos em micromoles de grupos α-amino permitiu uma interpretação mais refinada da potência específica das frações avaliadas. O grupo G2 apresentou o menor valor de IC₅₀ em termos de grupos α-amino (105,07 μmol), seguido por G3 (121,36 μmol) e G1 (122,79 μmol), indicando que uma menor quantidade de terminações peptídicas livres foi necessária para atingir 50% de inibição da ECA (tabela 4). Esse comportamento

sugere maior eficiência estrutural dos peptídeos presentes no grupo G2, possivelmente associada à composição de aminoácidos e à presença de resíduos hidrofóbicos nas extremidades das cadeias peptídicas, favorecendo a interação com o sítio catalítico da enzima e com o íon zinco presente no centro ativo (Ramlal *et al.*, 2022), embora não se tenha observado clara diferença entre o número de fragmentos detectados entre as globulinas para essa faixa de peso molecular (Figura 15). Porém, a diferença entre as outras duas faixas observadas entre as três globulinas sugerem que uma pequena variação no comportamento de liberação dos peptídeos deve haver ocorrido, não sendo os demais métodos deste estudo sensíveis o bastante para detectá-las.

Esses achados reforçam a relevância fisiológica dos peptídeos derivados do grão-de-bico GB Cappuccino e ampliam a perspectiva de aplicação funcional desses compostos em concordância com as observações de outros autores (Chávez-Ontiveros *et al.*, 2022; Figueroa-Salcido *et al.*, 2025).

6 CONCLUSÃO

De forma integrada, os resultados obtidos demonstram que a fração globulina da cultivar GB Cappuccino constitui uma matriz proteica promissora para a geração de peptídeos bioativos após digestão gastrointestinal simulada. A caracterização da fração globulina confirmou sua predominância na composição proteica do grão-de-bico, com perfis compatíveis com globulinas do tipo legumina (11S) e vicilina (7S), evidenciando que a presença de compostos fenólicos não promoveu alterações estruturais detectáveis na proteína intacta.

A digestão simulada *in vitro* demonstrou elevada suscetibilidade da fração globulina à ação das enzimas digestivas, resultando em hidrólise eficiente e na liberação de peptídeos de diferentes faixas de peso molecular ao longo do processo digestivo. A análise eletroforética evidenciou diferenças no padrão de bandas durante a fase gástrica entre os tratamentos avaliados, com variações na intensidade e presença de fragmentos de menor peso molecular, indicando que os compostos fenólicos influenciaram o processo de digestão proteica. Esses achados qualitativos foram corroborados pelos dados quantitativos, nos quais se observaram diferenças estatisticamente significativas entre G1, G2 e G3 na fase gástrica, confirmando que os fenólicos exerceram efeito relevante na

dinâmica de hidrólise enzimática.

Os hidrolisados obtidos apresentaram bioatividades relevantes, com destaque para a atividade antioxidante e a consistente capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). A análise das frações peptídicas indicou comportamento diferenciado em função do peso molecular, especialmente em relação à inibição da ECA; entretanto, a similaridade dos valores de IC_{50} entre os grupos avaliados sugere manutenção do potencial bioativo global.

De modo geral, os resultados reforçam que a cultivar GB Cappuccino representa uma fonte proteica de elevada qualidade nutricional e com potencial funcional significativo. A liberação de peptídeos com atividade antioxidante e anti-hipertensiva evidencia sua relevância como ingrediente com potencial aplicação nutracêutica. Assim, o consumo de grão-de-bico, especialmente de cultivares com características diferenciadas como a GB Cappuccino, pode contribuir para estratégias alimentares voltadas à promoção da saúde, prevenção de doenças crônicas não transmissíveis e, conseqüentemente, para a melhoria da qualidade de vida e da longevidade. Contudo, as variações observadas no comportamento dose-resposta, particularmente para a inibição da ECA, evidenciam a complexidade das interações entre peptídeos e outros componentes da matriz alimentar, apontando para a necessidade de aprofundamento dos estudos para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS

- ADEBIYI, Abayomi P.; ALUKO, Rotimi E. Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 902–908, 15 out. 2011.
- ADJONU, R. *et al.* Bioactive peptides from pancreatin hydrolysates of whey protein support cell proliferation and scavenge reactive oxygen species. **Journal of Functional Foods**, v. 92, p. 105111, 2022.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- AHN, Chang Bum; KIM, Jeong Gyun; JE, Jae Young. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 147, p. 78–83, 2014.
- ALAJAJI, Saleh A.; EL-ADAWY, Tarek A. Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 8, p. 806–812, dez. 2006.
- ALTUN, Gamze Durgun; CETINUS, Senay Akkus. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 964–971, 1 jan. 2007.
- ALUKO, Rotimi E. Polypeptide composition of major oilseed proteins and functional properties of extracted protein products: a concise review. [S. l.: s. n.], 2023.
- APAK, Reşat *et al.* Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 997–1027, 10 fev. 2016.
- AWOSIKA, T. O.; ALUKO, R. E. Inhibition of the in vitro activities of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase by yellow field pea (*Pisum sativum* L.) protein hydrolysates. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 6, p. 2021–2034, 2019.
- BARBANA, Chockry; BOYE, Joyce Irene. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: determination of the kinetics of inhibition. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 94–101, 1 jul. 2011.
- BARTKIENE, Elena *et al.* Changes in the free amino acids and the biogenic amine contents during lactic acid fermentation of different lupin species. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 2049–2056, 1 set. 2016.

BENZIE, Iris F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: the FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 15 jul. 1996.

BOHN, T. *et al.* Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion: what can we predict with static in vitro digestion models? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2 set. 2018.

BORIM, Lara Campos *et al.* Globulins from a new Brazilian chickpea cultivar GB Cappuccino: insights into compositional, digestibility, and bio-functional potential of their hydrolysates. **Macromol**, Basel, v. 6, n. 1, e11, 2026.

BOSCHIN, Giovanna *et al.* ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. **Food Chemistry**, v. 145, p. 34–40, 2014.

BOUGATEF, Ali *et al.* Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 559–565, 1 fev. 2010.

BOUKID, Fatma *et al.* Pulses for bread fortification: a necessity or a choice? **Trends in Food Science and Technology**, 1 jun. 2019.

BOUKID, Fatma. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein as a prospective plant-based ingredient: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, 1 nov. 2021.

BRODKORB, André *et al.* INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 1 abr. 2019.

CASTAÑEDA-PÉREZ, E. *et al.* Pepsin-pancreatin hydrolysates from common bean proteins: ultrafiltration improves bioactivity related to type 2 diabetes. **Food Research International**, v. 121, p. 240–249, 2019.

CASTAÑEDA-VALBUENA, Daniel *et al.* Biological activities of peptides obtained by pepsin hydrolysis of fishery products. **Process Biochemistry**, v. 120, p. 53–63, 1 set. 2022.

CHAKRABARTI, Subhadeep; GUHA, Snigdha; MAJUMDER, Kaustav. Food-derived bioactive peptides in human health: challenges and opportunities. **Nutrients**, 12 nov. 2018.

CHANDRASEKARAN, M. *et al.* In silico and in vitro analysis of bioactive peptides from chickpea (*Cicer arietinum*) proteins with antidiabetic potential. **Food Chemistry**, v. 327, 127082, 2020.

CHANG, Yu Wei *et al.* Characterization of protein fractions from chickpea (*Cicer arietinum* L.) and oat (*Avena sativa* L.) seeds using proteomic techniques. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 3094–3104, nov. 2011.

- CHANG, Yu Wei *et al.* Isolation and characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed protein fractions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 618–625, fev. 2012.
- CHANPHAI, P.; BEKALE, L.; TAJMIR-RIAHI, H. A. Effect of hydrophobicity on protein–protein interactions. **European Polymer Journal**, v. 67, p. 224–231, 1 jun. 2015.
- CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S.; SALUNKHE, D. K. Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 107–158, 1987.
- CHÁVEZ-ONTIVEROS, J. *et al.* Extrusion improves the antihypertensive potential of a kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysate. **Foods**, Basel, v. 11, n. 17, p. 2562, 2022.
- CHURCH, Frank C. *et al.* Spectrophotometric assay using o-Phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 6, p. 1219–1227, 1983.
- CUI, Leqi *et al.* Functionality and structure of yellow pea protein isolate as affected by cultivars and extraction pH. **Food Hydrocolloids**, v. 108, p. 106008, 1 nov. 2020.
- DEL MAR YUST, María *et al.* Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 9, p. 1994–2001, jul. 2012.
- DHAWAN, Kamal *et al.* Seed protein fractions and amino acid composition in gram (*Cicer arietinum*). [S. l.: s. n., s. d.].
- DINIZ, Juliana Alves *et al.* Chemical composition of 20 Brazilian desi and kabuli chickpea genotypes: the contributions of type and seed coats to antioxidant properties. **Journal of Food Legumes**, v. 38, n. 2, p. 246–254, 22 jul. 2025.
- DURANTI, Marcello. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, v. 77, n. 2, p. 67–82, 1 fev. 2006.
- ELIAS, Ryan J.; KELLERBY, Sarah S.; DECKER, Eric A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430–441, maio 2008.
- ELSHAFEI, A. M. Bioactive peptides from food proteins and their health benefits. **Journal of Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 2, p. 45–58, 2020.
- ERDMANN, Kati; CHEUNG, Belinda W. Y.; SCHRÖDER, Henning. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, out. 2008.

ESPINOSA-RAMÍREZ, Johanan; SERNA-SALDÍVAR, Sergio O. Wet-milled chickpea coproduct as an alternative to obtain protein isolates. **LWT**, v. 115, 1 nov. 2019.

EVANGELHO, J. A. *et al.* Atividade antioxidante e inibitória da enzima conversora de angiotensina de hidrolisados proteicos de globulina vegetal. **Food Chemistry**, v. 352, p. 129–137, 2021.

FAO. **Dietary protein quality evaluation in human nutrition**: report of an FAO Expert Consultation. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. (FAO Food and Nutrition Paper, 92).

FAO; WHO. **Dietary protein quality evaluation in human nutrition**. Report of 593 and FAO Expert Consultation. *FAO Food Nutr. Pap.* **2013**, 92, 67.

FAO. **World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2020**. Rome: FAO, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cb1329en>. Acesso em: 26 jul. 2025.

FERNANDEZ-OROZCO, Rebeca *et al.* Evaluation of bioprocesses to improve the antioxidant properties of chickpeas. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 4, p. 885–892, 1 maio 2009.

FIGUEROA-SALCIDO, O. G.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M. M. Chickpea-derived peptides as angiotensin-converting enzyme inhibitors and modulators of the ACE2/Mas receptor axis. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 430, p. 137138, 2025.

GAO, J. *et al.* Chemical composition and nutritional evaluation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, Amsterdam, v. 114, p. 104–112, 2025.

GHRIBI, A. M. *et al.* Antioxidant activity of chickpea protein hydrolysates produced by gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 182, p. 134–140, 2015.

GHRIBI, Abir Mokni *et al.* Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 516–525, 1 jan. 2015.

GLUSAC, Jovana; ISASCHAR-OVDAT, Sivan; FISHMAN, Ayelet. Transglutaminase modifies the physical stability and digestibility of chickpea protein-stabilized oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**, v. 315, 15 jun. 2020.

GUO, Y. *et al.* Inhibitory effects of food-derived peptides on α -amylase and α -glucosidase activities. **Food Chemistry**, v. 160, p. 76–82, 2014.

GUPTA, Neha; BHAGYAWANT, Sameer Suresh. Enzymatic treatment improves ACE-I inhibitor and antiproliferative potential of chickpea. **Vegetos**, v. 32, n. 3, p. 363–369, 1 set. 2019.

GUPTA, S.; SINGH, R.; KAUR, A. Dose–response behavior and stability of antihypertensive peptides derived from plant proteins. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 92, p. 105062, 2022.

HAJAM, Y. A. *et al.* Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives. **Cells**, 2022.

HAJFATHALIAN, Mona *et al.* Peptides: production, bioactivity, functionality, and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 12 dez. 2018.

HE, R. *et al.* Antidiabetic properties of food protein-derived bioactive peptides: inhibition of key digestive enzymes. **Food Research International**, v. 140, 109878, 2021.

HEIRAS-PALAZUELOS, Mar J. *et al.* Technological properties, antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of pigmented chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, n. 1, p. 69–76, fev. 2013.

HELENO, Sandrina A. *et al.* Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501–513, 15 abr. 2015.

HIRDYANI, Harsha. Nutritional composition of Chickpea (*Cicer arietinum*-L) and value added products: a review. [S. l.: s. n., s. d.].

HOLMQUIST, Barton; BRUICE, Thomas C. Electrostatic catalysis. II. A comparison of spontaneous and alkaline hydrolytic rate constants for α -substituted o-nitrophenyl esters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 11, p. 2982–2985, 1969.

HU, Xiao Zhong *et al.* Effects of drying method on physicochemical and functional properties of soy protein isolates. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 34, n. 3, p. 520–540, jun. 2010.

HUANG, Dejian; BOXIN, O. U.; PRIOR, Ronald L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 23 mar. 2005.

HUSSEIN, Hend *et al.* Impact of chickpea as prebiotic, antioxidant and thickener agent of stirred bio-yoghurt. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 1, p. 49–58, 1 jun. 2020.

JAKUBCZYK, Anna; BARANIAK, Barbara. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides obtained after in vitro hydrolysis of pea (*Pisum sativum* var. Bajka) globulins. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

JAMDAR, Sahayog N.; DESHPANDE, Rajalakshmi; MARATHE, Sushama A. Effect of processing conditions and in vitro protein digestion on bioactive

potentials of commonly consumed legumes. **Food Bioscience**, v. 20, p. 1–11, 1 dez. 2017.

JAMEEL, Saima; HAMEED, Amjad; SHAH, Tariq Mahmud. Biochemical profiling for antioxidant and therapeutic potential of Pakistani chickpea (*Cicer arietinum* L.) genetic resource. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 663623, 13 abr. 2021.

JUKANTI, A. K. *et al.* Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. S1, p. S11–S26, ago. 2012.

KAMRAN, Fozia *et al.* Antioxidant activities of lupin (*Lupinus angustifolius*) protein hydrolysates and their potential for nutraceutical and functional foods. **Food Chemistry Advances**, v. 2, p. 100297, 1 out. 2023.

KANG, Y. *et al.* Structural changes and digestive behavior of legume proteins during simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 405, p. 134–145, 2023.

KAUR, Karamveer *et al.* Comparison of cultivated and wild chickpea genotypes for nutritional quality and antioxidant potential. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 4, p. 1864–1876, 1 abr. 2019.

KAUR, Ravneet; PRASAD, Kamlesh. Technological, processing and nutritional aspects of chickpea (*Cicer arietinum*): a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 448–463, 1 mar. 2021.

KEREM, Zohar *et al.* Chickpea domestication in the Neolithic Levant through the nutritional perspective. **Journal of Archaeological Science**, v. 34, n. 8, p. 1289–1293, 2007.

KIOSSEOGLU, Vassilis; PARASKEVOPOULOU, Adamantini. Functional and physicochemical properties of pulse proteins. **Pulse Foods: processing, quality and nutraceutical applications**, p. 57–90, 1 jan. 2011.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 7, p. 347–356, 2006.

KOU, Xiaohong *et al.* Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. **LWT**, v. 50, n. 2, p. 591–598, 2013.

LADJAL-ETTOUMI, Yakoub *et al.* Pea, chickpea and lentil protein isolates: physicochemical characterization and emulsifying properties. **Food Biophysics**, v. 11, n. 1, p. 43–51, 1 mar. 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

LAM, A. C. Y. *et al.* Pea protein isolates: structure, extraction, and functionality. **Food Reviews International**, v. 34, n. 2, p. 126–147, 17 fev. 2018.

LÁSZTITY, Radomir *et al.* Protein-lipid and protein-carbohydrate interactions in the gluten complex. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, v. 40, n. 1–2, p. 29–40, 25 fev. 1996.

LI, Yanhong *et al.* Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 444–450, 15 jan. 2008.

LIANG, Han Ni; TANG, Chuan He. PH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 309–319, 2013.

LIU, Y. *et al.* Bioactive peptides with α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities derived from plant proteins. **Food Chemistry**, v. 405, 134814, 2023.

LORENZO, Jose M. *et al.* Bioactive peptides as natural antioxidants in food products: a review. **Trends in Food Science and Technology**, 1 set. 2018.

MALIK, Mudasir Ahmad; SAINI, Charanjiv Singh. Gamma irradiation of alkali extracted protein isolate from dephenolized sunflower meal. **LWT**, v. 84, p. 204–211, 1 out. 2017.

MALUNGA, L. N. *et al.* Effect of processing on protein quality and amino acid profile of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Food Research International**, Amsterdam, v. 63, p. 66–72, 2014.

MEGÍAS, Cristina *et al.* Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 3949–3954, 16 maio 2007.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. **Redox Report**, v. 2, n. 3, p. 161–171, 1996.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food: an international consensus. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MOJICA, L.; CHEN, K.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Impact of commercial precooking of common bean (*Phaseolus vulgaris*) on the generation of peptides after pepsin–pancreatin hydrolysis capable of inhibiting dipeptidyl peptidase-IV. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 1, p. H188–H198, 2015.

MOKNI GHRIBI, Abir *et al.* Toward the enhancement of sensory profile of sausage “Merguez” with chickpea protein concentrate. **Meat Science**, v. 143, p. 74–80, 1 set. 2018.

MOURE, Andrés; DOMÍNGUEZ, Herminia; PARAJÓ, Juan Carlos. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 447–456, 1 fev. 2006.

MUNDI, Sule; ALUKO, Rotimi E. Effects of NaCl and pH on the structural conformations of kidney bean vicilin. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 624–630, 15 ago. 2013.

MURRA, F. M.; PESSATO, T. B.; TAVANO, O. L. Evaluation of in vitro inhibitory activity of digestive enzymes by protein hydrolysates. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 321–327, 2013.

NAGHDI, Shahab *et al.* Bioactivity evaluation of peptide fractions from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) using alcalase and hydrolytic enzymes extracted from. **Food and Bioprocess Technology**, v. 16, n. 5, p. 1128–1148, 1 maio 2023.

NATEGHPOUR, B. *et al.* Amino acid profile of the peel of three citrus species and its effect on the combination of amino acids and fatty acids *Chlorella vulgaris*. **Elsevier**, [s. d.].

NEVES, Valdir A.; SILVA, Maraiza A. da; LOURENÇO, Euclides J. Caracterização e hidrólise in vitro da globulina principal de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), var. IAC-Marrocos. **Food Science and Technology**, v. 24, n. 1, p. 139–145, mar. 2004.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMSGAARD, J. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5444–5450, 2001.

NOSWORTHY, Matthew G.; HOUSE, James D. Factors influencing the quality of dietary proteins: implications for pulses. **Cereal Chemistry**, 1 jan. 2017.

NWACHUKWU, Ifeanyi D.; ALUKO, Rotimi E. Physicochemical and emulsification properties of flaxseed (*Linum usitatissimum*) albumin and globulin fractions. **Food Chemistry**, v. 255, p. 216–225, 30 jul. 2018.

NWACHUKWU, Ifeanyi D.; ALUKO, Rotimi E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. e12761, 1 jan. 2019.

ONDER, S. *et al.* Exploring the amino-acid composition, secondary structure, and physicochemical and functional properties of chickpea protein isolates. **ACS Omega**, Washington, v. 8, n. 2, p. 1486–1495, 2023.

OSEMWOTA, Etinosa C.; ALASHI, Adeola M.; ALUKO, Rotimi E. Physicochemical and functional properties of albumin, globulin and glutelin fractions of green lentil seed. [S. l.: s. n.], 2022.

PANDE, S. *et al.* Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenicity, and disease management. **Australian Journal of Agricultural Research**, 2005.

PAREDES-LÓPEZ, O.; ORDORICA-FALOMIR, C.; OLIVARES-VÁZQUEZ, M. R. Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characterization. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 3, p. 726–729, 1991.

PEREIRA, Marina Pelincer; TAVANO, Olga Luisa. Use of different spices as potential natural antioxidant additives on cooked beans (*Phaseolus vulgaris*): increase of DPPH radical scavenging activity and total phenolic content. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 4, p. 337–343, 9 dez. 2014.

PICARIELLO, G. *et al.* Impact of protein structure and phenolic interactions on legume protein digestibility. **Food Research International**, v. 168, p. 112–120, 2023.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, Anne. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 9–10, p. 347–356, 10 set. 2000.

PIÑUEL, L. *et al.* Bioactive peptides from chickpea protein hydrolysates: antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities. **Food Research International**, v. 120, p. 238–246, 2019.

PRIOR, Ronald L.; WU, Xianli; SCHAICH, Karen. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 18 maio 2005.

QUINTERO-SOTO, Maria F. *et al.* Phenolic profiles and their contribution to the antioxidant activity of selected chickpea genotypes from Mexico and ICRISAT collections. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 122–129, 1 jun. 2018.

RACHWA-ROSIK, Danuta; NEBESNY, Ewa; BUDRYN, Grażyna. Chickpeas—composition, nutritional value, health benefits, application to bread and snacks: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 8, p. 1137–1145, 3 jul. 2015.

RAJAPAKSE, Niranjan *et al.* Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Research International**, v. 38, n. 2, p. 175–182, 1 mar. 2005.

RAMANI, Anusha *et al.* Molecular, functional and nutritional properties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein isolates prepared by modified solubilization methods. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 3, p. 2352–2368, 1 jun. 2021.

RAMLAL, M. *et al.* Interactions between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme: structure–activity relationships. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 119, p. 1–12, 2022.

RE, Roberta *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1 maio 1999.

RESURRECCION, A. P. *et al.* Characterization of poorly digested protein of cooked rice protein bodies. **Cereal Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 101–104, 1993.

RIZZO, G. Bioactive peptides from food proteins: new therapeutic perspectives. **Nutrition and Metabolism**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2020.

SAMAEI, S. P. *et al.* Bioactive peptides: structure, biological function and therapeutic applications. **Food Chemistry**, v. 316, 126344, 2020.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). **Food Chemistry**, 2008.

SANTOS AGUILAR, J. G.; SOARES CASTRO, R. J. Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of chickpea protein hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, n. 3, e12344, 2017.

SANTOS-HERNÁNDEZ, Marta *et al.* Compared digestibility of plant protein isolates by using the INFOGEST digestion protocol. **Food Research International**, v. 137, 1 nov. 2020.

SCHIEBER, Michael; CHANDEL, Navdeep S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, 19 maio 2014.

SECZYK, Lukasz *et al.* Protein–phenolic interactions as a factor affecting the physicochemical properties of white bean proteins. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 408, 23 jan. 2019.

SEGEV, Aharon *et al.* Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in colored chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Journal of Food Science**, v. 75, n. 2, p. S115–S119, 1 mar. 2010.

SHARIF, Hafiz Rizwan *et al.* Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants: a review. **Food Hydrocolloids**, v. 76, p. 2–16, 1 mar. 2018.

SHEN, Penghui *et al.* Molecular, interfacial and foaming properties of pulse proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 156, p. 110313, 1 nov. 2024.

SHERIFF, Sheik Abdulazeez *et al.* Synthesis and in vitro antioxidant functions of protein hydrolysate from backbones of *Rastrelliger kanagurta* by proteolytic

enzymes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 19–26, 1 jan. 2014.

SHEVKANI, Khetan *et al.* Pulse proteins: secondary structure, functionality and applications. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 6, p. 2787–2798, 1 jun. 2019.

SHI, Wen *et al.* Evaluation of hypolipidemic peptide (Val-Phe-Val-Arg-Asn) virtual screened from chickpea peptides by pharmacophore model in high-fat diet-induced obese rat. **Journal of Functional Foods**, v. 54, p. 136–145, 1 mar. 2019.

SHIAO, Wei Cheng *et al.* Physicochemical and antioxidant properties of gelatin and gelatin hydrolysates obtained from extrusion-pretreated fish (*Oreochromis* sp.) scales. **Marine Drugs**, v. 19, n. 5, p. 275, 14 maio 2021.

SIES, Helmut. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 1 abr. 2015.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, p. 363–383, 2020.

SIMIONI, Carolina *et al.* Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. **Oncotarget**, v. 9, n. 24, p. 17181, 30 mar. 2018.

SINGH, Dev K. *et al.* Amino acid composition of storage proteins of a promising chickpea (*Cicer arietinum* L) cultivar. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 43, n. 4, p. 373–379, 1 jan. 1988.

SINGH, Gagan Deep *et al.* Characterisation and functional properties of proteins of some Indian chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 5, p. 778–786, abr. 2008.

SOFI, Sajad Ahmad *et al.* Quality characterization of gluten free noodles enriched with chickpea protein isolate. **Food Bioscience**, v. 36, 1 ago. 2020.

SONKLIN, Chanikan; LAOHAKUNJIT, Natta; KERDCHOECHUEN, Orapin. Assessment of antioxidant properties of membrane ultrafiltration peptides from mungbean meal protein hydrolysates. **PeerJ**, v. 2018, n. 7, p. e5337, 27 jul. 2018.

SYARMILA, Etty *et al.* Effect of enzymatic hydrolysis of pancreatin and alcalase enzyme on some properties of edible bird's nest hydrolysate. **AIP Conference Proceedings**, v. 1614, p. 427–432, 2014.

TAHERIAN, Ali R. *et al.* Comparative study of functional properties of commercial and membrane processed yellow pea protein isolates. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2505–2514, out. 2011.

TAN, S. *et al.* Digestibility and structural characteristics of legume storage proteins under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1421–1432, 2022.

TANG, Sen *et al.* Predicting protein surface property with its surface hydrophobicity. **Protein & Peptide Letters**, v. 28, n. 8, p. 938–944, 23 fev. 2021.

TAVANO, O. L.; DA SILVA, S. I.; NEVES, V. A. Digestibility and amino acid profile of chickpea protein fractions. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 202, p. 86–93, 2016.

TAVANO, Olga Luisa; NEVES, Valdir Augusto. Isolation, solubility and *in vitro* hydrolysis of chickpea vicilin-like protein. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 1244–1251, 1 set. 2008.

TAVANO, Olga Luisa. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 1 jun. 2013.

TAWALBEH, Deia *et al.* Recent advances in *in vitro* and *in vivo* studies of antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory peptides from legume protein hydrolysates. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2423, 2023.

TAWALBEH, D. *et al.* Sensitivity limits and concentration-dependent effects in ACE inhibitory peptide assays. **Journal of Food Biochemistry**, Hoboken, v. 49, e14652, 2025.

TORRES-FUENTES, Cristina *et al.* Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 180, p. 194–202, 1 ago. 2015.

TORRES-FUENTES, Cristina; ALAIZ, Manuel; VIOQUE, Javier. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 485–490, 15 nov. 2011.

TORRES-FUENTES, Cristina; ALAIZ, Manuel; VIOQUE, Javier. Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1585–1588, 1 out. 2012.

TRIGUEROS, Lorena; WOJDYŁO, Aneta; SENDRA, Esther. Antioxidant activity and protein-polyphenol interactions in a pomegranate (*Punica granatum* L.) yogurt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 27, p. 6417–6425, 9 jul. 2014.

TSOPMO, Apollinaire *et al.* Novel anti-oxidative peptides from enzymatic digestion of human milk. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1138–1143, 1 jun. 2011.

TSUGAMI, M. *et al.* Peptides from gastrointestinal digestion of germinated soy proteins exhibit anti-diabetic properties via inhibition of DPP-IV, α -amylase and α -glucosidase. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 2883, 2018.

ULUG, Sule Keskin; JAHANDIDEH, Forough; WU, Jianping. Novel technologies for the production of bioactive peptides. **Trends in Food Science and Technology**, 1 fev. 2021.

VAN WYK, Rudean Hilary; AMONSOU, Eric Oscar. Physicochemical and functional properties of albumin and globulin from amadumbe (*Colocasia esculenta*) corms. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e02621, 20 ago. 2021.

VERMEIRSEN, Vanessa; CAMP, John Van; VERSTRAETE, Willy. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 357–366, 9 set. 2004.

WADA, Yasuaki; LÖNNERDAL, Bo. Bioactive peptides derived from human milk proteins — mechanisms of action. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 503–514, 1 maio 2014.

WANG, Shi; CHELIKANI, Venkata; SERVENTI, Luca. Evaluation of chickpea as alternative to soy in plant-based beverages, fresh and fermented. **LWT**, v. 97, p. 570–572, 1 nov. 2018.

WANG, Yuntao *et al.* Effect of high intensity ultrasound on physicochemical, interfacial and gel properties of chickpea protein isolate. **LWT**, v. 129, 1 jul. 2020.

WANG, Zhengxuan *et al.* Glutelin and prolamin, different components of rice protein, exert differently in vitro antioxidant activities. **Journal of Cereal Science**, v. 72, p. 108–116, 1 nov. 2016.

WEN, L. *et al.* Release of bioactive peptides during gastrointestinal digestion and their biological activities. **Food & Function**, v. 11, p. 635–645, 2020.

XIAO, Y. *et al.* Chemical composition of kabuli and desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars grown in Xinjiang, China. **Food Science & Nutrition**, Hoboken, v. 10, n. 1, p. 237–249, 2022.

XING, Qinhuai *et al.* Enhanced nutritional value of chickpea protein concentrate by dry separation and solid state fermentation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 59, 1 jan. 2020.

YANG, J. *et al.* Relationship between secondary structure and in vitro digestibility of legume proteins. **Food Chemistry**, v. 196, p. 558–565, 2016.

YUST, Marí M. *et al.* **Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase.** [S. l.: s. n., s. d.].

YUST, María del Mar *et al.* Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1212–1217, 15 out. 2010.

ZHANG, Ming Wei *et al.* Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7580–7587, 14 jul. 2010.

ZHU, Lijuan *et al.* Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2714–2721, 23 abr. 2008.