

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS ISOLADAS  
DE GRÃOS PARA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS  
BIOATIVOS *IN VITRO***

Aluna: Danielle Maria Fernandes do Prado

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Buranelo Egea

Rio Verde - GO  
Fevereiro - 2017

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS ISOLADAS  
DE GRÃOS PARA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS  
BIOATIVOS *IN VITRO***

Aluna: Danielle Maria Fernandes do Prado

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Buranelo Egea

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, Agroquímica Orgânica.

Rio Verde - GO  
Fevereiro - 2017

Prado, Danielle Maria Fernandes

P896h Hidrólise enzimática de proteínas isoladas de grãos para produção de peptídeos bioativos *in vitro* / Danielle Maria Fernandes do Prado. -- Rio Verde.-- 2016.  
89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano –  
Campus Rio Verde, 2016.  
Orientador: Dr. Mariana Buranelo Egea.

Bibliografia

1. Extração protéica. 2. Atividade antioxidante. 3. Enzimas proteolíticas. 4. Biofuncional. **I. Título. II. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.**

CDD: 641.12

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS  
ISOLADAS DE GRÃOS PARA PRODUÇÃO DE  
PEPTÍDEOS BIOATIVOS *in vitro***

Autora: Danielle Maria Fernandes do Prado  
Orientador: Mariana Buranelo Egea

*TITULAÇÃO*: Mestre em Agroquímica – Área de concentração  
Agroquímica.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2017.



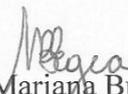
Prof. Dr. Ailton César Lemes  
*Avaliador externo*  
Universidade do Minho -  
Portugal



Prof. Dr. Celso Martins Belisário  
*Avaliador externo*  
IF Goiano/RV



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cassia Cristina Fernandes  
Alves  
*Avaliadora interna*  
IF Goiano/RV



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Buranelo Egea  
*Presidente da banca*  
IF Goiano/RV

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de aprender a viver a cada dia, por me dar sabedoria, paciência e coragem todas as manhãs.

À minha família, pelo apoio, carinho e compreensão por tantos momentos de altos e baixos. Em especial a minha amada mãe Marly, que tanto orou por mim e acreditou que eu poderia alcançar mais esse objetivo. Pelas conversas e carinho que mesmo fisicamente distante, sentia sua presença constantemente.

Aos meus amigos por tantos dias ausentes, mas que sempre me compreenderam e sempre me deram forças para continuar.

Ao meu companheiro Diogo, por estar ao meu lado, por me fazer distrair nos dias tensos e alegrar meus dias.

Aos meus orientadores Mariana Buranelo Egea, Ailton Cesar Lemes e Jeferson Aparecido Moreto, por serem meus guias nesses dois anos, por me fazerem crescer pessoalmente e profissionalmente.

À minha família do mestrado, tantas pessoas especiais que me ajudaram ao longo dessa jornada. Família essa, que me fortaleceu e fez com que eu persistisse no meu objetivo. Em especial ao João Pedro e Daniela Macedo (irmãos de coração), que me fizeram acreditar que existe um sol na manhã seguinte, que nossos problemas têm solução e que se estamos nesse caminho é porque Deus tem um plano para nossas vidas. À Tainara, Anna Carolina, Vanessa (irmã científica), Elisângela, Dêmily; Thamara, Rafaiane (irmã científica) e Keyla, pelas conversas e horas de trabalho no laboratório, pela força, incentivo e amizade.

Às minhas ICs Adrielle e Anna Karoline, que caminharam comigo durante um ano, pelos momentos de aprendizado e risadas. E também à Thayanara, pelo apoio e contribuição nos experimentos e amizade.

Aos laboratórios do IFGoiano, que estiveram de portas abertas para a realização dos experimentos: Laboratório de Físico-Química do Leite, Cereais, Química Geral, Origem animal, Biotecnologia, Solos, Nutrição Animal, QUITEC, QUIMERA, Ecofisiologia e produtividade vegetal e em especial o Laboratório de Produtos Naturais, onde fui acolhida pela professora Cássia, e fiz meu cantinho para realização da maior parte dos experimentos.

Aos cães de guarda (Pretinha, Rajadinho e Cirius Black), que me acompanharam durante o mestrado me distraíndo nos dias difíceis e acompanhando até em casa todos os dias.

Aos professores e coordenadores do Mestrado em Agroquímica, pelo incentivo e dedicação para o aprimoramento dos conhecimentos, proporcionando novas visões, criticidade e crescimento intelectual.

À Assistência Estudantil do IFGoiano, por conceder o auxílio alimentação durante um ano. Uma imensa ajuda nas horas de aperto.

Ao IFGoiano, pela oportunidade de desenvolver um projeto de pesquisa de que tenho maior orgulho. E poder mostrar em vários eventos o fruto do trabalho desenvolvido na instituição.

À CAPES, pela bolsa de mestrado e incentivo, pois sem ela não conseguiria desenvolver e finalizar a pesquisa.

À empresa CARAMURU, por gentilmente doar as amostras para o experimento.

À cidade de Rio Verde, por ter me proporcionado mudança de vida ao longo dos dias, pelas grandes conquistas e oportunidade de crescimento pessoal.

## BIOGRAFIA DA AUTORA

DANIELLE MARIA FERNANDES DO PRADO, filha de Marly Fernandes e João Carlos Neto do Prado, nasceu dia 04 de março de 1988, na cidade de Itauçu, Goiás

Em agosto de 2005, ingressou no curso de Licenciatura em Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás - Campus Inhumas - Goiás, graduando-se em setembro de 2011. Durante a graduação, foi bolsista pelo CNPq, por dois anos na área de química teórica e bolsista pelo IFG como monitora de física superior.

Em março de 2015, iniciou no Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, sob a orientação da Professora Dr.<sup>a</sup> Mariana Buranelo Egea.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....</b>	<b>XIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XIV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Grãos: girassol, milho e sorgo .....</i>	<i>1</i>
1.1.1    Origem e história .....	1
1.1.2    Composição química .....	2
1.1.3    Produção e importância econômica .....	3
1.2 <i>Resíduos industriais do girassol e utilização do subproduto .....</i>	<i>5</i>
1.3 <i>Extração de proteínas .....</i>	<i>6</i>
1.3.1    Proteínas .....	6
1.3.2    Extração química de proteínas .....	11
1.4 <i>Hidrólise enzimática .....</i>	<i>12</i>
1.5 <i>Peptídeos bioativos .....</i>	<i>15</i>
1.6 <i>Aplicação tecnológica dos peptídeos bioativos .....</i>	<i>16</i>
1.7 <i>Peptídeos com atividade antioxidante .....</i>	<i>18</i>

2. OBJETIVOS .....	21
2.1. <i>Objetivo geral</i> .....	21
2.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	21
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>30</b>
<b>ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE GRÃOS DE MILHO E SORGO, FARELO E GRÃOS DE GIRASSOL E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE GIRASSOL.....</b>	<b>30</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>31</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>33</b>
2.1 <i>Introdução</i> .....	35
2.2 <i>Material e Métodos</i> .....	36
2.2.1 Materiais .....	37
2.2.2 Composição química .....	38
2.2.3 Desengorduramento dos grãos de girassol .....	38
2.2.4 Métodos de extração proteica .....	38
2.2.4.1 Método 1: Extração Diclorometano/Metanol – CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH (1:1).....	38
2.2.4.2 Método 2: Extração com Acetato de Sódio – NaC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> (20mM, pH 5,0) .....	39
2.2.4.3 Método 3: Extração com Bicarbonato de Amônia/tratamento térmico - NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (5mM, pH 8,0).....	39
2.2.4.4 Método 4: Extração com Água/etanol (2:3)/tratamento térmico – H <sub>2</sub> O/C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH.....	39
2.2.4.5 Método 5: Extração alcalina e precipitação ácida – NaOH (mol.L <sup>-1</sup> ) e HCl (mol.L <sup>-1</sup> ).....	40
2.2.5 Dosagem da proteína e peptídeos .....	40
2.2.6 Determinação da Atividade Antioxidante .....	40
2.2.6.1 Método ABTS .....	41
2.2.6.2 Método DPPH.....	41
2.2.6.3 Método FRAP .....	41

2.2.7	Obtenção de hidrolisados proteicos .....	42
2.2.8	Determinação da concentração proteica e Grau de hidrólise (%)..	42
2.2.9	Análise estatística .....	42
2.3	<i>Resultados e Discussão</i> .....	43
2.3.1	Composição química .....	43
2.3.2	Análise e comparação entre as extrações proteicas .....	45
2.3.3	Atividade antioxidante dos extratos proteicos.....	48
2.3.4.	Obtenção dos hidrolisados proteicos do farelo do girassol .....	54
2.3.5.	Atividade antioxidante do hidrolisado.....	56
2.4	<i>Conclusão</i> .....	58
2.5	<i>Referências bibliográficas</i> .....	59
4.	TRABALHOS FUTUROS .....	64
5.	TRABALHOS APRESENTADOS DURANTE O MESTRADO .....	64
	<b>APÊNDICE A – CURVA PADRÃO DE ALBUMINA DE SORO BOVINO .....</b>	<b>66</b>
	<b>APÊNDICE B – CURVA PADRÃO DE TROLOX: ABTS, DPPH E FRAP.....</b>	<b>67</b>
	<b>APÊNDICE C – MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DO RENDIMENTOS DAS EXTRAÇÕES PROTEICAS .....</b>	<b>69</b>
	<b>APÊNDICE D – MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES (ABTS, DPPH E FRAP) DOS EXTRATOS PROTEICOS.</b>	<b>70</b>
	<b>APÊNDICE E – MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES (ABTS E DPPH) DOS HIDROLISADOS .....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1:</b> Participação das grandes regiões e unidades da federação na produção de cereais, leguminosas e oleaginosas no período de janeiro de 2016 (LSPA, 2016).....	4
<b>Figura 2:</b> Mapa de produção agrícola no Brasil referente aos grãos de girassol, milho e sorgo (LSPA, 2016).....	4
<b>Figura 3:</b> Fluxograma dos processos de extração do óleo e obtenção da torta e farelo de girassol adaptado de SOUSA, 2008.....	5
<b>Figura 4:</b> Estrutura geral do aminoácido.....	7
<b>Figura 5:</b> Estrutura conformacional das proteínas (Adaptado de USP, 2017).....	10
<b>Figura 6:</b> Mecanismo da serina protease (MURI, 2014).....	14
<b>Figura 7:</b> Estabilização do radical DPPH (HUANG, 2005).....	19
<b>Figura 8:</b> Esquema de formação do radical ABTS (GARCIA-LEIS <i>et al.</i> , 2016) .....	20
<b>Figura 10:</b> Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe <sup>+</sup> (PULIDO <i>et al.</i> , 2000).....	21

## CAPÍTULO I - ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE GRÃOS DE MILHO E SORGO, FARELO E GRÃOS DE GIRASSOL E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE GIRASSOL

- Figura 1:** Esquema genérico aplicado para obtenção dos peptídeos com atividade antioxidante.....37
- Figura 2:** Comparação estatística do Rendimento das extrações proteicas em diferentes métodos para as amostras: (A) Milho, (B) Sorgo, (C) Girassol Soxhlet, (D) Girassol Bligh & dyer e (E) Farelo de Girassol. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )..... 47
- Figura 3:** Comparação estatística do valor TEAC pelo método ABTS para as amostras: (A) Milho, (B) Sorgo, (C) Girassol Soxhlet, (D) Girassol Bligh & dyer e (E) Farelo de Girassol para os diferentes métodos de extração proteica, valores expressos em  $\mu\text{M}$  de TROLOX.g<sup>-1</sup> de amostra. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).....49
- Figura 4:** Comparação estatística do valor TEAC pelo método DPPH para as amostras: (A) Milho, (B) Sorgo, (C) Girassol Soxhlet, (D) Girassol Bligh & dyer e (E) Farelo de Girassol para os diferentes métodos de extração proteica, valores expressos em  $\mu\text{M}$  de TROLOX.g<sup>-1</sup> de amostra. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )..... 51
- Figura 5:** Comparação estatística do valor TEAC pelo método FRAP para as amostras: (A) Milho, (B) Sorgo, (C) Girassol Soxhlet, (D) Girassol Bligh & dyer e (E) Farelo de Girassol para os diferentes métodos de extração proteica, valores expressos em  $\mu\text{M}$  de TROLOX.g<sup>-1</sup> de amostra. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).....53
- Figura 6:** Comparação estatística do Grau de hidrólise (%) para as proteases Neutrase e Flavourzyme.....54
- Figura 7:** Hidrólise enzimática nos tempos de 0, 30, 60 e 120 com proteases Neutrase e Flavourzyme.....55
- Figura 8:** Comparação estatística dos métodos ABTS e DPPH para os hidrolisados durante 120 minutos. (A) ABTS da Neutrase, (B) DPPH da Neutrase, (C) ABTS da Flavourzyme e (D) DPPH da Flavourzyme.....57

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

<b>Tabela 1:</b> Composição química dos grãos de girassol, milho e sorgo.....	2
<b>Tabela 2:</b> Estrutura e códigos dos aminoácidos.....	8

### CAPÍTULO I - ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE GRÃOS DE MILHO E SORGO, FARELO E GRÃOS DE GIRASSOL E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE GIRASSOL

<b>Tabela 1:</b> Média e desvio padrão da composição proximal dos grãos de milho, sorgo e girassol e farelo de girassol.....	43
--	----

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ACE	Enzima Conversora Angiotensina
ADH	álcool desidrogenase
ANOVA	Análise de variância
AU	Unidade Anson
BHA	hidroxilansole butilado
BHT	hidroxiltolueno butilado
DPPH	(2,2-difenil-1-picril-hidrazila)
FRAP	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
GH	Grau de hidrólise
GP	gaiato de propilo
HDL	high density lipoprotein
LAPU	Unidade Leucina Aminopeptidase
LDL	low density lipoprotein
pH	potencial hidrogeniônico
TBHQ	terc-butilhidroquinona
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
VLDL	very low density lipoprotein

## RESUMO

PRADO, DANIELLE MARIA FERNANDES. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, fevereiro de 2017. **Hidrólise enzimática de proteínas isoladas de grãos para produção de peptídeos bioativos *in vitro***. Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Mariana Buranelo Egea. Coorientadores: Dr. Jeferson Aparecido Moreto e Dr. Ailton Cesar Lemes.

Durante a última década, muitos peptídeos bioativos foram descobertos a partir da hidrólise enzimática de diferentes proteínas alimentares. Esses peptídeos, ao serem libertados após a hidrólise enzimática, possuem propriedades biofuncionais, com potencial nutracêutico para aplicações alimentícias e farmacêuticas. Tais peptídeos podem apresentar efeitos anti-hipertensivo, antioxidante, antiobesidade, imunomodulador, antidiabético, hipocolesterolêmico e anticâncer. O objetivo deste trabalho foi obter peptídeos bioativos através da hidrólise enzimática das proteínas dos grãos de milho, sorgo, girassol e farelo de girassol. Para isso, inicialmente foi avaliada a composição proximal de cada grão, milho, sorgo, girassol e do farelo de girassol, determinando-se o teor de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas. Foram avaliados diferentes métodos de extração de proteínas para os grãos e farelo no intuito de obter a maior quantidade de proteínas possível em cada grão. Posteriormente, determinou-se a atividade antioxidante dos extratos proteicos pelos métodos de ABTS, DPPH e FRAP. Após análise de rendimento proteico e atividade antioxidante, foram escolhidos os extratos proteicos oriundos das amostras de girassol para a realização da hidrólise enzimática. A hidrólise enzimática foi realizada a partir do uso de enzimas proteolíticas (Neutrase e Flavourzyme) em tempo, temperatura e pH otimizados com o farelo de girassol. Por fim, foi determinado a atividade antioxidante por meio dos métodos ABTS

e DPPH para os hidrolisados com as enzimas proteolíticas. O farelo de girassol foi a amostra que apresentou o maior teor de proteínas (27,8 g/ 100 g), seguido dos grãos de girassol (15,12 g/100g), sorgo (9,87 g/100g) e milho (6,6 g/100g). Os métodos mais eficazes, que resultaram em maior extração proteica e atividade antioxidante, foram os métodos em que se utilizou  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (5mM, pH 8,0) e o método de extração com  $\text{H}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$  (2:3), ambos associados com tratamento térmico. O maior teor de proteínas extraídas foi de 797,9, 303,8 e 11296,5  $\mu\text{g/g}$  e a maior atividade antioxidante de 34417,5, 9732,6 e 47473,1  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> para os grãos de girassol desengordurados por soxhlet, Bligh & dyer e o farelo de girassol, respectivamente, quando comparados aos grãos de milho e sorgo. Em relação a hidrólise enzimática, o farelo de girassol foi o substrato em que ocorreu o maior grau de hidrólise, 11,06%, quando se utilizou a enzima Neutrase, seguido da enzima Flavourzyme com grau de hidrólise de 5,43%. A hidrólise enzimática aplicada sobre os extratos proteicos resultou em aumento da captura de radicais ABTS com 32868,94  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> utilizando-se a enzima Neutrase e 33924,39  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> para a enzima Flavourzyme. Já em relação ao método de determinação de atividade antioxidante, foi verificado decréscimo da captura de radicais, com valores de 693,90  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> para a enzima Neutrase e 340,24  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> para a enzima Flavourzyme. Os extratos proteicos, assim como os hidrolisados obtidos, apresentaram elevada atividade antioxidante, demonstrando grande potencial como alternativa aos antioxidantes sintéticos.

**Palavras-chave:** Extração proteica. Atividade antioxidante. Enzimas proteolíticas. Biofuncional.

## ABSTRACT

PRADO, DANIELLE MARIA FERNANDES DO PRADO. Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde - GO, February 2017. **Enzymatic hydrolysis of proteins isolated from grains for the production of bioactive peptides in vitro.** Advisor: Dr.<sup>a</sup> Mariana Buranelo Egea. Co-advisors Dr. Jéferson Aparecido Moreto and Dr. Ailton Cesar Lemes.

During the last decade, many bioactive peptides have been discovered from the enzymatic hydrolysis of different food proteins. These peptides, when released after enzymatic hydrolysis, have biofunctional properties with nutraceutical potential for food and pharmaceutical applications. Such peptides may exhibit antihypertensive, anti-oxidant, anti-obesity, immunomodulatory, antidiabetic, hypocholesterolemic and anticancer effects. The aim of this work was to obtain bioactive peptides through the enzymatic hydrolysis of the proteins of corn, sorghum, sunflower and sunflower meal. For this, the proximal composition of each grain as well as corn, sorghum, sunflower and sunflower meal was evaluated, determining the moisture content, ashes, lipids and proteins. Different methods of protein extraction for grains and meal were carried out in order to obtain the largest amount of proteins possible in each grain. Subsequently, the antioxidant activity of the protein extracts was determined by the ABTS, DPPH and FRAP methods. After the analysis of protein efficiency and antioxidant activity, the protein extracts from the sunflower samples were selected for enzymatic hydrolysis. The enzymatic hydrolysis was performed using proteolytic enzymes (Neutrase and Flavourzyme) in time, temperature and pH optimized with sunflower meal. Finally, the antioxidant activity was determined by the ABTS and DPPH methods for hydrolysates with the proteolytic enzymes. The sunflower meal was the sample with the highest protein content (27.8 g / 100 g), followed by sunflower (15.12 g / 100 g), sorghum (9.87 g / 100 g) and corn (6.6 g / 100g). The most effective methods, which resulted in higher protein extraction and

antioxidant activity, were the  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (5mM, pH 8.0) and  $\text{H}_2\text{O} / \text{C}_2\text{H}_6\text{O}$  (2: 3) extraction methods, both associated with heat treatment. The highest protein content was 797.9, 303.8 and 11296.5  $\mu\text{g} / \text{g}$  and higher antioxidant activity of 34417.5, 9732.6 and 47473.1  $\mu\text{g}$  trolox.g equivalent of sample<sup>-1</sup> for the grains of sunflower defatted by soxhlet, Bligh & dyer and sunflower meal, respectively, when compared to corn and sorghum grains. In relation to the enzymatic hydrolysis, sunflower meal was the substrate where the highest hydrolysis degree occurred, 11.06%, when the enzyme Neutrased was used, followed by the enzyme Flavourzyme with hydrolysis degree of 5.43%. The enzymatic hydrolysis applied on the protein extracts resulted in an increase in the capture of ABTS radicals with 32868.94  $\mu\text{g}$  of trolox.g equivalent of sample<sup>-1</sup> using the enzyme Neutrased and 33924.39  $\mu\text{g}$  of trolox.g equivalent of sample<sup>-1</sup> for the enzyme Flavourzyme. Regarding the method of determining antioxidant activity was observed a decrease of the capture radicals, with values of 693.90  $\mu\text{g}$  equivalent trolox.g<sup>-1</sup> sample for Neutrased enzyme and 340.24  $\mu\text{g}$  equivalent trolox.g of sample<sup>-1</sup> for the enzyme Flavourzyme. The protein extracts, as well as the hydrolysates obtained, presented high antioxidant activity, showing great potential as an alternative to synthetic antioxidants.

**Key words:** Protein extraction. Antioxidant activity. Proteolytic enzymes. Biofunctional.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Grãos: girassol, milho e sorgo

#### 1.1.1 Origem e história

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma dicotiledônea anual da família Asteraceae, originária do continente americano, tendo como centro de origem o México. Adapta-se a diferentes condições ambientais, podendo ser cultivado desde o Rio Grande do Sul até o hemisfério Norte, no estado de Roraima (CASTRO, FARIAS, 2005). No Brasil, somente a partir da década de 1990, deu-se importância ao cultivo do girassol, principalmente no Centro-Oeste, destacando-se os estados de Goiás e Mato Grosso do Sul pela extração do óleo e produção de biodiesel (DALL AGNOL *et al.*, 2005; NEVES, 2007).

O milho (*Zea mays* L.) é uma monocotiledônea anual da família Poaceae originária no México e Guatemala (FEPAGRO, 1998). O milho passou a ser apenas fonte alimentar para os seres humanos e, atualmente, possui grande importância em outras formas de utilização, que vão desde a animal até a indústria de alta tecnologia, como a produção de filmes e embalagens biodegradáveis (PAES, 2006).

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é uma monocotiledônea da mesma família do milho (Poaceae) originária da África e em parte da Ásia. Embora sua cultura seja antiga, sua expansão só se deu no final do século XIX, e no Brasil, iniciou a partir da década de 1970. É muito utilizado na alimentação humana, alimentação animal e produção de biocombustível (QUEIROZ *et al.*, 2011; BRITO, 2015).

### 1.1.2 Composição química

A distribuição dos componentes químicos das sementes se divide entre umidade e matéria seca, a qual é dividida em matéria orgânica e inorgânica. Na matéria orgânica, encontram-se os lipídeos, proteínas, carboidratos e outros componentes; e na fração inorgânica as cinzas (ALVES, 2010).

Assim como todos os demais alimentos possuem sua característica na composição química, os grãos de girassol, milho e sorgo também possuem sua particularidade devido a região cultivada. Essa particularidade de cultivo remete à diferentes composições químicas dos grãos pelos fatores de composição do solo, temperatura, clima e umidade, dentre outros aspectos. Dessa forma, pode-se destacar os componentes químicos dos grãos de girassol, milho e sorgo na Tabela 1, em que se verifica que o girassol apresenta teores de proteína e lipídeos muito superiores aos grãos de milho e sorgo, que, por sua vez, apresentam destacadamente elevados teores de carboidratos.

**Tabela 1:** Composição química dos grãos de girassol, milho e sorgo.

Componentes	Teores (g/100g)		
	Girassol (O'BRIEN, 2009)	Milho (CAPOBIANGO, 2006)	Sorgo (BARCELOS, 2012)
Cinzas	4,0	0,5	1,2
Umidade	4,7	11,0	14,0
Lipídeos	47,3	1,9	3,4
Proteínas	24,0	6,1	9,8
Carboidratos	19,9	80,4	79,0

Além disso, pode-se verificar que o grão de sorgo apresenta composição química semelhante à do milho, sendo que, as tecnologias de processamento para a obtenção de produtos alimentícios desses cereais são aplicáveis ao sorgo com a finalidade de explorar seu potencial como matéria-prima para a elaboração de diversos produtos, incluindo produtos sem glúten destinados a portadores de doença celíaca (SOUZA *et al.*, 2009).

Segundo Bruzzetti (1999), o girassol apresenta ácidos graxos poli-insaturados que favorece o aumento das proteínas de alta densidade (HDL), a redução do colesterol

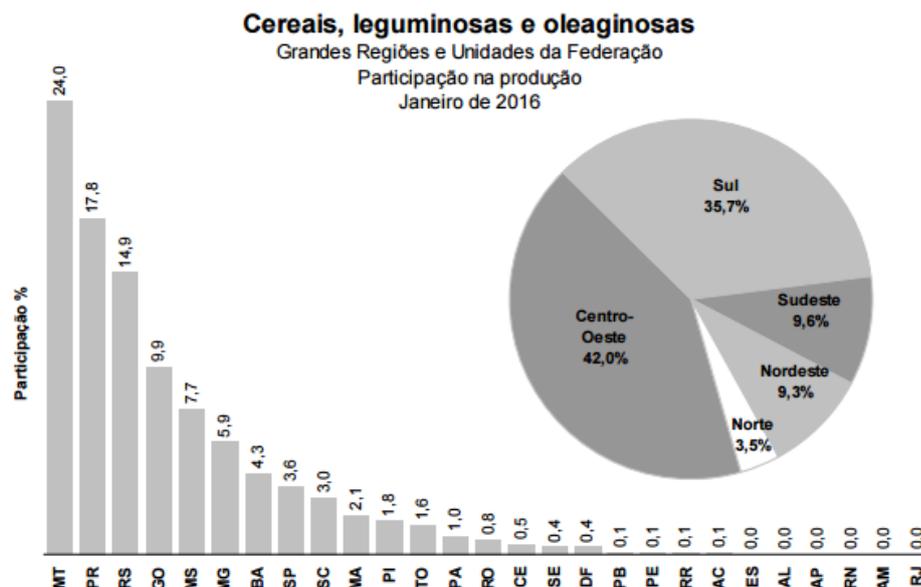
plasmático e a redução das proteínas de baixa densidade (LDL e VLDL), contribuindo para a prevenção de arteriosclerose e dos problemas cardiovasculares.

Os grãos de girassol possuem em sua principal composição o ácido clorogênico, composto fenólico, que possui funções nutricionais e atividades farmacológicas quando atuadas como antioxidante, podendo também atuar como antidiabetes, anti-hipertensivo e propriedades quimio-preventiva, em produção de composições de proteção solar (KACHRIMANIDOU *et al.*, 2015) e propriedades antifúngicas (NAVARRO *et al.*, 2012). Além disso, o farelo de girassol é utilizado principalmente na alimentação de ruminantes, mas suas propriedades nutricionais, sensoriais e funcionais também o torna um alimento humano com excelente fonte proteica e compostos antioxidantes (SZYDLOWSKA-CZERNIAK *et al.*, 2011).

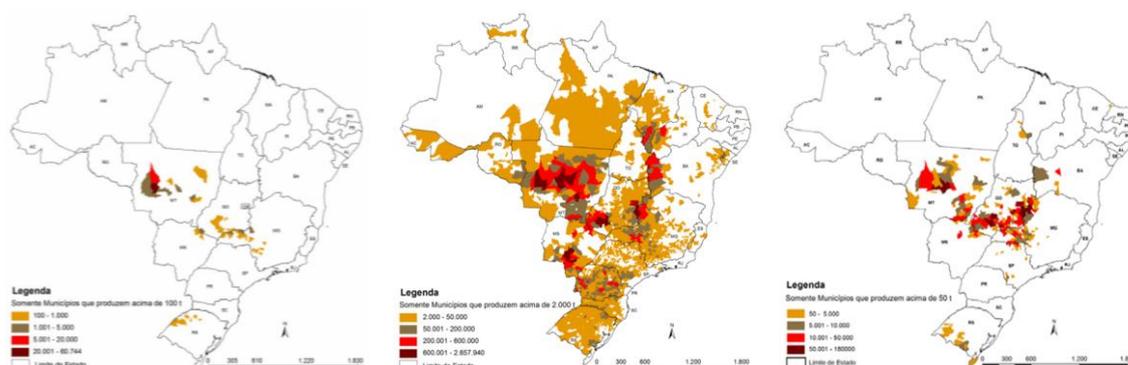
### 1.1.3 Produção e importância econômica

A produção agrícola no Brasil tem se estendido ao longo dos anos, com crescimento de 0,7% quando comparada com a safra 2014/2015, que equivale a 397,1 mil hectares. Dentre as grandes regiões, o volume da produção de cereais, leguminosas e oleaginosas apresentou a seguinte distribuição: Centro-Oeste, 88,4 milhões de toneladas; Sul, 75,2 milhões de toneladas; Sudeste, 20,2 milhões de toneladas; Nordeste, 19,6 milhões de toneladas e Norte, 7,3 milhões de toneladas (LSPA, 2016). Na Figura 1, pode-se observar a participação das grandes regiões e unidades da federação na produção de cereais, leguminosas e oleaginosas no período referente a janeiro de 2016.

Na Figura 2, é possível verificar a grande influência da Região Centro Oeste na economia brasileira em relação aos grãos de girassol, milho e sorgo, representando 42,0% na participação ativa da produção de grãos no país.



**Figura 1:** Participação das grandes regiões e unidades da federação na produção de cereais, leguminosas e oleaginosas no período de janeiro de 2016 (LSPA, 2016).



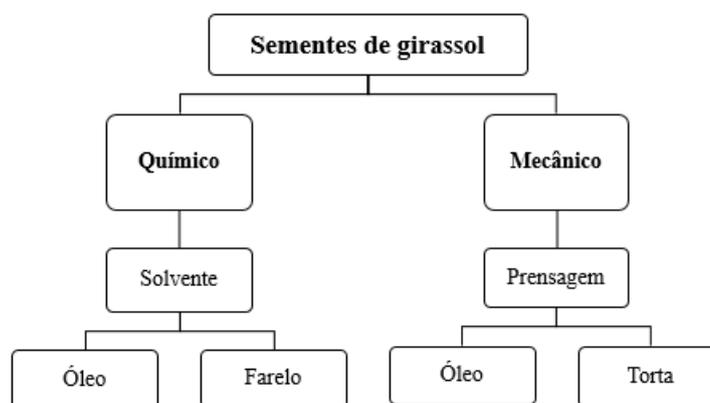
**Figura 2:** Mapa de produção agrícola no Brasil referente aos grãos de girassol, milho e sorgo (LSPA, 2016).

Apesar da cultura de girassol ser menor comparando com a do milho e sorgo, ela está se estendendo gradativamente, principalmente em função de suas características favoráveis e adaptáveis ao clima tropical do Brasil. Possuindo maior tolerância à seca, quando comparada ao milho e/ou o sorgo, baixa incidência de pragas e doenças, além de contribuir com a rotação e sucessão às culturas subsequentes (EMBRAPA, 2016).

## 1.2 Resíduos industriais do girassol e utilização do subproduto

As oleaginosas são amplamente utilizadas para aplicações alimentares como na produção de óleos de mesa de alta qualidade e à produção artesanal de óleo virgem (AGUIAR, 2001). Já na aplicação não alimentares são utilizadas para a produção de energia, como no caso do biodiesel (UGOLINI *et al.*, 2014).

Na indústria, as oleaginosas, ao passarem pelo processo de extração de óleo (por processo de prensagem e/ou solvente orgânico), produzem grande quantidade de subprodutos, que são denominados de torta e farelo, respectivamente (Figura 3).



**Figura 3:** Fluxograma dos processos de extração do óleo e obtenção da torta e farelo de girassol adaptado de SOUSA, 2008.

O procedimento de prensagem do grão de girassol consegue transformar em óleo cerca de 25 a 33% do peso inicial das sementes (KARTIKA *et al.*, 2006). Já na extração por solventes orgânicos, o rendimento do óleo extraído médio para as sementes de girassol é de 41,26% (CARRÃO-PANIZZI e MANDARINO, 2005).

Os resíduos resultantes da extração do óleo de girassol, sendo para alimentação ou biodiesel, são subprodutos nutritivos e valiosos com elevados conteúdos de proteínas que variam de 40% a 50% nos grãos desengordurados dependendo do tipo de extração (GONZALEZ-PÉREZ e VEREIJKEN, 2007). Além dos elevados teores de proteínas, os resíduos provenientes da extração do óleo são ricos em compostos fenólicos que são responsáveis por 1-4% da massa total, sendo o ácido clorogênico o componente predominante. O ácido clorogênico é um potente antioxidante e faz com que ocorra o

escurecimento da torta devido à ação da enzima polifenoloxidase, reduzindo assim a qualidade nutricional da proteína (SOUZA, 2013).

Devido ao seu potencial nutricional, o subproduto da extração do óleo de girassol é utilizado na ração animal, especialmente para ruminantes e peixes (RAMACHANDRAN *et al.*, 2007) e também como ingrediente funcional, como aditivos em alimentos fortificados e como antioxidante natural para alimentos (WEISZ *et al.*, 2009).

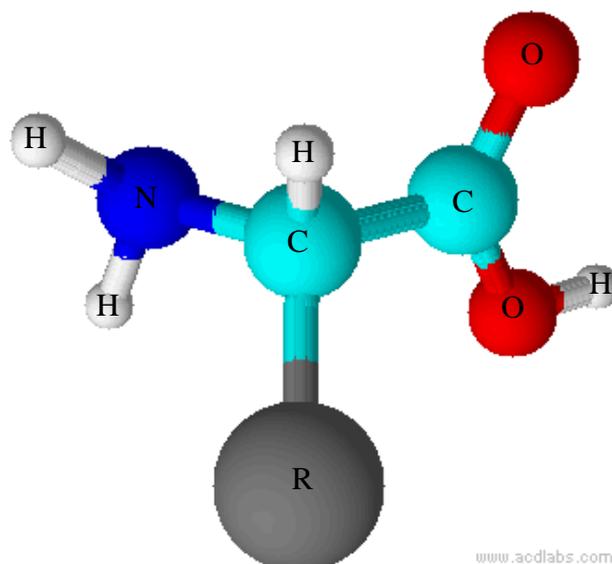
### 1.3 Extração de proteínas

#### 1.3.1 Proteínas

As proteínas são as moléculas mais abundantes e com maior diversidade de funções nos sistemas vivos e desempenham um papel central nos sistemas biológicos. Além de funcionarem como enzimas, as proteínas também funcionam como componentes estruturais das células e dos organismos complexos (DAMODARAN *et al.*, 2010).

Todas as proteínas são essencialmente compostas dos mesmos 20 aminoácidos primários, mas algumas não contêm todos os 20 aminoácidos. As diferenças de estruturas e função dos milhares de proteína surgem a partir do fato de que os aminoácidos são ligados entre si por meio de ligações amida (HARVEY, FERRIER, 2012).

Esses aminoácidos se diferem na natureza química do grupo R da cadeia lateral (Figura 4). Suas propriedades físico químicas, como carga líquida, solubilidade, reatividade química e potencial de ligação com hidrogênio, são dependentes da natureza química do grupo R.

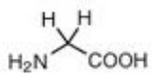
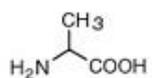
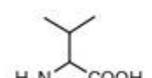
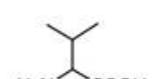
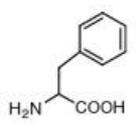
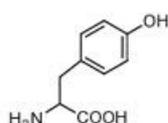
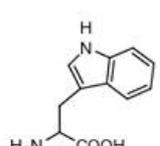
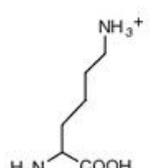
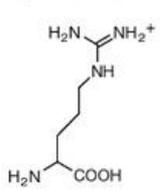
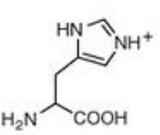


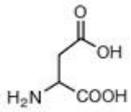
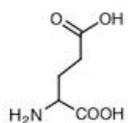
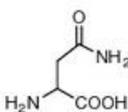
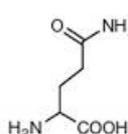
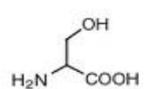
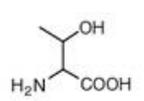
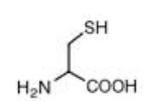
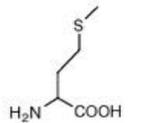
**Figura 4:** Estrutura geral do aminoácido.

O átomo de carbono  $\alpha$  de todos os aminoácidos é assimétrico, ou seja, possuem quatro grupos ligados ao carbono que são diferentes. Mas, há exceção para o aminoácido glicina que possui dois grupos iguais ligados ao carbono  $\alpha$ . A Tabela 2 mostra os aminoácidos primários ocorrentes em proteínas, no entanto, existem os aminoácidos derivados dos aminoácidos primários provenientes de ligações cruzadas ou derivados simples de aminoácidos específicos, como é o caso da cisteína.

Além dos 20 aminoácidos, tem-se a selenocisteína que é derivado da serina, contendo selênio ao invés de enxofre. Portanto, as proteínas são comumente formadas por aminoácidos e ligados entre si por ligações peptídicas. Em uma ligação peptídica, o resíduo de um aminoácido na extremidade com um grupo  $\alpha$ -amino é chamado de resíduo aminoterminal ou N-terminal e o resíduo da outra extremidade, o qual possui o grupo carboxil livre é denominado resíduo carboxilterminal ou C-terminal (NELSON e COX, 2011).

**Tabela 2:** Estrutura e códigos dos aminoácidos (Adaptado de HARVEY, FERRIER, 2012).

Classificação	Estrutura	Nome	Códigos
Alifáticos		Glicina	Gly
		Alanina	Ala
		Valina	Val
		Leucina	Leu
		Isoleucina	Ile
		Prolina	Pro
Aromáticos		Fenilalanina	Phe
		Tirosina	Tyr
		Triptofano	Trp
Básicos		Lisina	Lys
		Arginina	Arg
		Histidina	His

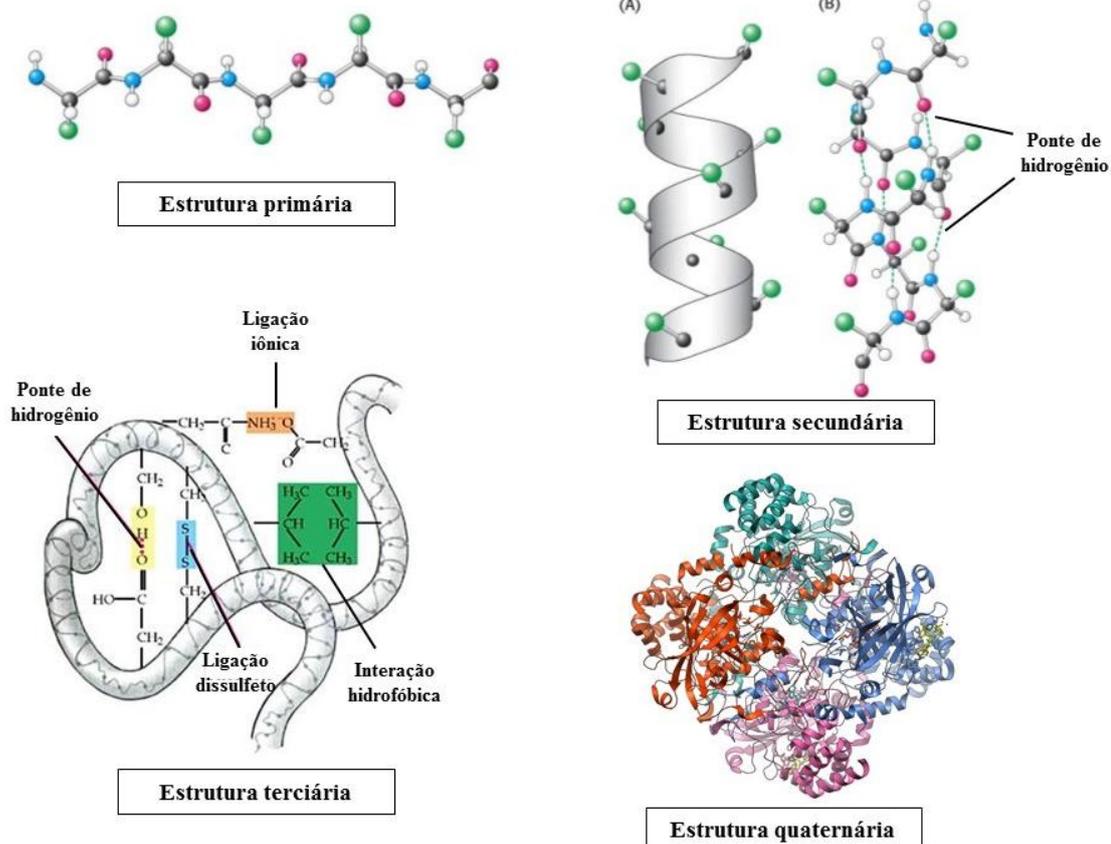
Ácidos		Ácido aspártico	Asp
		Ácido glutâmico	Glu
Amida		Asparagina	Asn
		Glutamina	Gln
Hidroxilados		Serina	Ser
		Treonina	Thr
Sulfurados		Cisteína	Cys
		Metionina	Met

A sequência linear dos aminoácidos ligados contém a informação necessária para formar uma molécula proteica com estrutura tridimensional única. Dessa forma, a proteína possui quatro estruturas que contribuem para a sua conformação nativa funcional que determina a função biológica, como a catálise, proteção, regulação, transdução de sinal, armazenamento, estrutural e transporte (Figura 5) (HARVEY, FERRIER, 2012).

Além das características estruturais dos aminoácidos, as propriedades físico-químicas são extremamente importantes para uma compreensão das propriedades funcionais.

As propriedades físico-química dos aminoácidos podem ser: ópticas, ácidobásicas e hidrofobicidade. Os aminoácidos, com exceção da glicina, são ópticamente ativos, isto é, eles giram o plano da luz polarizada. As moléculas ópticamente ativas são assimétricas,

ou seja, elas não são sobreponíveis à suas imagens especulares. Como o átomo de carbono alfa dos aminoácidos são assimétricos possuem a propriedade de quiralidade, sendo característica das substâncias que possuem átomos de carbono tetraédrico (VOET *et al.*, 2008).



**Figura 5:** Estrutura conformacional das proteínas (Adaptado de USP, 2017).

Os  $\alpha$ -aminoácidos tem dois ou, para aqueles com cadeias laterais ionizáveis, três grupos ácido-base. De acordo com a curva de titulação da glicina, o aminoácido mais simples, os valores baixos de pH, os grupos ácido-base estão totalmente protonados, de modo que a forma catiônica predomina ( $^+H_3NCH_2COOH$ ). Ao longo da titulação com uma base forte tal como NaOH, a glicina perde dois prótons, como se fosse um ácido poliprótico. Em pH 2,35, as concentrações na forma catiônica e zwitteriônica são iguais; de maneira similar em pH 9,78, as concentrações da forma zwitteriônica e aniônica são iguais. Em solução aquosa, a forma completa neutra ( $H_2NCH_2COOH$ ) está presente somente em quantidades muito pequenas. Portanto, o pH no qual uma molécula não conduz corrente elétrica é conhecido como seu ponto isoelétrico (VOET *et al.*, 2008).

As cadeias laterais alifáticas dos aminoácidos (especialmente Leu, Ile, Val, Phe e Trp) apresentam características hidrofóbicas e tendem a agrupar no interior das proteínas. Na formação das proteínas, um conteúdo significativo de cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos são aglomerados em seu interior, formando um núcleo hidrofóbico da proteína. Assim, facilitando as ligações de hidrogênio e interações iônicas de cada grupo polar e dando estabilidade da conformação das proteínas (NELSON e COX, 2011).

### 1.3.2 Extração química de proteínas

Uma variedade de métodos tem sido utilizado para extrair proteínas, alguns métodos foram desenvolvidos com base no tipo de solvente e procedimentos realizados, sendo utilizando tratamento térmico ou não (MAHATMANTO *et al.*, 2014).

Segundo Mahatmanto *et al.* (2014), a extração usando solventes aprótico polar fraco, como o diclorometano, tem a capacidade de ligar moléculas hidrofóbicas, tais como lipídios. Em compensação os solventes prótico polar forte, como o metanol, solubiliza peptídeos com polaridade média a baixa. Esses solventes foram usados para extrair ciclopeptídeos em *Hybanthus australianos* (SIMONSES *et al.*, 2005).

O solvente acetonitrila, sendo miscível com a água, serve como um solvente para extrair peptídeos de média polaridade. Enquanto isso, a molécula de água atrai peptídeos mais polares. O ácido fórmico funciona como modificador de pH solubilizando peptídeos mas desnatura e precipita as proteínas maiores. Esses solventes foram utilizados para extrair ciclopeptídeos a partir das sementes e folhas de *Viola hederacea* (TRABI, CRAIK, 2004).

Assim, também acontece com o acetato de sódio juntamente com acetona, que precipitam as proteínas maiores. Este método foi usado na descoberta de nó de cistina de sementes de *Momordica cochinchinensis* (HERNANDEZ, *et al.*, 2000; CHAN *et al.*, 2009). Juntamente com o tratamento térmico, o bicarbonato de amônio serve como tampão de extração e precipita proteínas termolábeis. O aquecimento também promove liberação de compostos bioativos favorecendo peptídeos estáveis. Os solventes e tratamento térmico foram utilizados para descoberta de peptídeos de nó de cistina a partir das sementes de *Momordica charantia* (HAMATO *et al.*, 1995) e ciclopeptídeos das

raízes, nódulos, caules, folhas, flores e sementes de *Clitoria ternatea* (NGUYEN *et al.*, 2011).

Segundo Oseguera-Toledo (2011), o método de precipitação de proteínas com hidróxido de sódio e ácido clorídrico solubiliza e precipita as proteínas devido mudança de pH. Esse método foi utilizado para extração de proteínas de grãos como o *Phaseolus vulgaris* L. e *Sorghum bicolor* L. (WU *et al.*, 2016).

#### 1.4 Hidrólise enzimática

Segundo Adler-Nissen (1986), as proteínas podem sofrer hidrólise, sendo catalisada por ácidos, bases ou enzimas e, dessa maneira obter aminoácidos livres e pequenos peptídeos com posições pré-definidas que são desejáveis no ponto de vista nutricional. Através de clivagem de ligações peptídicas, a hidrólise enzimática pode diminuir a massa molecular, aumentando a reatividade e melhorando as propriedades funcionais das proteínas (SOARES, 2013).

De acordo com Ordonez *et al.* (2005), a propriedade funcional é definida como toda propriedade não nutricional que influi no comportamento durante o processamento, estocagem e preparação, controla sua conveniência como ingrediente alimentar e influência na aceitabilidade e no consumo final do produto. Dessa forma, a hidrólise enzimática é um processo importante, pois tem sido utilizado para melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo, melhorando as características de absorção das proteínas, além de reunir propriedades osmóticas equilibrados, hipoalergênicos e apresentar sabor aceitável (PACHECO *et al.*, 2005).

O processo de hidrólise pode ser catalisado por ácidos, bases ou enzimas (SILVA *et al.*, 2009). O tratamento ácido e alcalino oferecem diversas desvantagens, seja por consequência de reações adversas, pela severidade das condições operacionais ou pela composição final (MIRANDA, 2012). Dessa maneira, a forma mais comumente utilizada para produção de peptídeos bioativos *in vitro* é através de hidrólise enzimática de moléculas de proteína (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

As enzimas constituem um grupo de macromoléculas necessário para inúmeros eventos biológicos. Além disso, são úteis em muitos processos industriais, sobretudo nas áreas de biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos (PASTORE, 2010). São

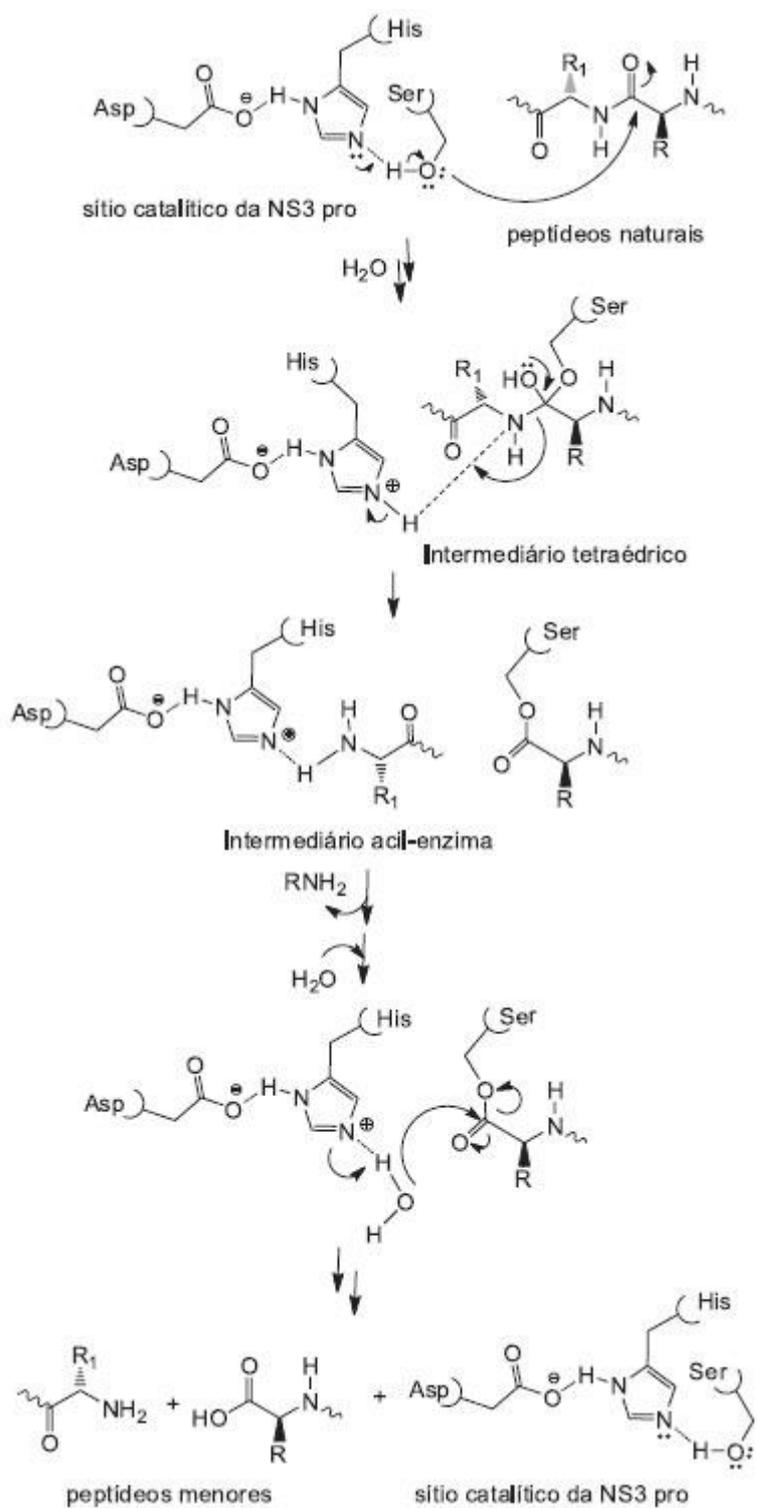
catalisadores muito potentes e eficazes compostas por aminoácidos, unidos por ligação peptídica, que aceleram uma reação química, até torná-la instantânea ou quase instantânea, ao diminuir a energia de ativação. Como catalisadores as enzimas atuam em pequena quantidade e se recuperam indefinidamente. Não levam a cabo reações que sejam energeticamente desfavoráveis, não modificam o sentido dos equilíbrios químicos, mas aceleram sua realização (KIELING, 2002).

O uso de enzimas diferentes na hidrólise de proteínas resulta na formação de uma mistura de peptídeos com diversos graus de hidrólise e conseqüentemente diferentes atividades antioxidantes (SARMADI; ISMAIL, 2010).

É através do processo de clivagem das ligações peptídicas que se originam peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres, denominadas de hidrólise proteica (ADLER-NISSEN, 1981), mas também os grupos de enzimas hidrolisam ligações ésteres (-COOR), tiol-ésteres (-COSR) e amidas (-NH<sub>2</sub>) (WHITAKER, 1994). A Figura 6, demonstra o mecanismo da serina protease. A tríade é uma estrutura coordenada que consiste de três aminoácidos: histidina, aspartato e serina, em que cada aminoácido desempenha uma tarefa específica no processo de catálise. A cadeia lateral da Ser (-CH<sub>2</sub>-OH) é ativada por uma catálise básica mediada por Asp e His através de interações por ligação hidrogênio (numeração dos resíduos referente à serina protease do HCV). A Ser do sítio ativo (nucleófilo ativado) ataca, então, a ligação amídica do substrato polipeptídico, formando um intermediário oxianion tetraédrico. Este intermediário se rompe pela eficiente transferência de próton da His para formar uma amina e um intermediário acil-enzima. A liberação da porção N-terminal e a introdução de uma molécula de H<sub>2</sub>O levam ao ataque da carboxila do substrato, formando o fragmento C-terminal do substrato e regenerando a enzima.

Segundo Biasutti (2006), as enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. São enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeohidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem grande família, dividida em endopeptidases ou proteinases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas. Com base em seu sítio de ação, região N ou C terminal, são classificadas como amino ou carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal sendo que a presença de grupos amino ou carboxila livres tem um efeito negativo na atividade da enzima. Estas enzimas são divididas em quatro

subgrupos de acordo com seu mecanismo catalítico: serina proteases, aspártico proteases, cisteína proteases e metaloproteases (RAO *et al.*, 1998).



**Figura 6:** Mecanismo da serina protease (MURI, 2014).

## 1.5 Peptídeos bioativos

Peptídeos bioativos são considerados fragmentos de proteínas específicas que são inativos no interior da sequência da proteína. Depois de serem libertados por hidrólise enzimática, podem exercer várias funções fisiológicas. Estes peptídeos contêm cerca de 2-20 aminoácidos e apresentam massas moleculares menores que 6000 Da (SUN *et al.*, 2004).

Com base nas suas propriedades estruturais e sua composição de aminoácidos e sequências, estes peptídeos podem desempenhar vários papéis, como antimicrobiano (BAMDAD *et al.*, 2015), antioxidante (POWER *et al.*, 2013), antitrombótico (SHIMIZU *et al.*, 2008), hipocolesterolêmico (TONG *et al.*, 2012), anti-hipertensivo (JIA *et al.*, 2010), além de atuar em doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurológicas e até mesmo Alzheimer (STADTMAN, 2006).

Os polipeptídeos, peptídeos e aminoácidos tanto de origem animal quanto vegetal, obtidos por hidrólise de proteínas, têm sido cada vez mais aplicados na agricultura, não apenas como fonte de azoto orgânico, mas também como uma ferramenta sustentável e renovável para melhorar a qualidade do solo e aquisição de nitrogênio nas plantas, contribuindo na redução da aplicação de fertilizantes químicos (SCHIAVON, 2008). Além disso, esses peptídeos podem agir como bioestimulantes quando aplicados em plantas para fornecer benefícios potenciais para crescimento, desenvolvimento e/ou resposta ao estresse (UGOLINI, 2015).

Dessa maneira, o uso de antioxidantes sintéticos como o hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisole butilado (BHA), gálio de propilo (GP) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) foi restringido por causa dos seus efeitos tóxicos potenciais sobre os seres humanos. Por outro lado, os peptídeos bioativos são considerados antioxidantes naturais e têm atraído grande interesse pela sua segurança e propriedades de distribuição ampla (ZHANG *et al.*, 2009; BRANDELLI *et al.*, 2015)

Devido aos efeitos tóxicos que os antioxidantes sintéticos podem causar nos seres humanos, estudos sobre hidrólise enzimática de grãos na obtenção de peptídeos com bioatividade têm sido investigados. Atualmente, estudos relatam as atividades antioxidantes dos hidrolisados de origem vegetal, como a soja (PARK *et al.*, 2010), canola (ALASHI *et al.*, 2014), farinha do glúten de milho (LIU *et al.*, 2010), girassol (CEVALLOS-CASALS e CISNEROS-ZEVALLOS, 2010; SZYDŁOWSKA-

CZERNIAK *et al.*, 2011), milho (JIN *et al.*, 2016), sorgo (WU *et al.*, 2016), feijão (OSEGUERA-TOLEDO *et al.*, 2011) e arroz (PIU *et al.*, 2014).

Segundo Yu *et al.* (2011), as proteínas do milho têm a capacidade potencial de facilitar o metabolismo do álcool, ativando álcool desidrogenase (ADH) levando a diminuição da concentração de álcool no sangue. A proteína do grão de sorgo hidrolisado, a quimotripsina, é conhecida pela atividade inibidora da Enzima Conversora Angiotensina (ACE) levando a diminuição da pressão sanguínea (CHEN *et al.*, 2013; PUCHALSKA *et al.*, 2014).

Bitzer *et al.* (2017) verificou que concentrados de proteínas da soja exerceu efeitos antioxidantes e citoprotetores *in vitro* e moderou a gravidade da inflamação do cólon e a perda da função de barreira intestinal *in vivo*.

A proteína do farelo de arroz é uma fonte de peptídeos bioativos com potencial atividade antioxidante e inibidoras da Enzima Conversora Angiotensina (ACE) (WANG *et al.*, 2017) e também exibem atividades anti-hipertensivos e antiobesidade (SARMADI e ISMAIL, 2010). Segundo Garcia-Mora *et al.* (2015), a proteína do feijão também exhibe atividades antioxidante e anti-inflamatórias e inibidoras de ACE.

O principal composto fenólico presente nas sementes de girassol é o ácido clorogênico, possuindo funções nutricionais (melhoria da resistência do corpo contra doenças) e atividade biológica, agindo como antioxidantes (KACHRIMANIDOU *et al.*, 2015). Possui também propriedade antidiabetes, anti-hipertensivas e quimio-preventiva (ZHAO *et al.*, 2012).

Percebe-se a importância dos peptídeos bioativos na saúde humana, por isso, há um grande interesse em estudos abordando obtenção de peptídeos bioativos em grãos, cereais e leguminosas. Sendo um estudo promissor na área nutricional e farmacológica, obtendo peptídeos bioativos de grãos que normalmente são utilizados na alimentação animal.

## 1.6 Aplicação tecnológica dos peptídeos bioativos

Atualmente, os peptídeos com atividade biológica têm sido utilizados em vários produtos, podendo ser aplicado diretamente no corpo ou ingerido. O colágeno pode ser ingerido ou aplicado no corpo, sendo comercializado na forma de cápsulas ou como fluido. Em Maxxi 30+ da RACCO Life Colágeno<sup>®</sup>, os ativos atuam melhorando a capacidade do organismo em absorver os nutrientes quando ingeridos, e reflete

diretamente na aparência da pele, cabelos e unhas. Em outra forma de colágeno, tem-se o Peptídeos Bioativos de Colágeno do VERISOL<sup>®</sup> que promovem o aumento da síntese de colágeno tipo I e proteoglicanos, envolvidos na formação e sustentação das fibras elásticas dérmicas, diminuindo assim a flacidez e melhorando a hidratação e suavidade da pele.

A linha da Eudora<sup>®</sup> Rejuvenesce os fios, shampoo, condicionador, leave-in e tônico, possuem aditivos e peptídeos que recupera a juventude dos cabelos e proporciona aumento da espessura dos fios, trazendo força, brilho e redução da queda.

Pepto Protein AGE<sup>®</sup> é um suplemento proteico hidrolisado composto e derivado da caseína, fornecendo uma elevada concentração de di e tri-peptídeos que são absorvidos pelo organismo rapidamente, promovendo a otimização da síntese muscular, melhora da recuperação e do desempenho físico.

O GHRP-2 PRALMORELIN<sup>®</sup> é um polipeptídeo, possui como característica principal e função maior, o aumento na massa muscular magra e diminuição da gordura corporal, aumento no corpo da energia, a força e resistência, crescimento de tecido ósseo, função antienvelhecimento e melhora nas condições das articulações.

Imuno-PG<sup>®</sup> contém peptídeos de glutamina que melhora o sistema imunológico, auxilia no funcionamento do intestino, é fonte de energia para o cérebro, ajuda na recuperação do glicogênio muscular e evita perda muscular.

HydroPeptide<sup>®</sup> é um gel de limpeza facial que contém ácido láctico, extrato de maçã e enriquecido com peptídeos para aumentar a produção de colágeno e reduzir o aparecimento de rugas.

ProMyoBlend<sup>®</sup> contém proteína miofibrilar hidrolisada de carne bovina, peptídeos de proteína de carne, albumina de bife e peptídeos de colágeno) garante uma proteína 350 vezes mais concentrada do que um bife, extremamente biodisponível e de fácil digestibilidade.

Além de produtos consumidos pelos seres humanos, as proteínas hidrolisadas também se encontra em ração para animais. Neste caso, o produto Ração Royal Canin Feline Hypoallergenic<sup>®</sup> são proteínas hidrolisadas de soja, constituída por peptídeos de reduzido peso molecular, é extremamente digestível e possui um potencial alergênico reduzido. Dentre esses produtos, há outros disponíveis em outras marcas. Mas, ainda é restrito sua utilização com outros hidrolisados proteicos. Dessa forma, se faz necessário aplicação de novos produtos utilizando outros tipos de proteínas hidrolisadas com potencial antioxidante.

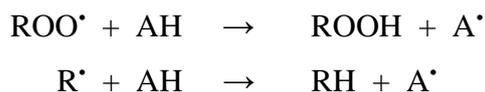
## 1.7 Peptídeos com atividade antioxidante

A oxidação é um processo vital em todos os organismos vivos, resultando na produção de radicais livres ( $O_2^-$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O_2$ ) que surgem naturalmente durante o metabolismo e durante a respiração em organismos aeróbicos, sendo subprodutos de reações normais como a degradação de lipídeos, estresse e processos inflamatórios. A produção de radicais livres ou “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) em excesso pode causar modificações ou degradação progressiva de compostos bioquímicos celulares, incluindo DNA, proteínas, lipídios e carboidratos. Além da produção metabólica que é iniciada em parte pela redução do  $O_2$ , uma multiplicidade de agressores, como drogas, citocinas e fatores ambientais (radiação solar ultravioleta, radiações ionizantes e fumaça do cigarro) pode levar a produção de ERRO intracelular. Esses danos cumulativos induzidos por ERRO podem levar à perda funcional das células ou morte celular, ocasionado diversos tipos de doença e envelhecimento precoce (OLIVEIRA, 2011).

Os radicais livres gerados pela oxidação desempenham papel crítico em distúrbios relacionados à saúde e podem implicar em doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, arteriosclerose, diabetes e câncer, além do desenvolvimento de doenças neurológicas, tais como a doença de Alzheimer (STADTMAN *et al.*, 2006). Em alimentos, as reações oxidativas levam à deterioração dos atributos de qualidade, como sabor, aroma, cor e textura (ZHONG *et al.*, 2012).

Nos últimos anos os peptídeos com atividade antioxidante têm atraído atenção em relação a outros compostos antioxidantes. Esta vantagem está relacionada à sua fácil absorção e alta atividade antioxidante e, além disso, por apresentarem uma estrutura simples, estável em diferentes condições e por não desencadarem imunorreações perigosas (XIE *et al.*, 2008).

Para ser considerado um antioxidante e poder ser utilizado, o composto deve ser capaz de retardar ou impedir os processos oxidativos de doação de elétrons com consequentes estabilização dos radicais livres-moléculas extremamente instáveis (Figura 7), ter eficácia em baixas concentrações, ausência de efeitos indesejáveis na cor, odor, sabor e em outras características dos alimentos, ser de fácil aplicação, estabilidade nas condições de processo e armazenamento, e não podem ser tóxicos (MIELNIK, AABY E SKREDE, 2003).

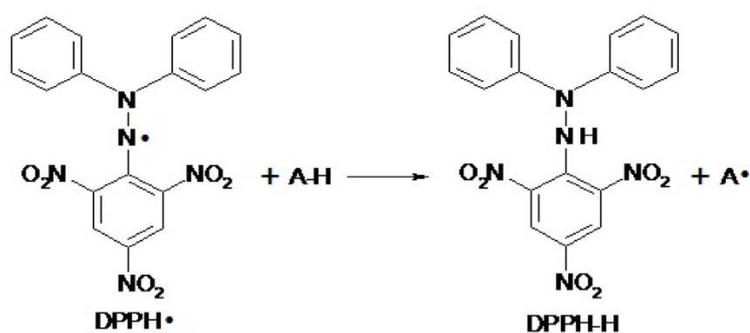


Em que:  $\text{ROO}^\bullet$  e  $\text{R}^\bullet$  são radicais livres;  $\text{AH}$  é antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e  $\text{A}^\bullet$  é radical inerte (FRANKEL, 1980).

O efeito antioxidante dos peptídeos está relacionado, provavelmente, a uma doação de elétrons as moléculas propensas a sofrer o processo de oxidação. Desta forma, tendem a convertê-las em produtos mais estáveis, evitando a produção de compostos indesejáveis nos produtos e prolongando o período de armazenamento dos mesmos, principalmente por sua capacidade de sequestrar radicais livres (TONG *et al.*, 2000). Uma vez demonstrado sua atividade, resistência a digestão e absorção *in vivo* poderiam ser utilizados na elaboração de alimentos funcionais, para a prevenção de distintas enfermidade e reduzir o dano oxidativo em produtos alimentícios, aumentando sua vida útil (VIOQUE *et al.*, 2000).

Os métodos que determinam a atividade antioxidante são classificados em dois grandes grupos, o primeiro se baseia na captura de radicais livres e o segundo na determinação da oxidação de uma molécula alvo.

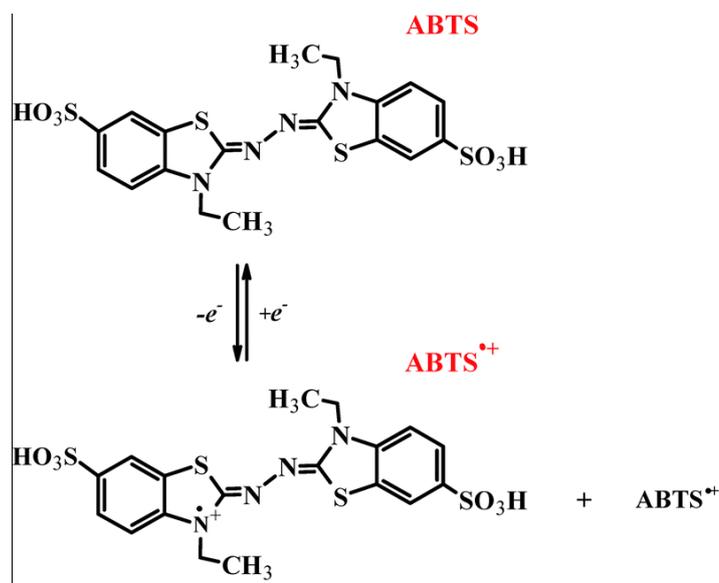
Segundo Lu *et al.* (2010), a oxidação das proteínas por radicais livres leva a formação de grupos carbonila que podem ser detectados pela reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DPPH). É um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta, que possui absorção na faixa de 515-520 nm ocorrendo decréscimo da absorbância durante a reação (figura 7).



**Figura 7:** Estabilização do radical DPPH (HUANG, 2005).

Outro método utilizado para atividade antioxidante, é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Figura 8). Este

método, pode medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI *et al.*, 2005). Baseia-se na estabilidade dos antioxidantes em capturar o cátion  $ABTS^{*+}$ , provocando o decréscimo na absorvância. O radical apresenta uma cor azul esverdeado e possui uma absorção máxima em 645, 734 e 815 nm. Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do  $ABTS^{*+}$  a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

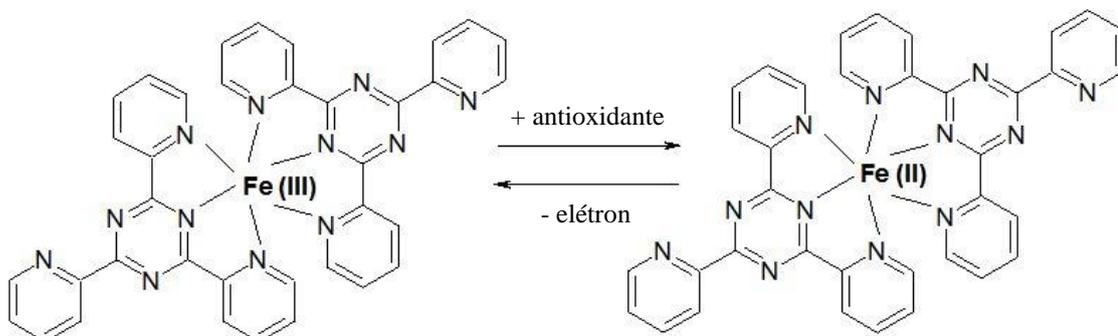


**Figura 8:** Esquema de formação do radical ABTS (GARCIA-LEIS *et al.*, 2016) .

Pulido *et al.* (2000) descreve o método FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. Neste método, o complexo férrico-tripiridiltriazina ( $Fe^{III} - TPZ$ ) é reduzido ao complexo ferroso ( $Fe^{II} - TPZ$ ), na presença de um antioxidante e em condições ácidas (figura 9). O complexo formado por esta reação possui uma coloração azul intensa, com absorção máxima a 593 nm (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

Embora tenha grande importância, a literatura apresenta poucos dados sobre a extração e hidrólise enzimática das proteínas dos grãos de milho, sorgo e farelo e grão de girassol para a produção de peptídeos com atividade antioxidante.

De acordo com o exposto acima e considerando a importância da aplicação dos peptídeos, bem como a necessidade do desenvolvimento de processos de obtenção destes compostos, desenvolveu-se a presente proposta.



**Figura 9:** Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com  $\text{Fe}^+$  (PULIDO *et al.*, 2000).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

- Investigar diferentes métodos de extração proteica e a hidrólise enzimática das proteínas dos grãos de milho e sorgo, farelo e grãos de girassol para a produção de peptídeos com propriedades antioxidantes;

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar a composição centesimal dos grãos de milho, sorgo e do farelo e grão de girassol em relação ao teor de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos;
- Extrair as proteínas dos grãos e farelo por diferentes métodos químicos e analisá-los em relação ao rendimento de extração;
- Verificar a aplicação das enzimas neutrase e flavourzyme na hidrólise enzimática das proteínas extraídas do farelo de girassol para obtenção de peptídeos bioativos;
- Verificar a atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP dos extratos proteicos antes e após a hidrólise enzimática;

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. Enzymic hydrolysis of food protens. Londres: **Elsevier Applied Science**, 1986. 426 p.

ADLER-NISSEN, J. Procesamiento enzimatico de las proteinas alimenticias. **Journal. Agriculture Food Chemistry**, v. 6, p. 29-33, 1981.

AGUIAR, R. H. **Avaliação de girassol durante o armazenamento, para o uso como semente ou para extração de óleo**. 2001. 74 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.

ALASHI, A. M.; BLANCHARD, C. L.; MAILER, R. J.; AGBOOLA, S. O.; MAWSON, A. J.; HE, R.; ALUKO, R. E. Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 146, p. 500-506, 2014.

ALVES, F. V. **Composição química e qualidade fisiológica de semente de girassol de planta submetidas à competição intraespecífica**. 2010. 54 p. Dissertação (Mestrado Agroquímica). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2010.

BAMDAD, F.; SUN, X.; GUAN, L. L.; CHEN, L. Preparation and characterization of antimicrobial cationized peptides from barley (*Hordeun vulgare* L.) proteins. **Food Science and Technology**, v. 63, p. 29-36, 2015.

BARCELOS, C. A. **Aproveitamento das frações sacaríneas, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] para produção de bioetanol**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 334p., 2012.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BERNARDINI, R.D.; HARNEDY, P.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; MULLEN, A.M.; HAYES, M. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. **Food Chemistry**, v.124, p.1296–1307, 2011.

BIASUTTI, E. A. R. **Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da pancreatina**. 2006. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da UFMG, Minas Gerais, 2006.

BITZER, Z. T.; WOPPERER, A. L.; CHRISFIELD, B. J.; TAO, L.; COOPER, T. K.; VANAMALA, J.; ELIAS, R. J.; HAYES, J. E.; LAMBERT, J. D. Soy protein concentrate mitigates markers of colonic inflammation and loss of gut barrier function in vitro and in vivo. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 40, p. 201-208, 2017.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 77, p. 149-161, 2015.

BRITO, S. **Pesquisa estuda teor de umidade no sorgo para produção de biocombustível**. Jornal Eletrônico da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas-MG), ano

09, 64 ed. 2015. Disponível em: <<http://graos.cnpms.embrapa.br/noticia.php?ed=MzQ=&id=MTI0>>. Acesso em: set. 2016).

BRUZZETTI, A. R. Cresce produção de girassol. **Óleos & Grãos**, São Bernardo do Campo, ano 8, n.46, p.34 - 38, 1999.

CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C. R.; SILVA, A. L. S.; COELHO, J. V.; SEGALL, S. D.; SILVESTRE, M. P. C. Extração química e enzimática das proteínas do fuba de milho. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 884-890, 2006.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Produtos proteicos do girassol. In: LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. Girassol do Brasil. Londrina: **Embrapa Soja**, cap. 4, p. 51-68, 2005.

CASTRO, C.; FARIAS, J.R.B. Ecofisiologia do Girassol. In: LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. Girassol no Brasil. Londrina: **Embrapa Soja**, p. 163-218, 2005.

CEVALLOS-CASALS, B. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Impacto of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1485-1489.

CHAN, L. Y.; WANG, C. K. L.; MAJOR, J. M.; GREENWOOD, K. P.; LEWIS, J. R.; CRAIK, D. J. Isolation and characterization of peptides from *Momordica cochinchinensis* seeds. **Journal Nature Products**, v. 72, p. 1453-1458.

CHEN, J.; LIU, S.; YE, R.; CAI, G.; JI, B.; WU, Y. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: purification and characterization. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1684-1692, 2013.

DALL AGNOL, A.; VIEIRA, O. V.; LEITE, R. M. V. B. C. Origem e História do Girassol. Londrina: **Embrapa Soja**, p. 1-14, 2005.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2010.

**EMBRAPA SOJA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA SOJA.** Girassol. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=67&cod\\_pai=163](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=67&cod_pai=163)>. Acesso em: set. 2016.

FEPAGRO, EMATER/RS, FECOTRIGO. **Recomendações técnica para a cultura do milho no Rio Grande do Sul**. Programa multistitucional de difusão de tecnologia em milho. Porto Alegre, 194 p., 1998. (Boletim técnico, 3).

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. **Progress in Lipid Research**, v. 19, n. 1, p. 1-22, 1980.

GARCIA-LEIS, A.; JANCURA, D.; ANTALIK, M.; GARCIA-RAMOS, J. V.; SANCHEZ-CORTES, S.; JURASEKOVA, Z. Catalytic effects of silver plasmonic nanoparticles on the redox reaction leading to ABTS<sup>+</sup> formation studied using UV-

visible and Raman spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, p. 26562-26571, 2016.

GARCIA-MORA, P.; FRIAS, J.; PEÑAS, E.; ZIELINSKI, H.; GIMÉNEZ-BASTIDA, J. A.; WICZKOWSKI, W.; ZIELINSKA, D.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidante, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) protein by subtilisins. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 319-332, 2015.

GONZÁLEZ-PÉREZ, S., VEREIJKEN, J.M. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. **Journal. Science. Food Agriculture**, v. 87, p. 2173–2191, 2007.

HAMATO, N.; KOSHIBA, T.; PHAM, T-N, TATSUMI, Y.; NAKAMURA, D.; TAKANO, R. Trypsin and elastase inhibitors from bitter melon (*Momordica charantia* L.) seeds: purification, amino acid sequences, and inhibitory activities of four new inhibitors. **Journal Biochemistry**, v. 117, p. 432-437.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2012.

HERNANDEZ, J. F.; GAGNON, J.; CHICHE, I.; NGUYEN, T. M.; ANDRIEU, J. P.; HEITZ, A. Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. **Biochemistry**, v. 39, p. 5722-5730, 2000.

HUANG, D.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005

JIA, J.; MAA, H, ZHAO.; W, WANG Z.; TIAN, W.; LUO, L. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. **Food Chemistry**, v. 119, p. 336–342, 2010.

JIN, D.; LIU, X.; ZHENG, X.; WANG, X.; HE, J. Preparation of antioxidante corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidante peptides. **Food Chemistry**, v. 204, p. 427-436, 2016.

KACHRIMANIDOU, V.; NIKOLAOS, K.; ALEXANDRI, M.; STRATI, A.; GARDELI, C.; PAPANILOLAOU, S.; KOMAINTIS, M.; KOOKOS, I. K.; KOUTINAS, A. A. Integrated sunflower-based biorefinery for the production of antioxidante, protein isolate and poly(3-hydroxybutyrate). **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 106-113, 2015.

KARTIKA, I. A., PONTALIER, P. Y., RIGAL, L. Extraction of sunflower oil by twin screw extruder: Screw configuration and operating condition effects. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2302–2310, 2006.

KIELING, K. **Enzimas: aspectos gerais**. Material didático: Engenharia bioquímica. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro tecnológico. Florianópolis, 2002.

KORHONEN, H., & PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 945-960, 2006.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

**LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA (LSPA).** Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil – Janeiro 2016. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa\\_resultados.php?id\\_pesquisa=15](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=15)>. Acesso em: set. 2016.

LIU, X. L.; ZHEN, X. Q.; SONG, Z. L.; LIU, X. F.; KOPPARAPU, N. K.; WANG, X. J.; ZHENG, Y. J. Preparation of enzymatic pretreated corn gluten meal hydrolysate and in vivo evaluation of its antioxidante activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1147-1157.

LU, J.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

MAHATMANTO, T.; POTH, A. G.; MYLNE, J. S.; CRAIK, D. J. A comparative study of extraction methods reveals preferred solvents for cystine knot peptide isolation from *Momordica cochinchinensis* seeds. **Fitoterapia**, v. 95, p. 22-33, 2014.

MIELNIK, M.B.; AABY, K.; SKREDE, G. Commercial antioxidants control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat. **Meat Science**, v.65, p.1147–1155, 2003.

MIRANDA, L. C. **Obtenção e caracterização de hidrolisados enzimáticos de proteínas do farelo de soja.** 2012. 125 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2012.

MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos. *Química Nova*, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 308-316, 2014

NAVARRO, Z.; FONSECA, R.; TADIC, C. **Natural extract for controlling Botrytis Cinerea under Pre and Post-harvest conditions.** US Patent, n. 8, p. 252-346, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de lehninger.** 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NEVES, I. P. Dossiê técnico: cultivo de girassol. Rede de Tecnologia da Bahia (RETEC/BA), 2007. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br>>. Acesso em: set. 2015.

NGUYEN, G. K. T.; ZHANG, S.; NGUYEN, N. T. K.; NGUYEN, P. Q. T. CHIU, M. S.; HARDJOFO, A. Discovery and characterization of novel cyclotides originated from chimeric precursors consisting of albumin-1 chain a and cyclotide domains in the Fabaceae Family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 24275-24287, 2011.

O'BRIEN, R. D. Fat and oils: formulating and processing of applications. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 774 p., 2009.

OLIVEIRA, S. Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis. 2011. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRIGUEZ, M.; ÀLVAREZ, L.; SANZ, M.; MINGUILLON, G.; PERALES, L.; CORTECERO, M. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OSEGUERA-TOLEDO, M. E.; MEJIA, G.; DIA, V. P.; AMAYA-LLANO, S. L. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- $\kappa$ B pathways. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1175-1185, 2011.

PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L. S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p. 333-338, 2005.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2006. 6 p. (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular Técnica, 75).

PARK, S. Y.; LEE, J. S.; BAEK, H. H.; LEE, H. G. Purification and characterization of antioxidante peptides from soy protein hydrolysate. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 120-132, 2010.

PASTORE, G.M. **Isolamento de microrganismos produtores de invertase lactase e aproveitamento para a produção de prebióticos industrial**. IX Feira de Ciência e Arte. UNICAMP, Campinas – SP, 2010.

PIU, L. D.; TASSONI, A.; SERRAZANETTI, D. I.; FERRI, M.; BABINI, E.; TAGLIAZUCCHI, D.; GIANOTTI, A. Exploitation of starch industry liquid by-product to produce bioactive peptides from rice hydrolyzed proteins. **Food Chemistry**, v. 155, p. 199-206, 2014.

POWER, O.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Antioxidant peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidante activity and potential applications of milk-derived antioxidante peptides. **Amino Acids**, v. 44, p. 797-820, 2013.

PUCHALSKA, P.; GARCIA, M. C.; MARINA, M. L. Identification of native angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in comercial soybean based infant formulas using HPLC-Q-ToF-MS. **Food Chemistry**, v. 157, p. 62-69, 2014.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

QUEIROZ, V. A. V.; MORAES, E. A.; SCHAFFERT, R. E.; MOREIRA, A. V.; RIBEIRO, S. M. R.; MARTINO, H. S. D. Potencial funcional e tecnologia de processamento do sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], para alimentação humana. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, p. 180-195, 2011.

RAMACHANDRAN, S.; SINGH, S. K.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. **Bioresource Technology**, v.98, p. 2000-20009, 2007.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.**, p. 597- 635, 1998.

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

SCHIAVON, M.; ERTANI, A.; NARDI, S. Effects of na Alalfa protein hyddrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolismo in Zea mays L. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 56, p. 11800-11808, 2008.

SHIMIZU, M.; SAWASHITA, N.; MORIMATSU, F.; ICHIKAWA, J.; TAGUCHI, Y.; IJIRI, Y.; Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. **Thrombosis Research**, v. 123, p. 753–757, 2008.

SILVA, M. C.; SILVA, V. D. M.; LANA, A. M. Q.; SILVESTRE, M. P. C. Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de concentrado protéico do soro do leite. **Alimentos e nutrição Araraquara**, v. 20, n. 3, p. 395-402, 2009.

SIMONSEN, S. M.; SANDO, L.; IRELAND, D. C.; COLGRAVE, M. L.; BHARATHI, R.; GORANSSON, U. A continent of plant defense peptide diversity: cyclotides in Australian Hybanthus (Violaceae). **Plant Cell**, v. 17, p. 3176-3189, 2005.

SOARES, N. B. **Obtenção de hidrolisado proteico de torta de soja e avaliação de sua atividade antimicrobiana**. 2013. 89 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SOUSA, C. C. **Avaliação econômica parcial de dietas com o farelo e a torta de girassol na alimentação de vacas leiteiras**. 2008. 40 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2008.

SOUZA, A. C. P. **Extração de compostos fenólicos de subprodutos do processamento de semente de girassol**. 2013. 41 p. Trabalho de diplomação (Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SOUZA, G. F. M. V.; SANTOS, C. M.; SANTANA, D. G.; JÚNIOR, A. S. **Armazenamento de sementes de sorgo submetidas a diferentes graus de umidade de colheita**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 30, n. 4, p. 745-752, 2009.

STADTMAN, E. R. Protein oxidation and aging. **Free Radicals Research**, v. 40, p. 1250-1258, 2006.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica Ciência Biológica da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SUN, J.; HE, H.; XIE, B. J. Novel antioxidante peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 6646–6652, 2004.

SZYDLOWSKA-CZERNIAK, A.; TROKOWSKI, K.; SZLYK, E. Optimization of extraction conditions of antioxidants from sunflower shells (*Helianthus annuus* L.) before and after enzymatic treatment. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 123-131, 2011.

TONG, L.; FUJIMOTO, Y.; SHIMIZY, N.; TSUKINO, M.; AKSAKA, T.; KATO, Y. Rice  $\alpha$ -globulin decreases sérum cholesterol concentrations in rats fed a hypercholesterolemic diet ameliorates atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. **Food Chemistry**, v. 132, p. 194-200, 2012.

TONG, L.M. SASAKI, S. MCCLEMENTS, D.J. Y DECKER, E.A. “Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1473-1478, 2000.

TRABI, M.; CRAIK, D. J. Tissue-specific expression of head-to-tail cyclized miniproteins in Violaceae and structure determination of the root cyclotide *Viola hederacea* root cyclotide 1. **Plant Cell**, v. 16, p. 2204-2216, 2004.

UGOLINI, L.; CINTI, S.; RIGHETTI, L.; STEFAN, A.; MATTEO, R.; D’AVINO, L.; LAZZERI, L. Production of an enzymatic protein hydrolyzate from defatted sunflower seed meal for potential application as a plant biostimulant. **Industrial Crops and Products**, Article in press, 2014.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Aminoácidos e proteínas. Disponível em : <http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/aminoacidos%20e%20proteinas2012.htm>. Acesso em: mar. 2017.

VIOQUE, J., SÁNCHEZ-VIOQUE, R., CLEMENTE, A., PEDROCHE, J., YUST, M. M., MILLÁN, F. “Péptidos bioactivos en proteínas de reserva”. **Grasas y Aceites**, v. 51, p.361-365, 2000.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WANG, X.; CHEN, H.; FU, X.; LI, S.; WEI, J. A novel antioxidante and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: biochemical characterization and molecular docking study. **Food Science na Technology**, v. 75, p. 93-99, 2017.

WEISZ, G. M.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MS. **Food Chemistry**, v. 115, p. 758-765, 2009.

WHITHAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food science**. 2ª edição. California: Marcel Dekker, 1994.

WU, Q.; DU, J.; JIA, J. KUANG, C. Production of ACE inhibitory peptides from sweet sorghum grain protein using alcalase: hydrolysis kinetic, purification and molecular docking study. **Food Chemistry**, v. 199, p. 140-149, 2016.

XIE, Z.; HUANG, J.; XU, X.; JIN, Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 111, p. 370-376, 2008.

YU, G.; LI, J.; HE, H.; HUANG, W.; ZHANG, W. Ultrafiltration preparation of potente bioactive corn peptide as alcohol metabolism stimulator in vivo and study on its mechanism of action. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, p. 161-167, 2011.

ZHANG, J., ZHANG, H., WANG, L., GUO, X., WANG, X., YAO, H. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: Identification of the active peptide. **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 709–719, 2009.

ZHAO, Y.; WANG, J.; BALLEVRE, O.; LUO, H.; ZHANG, W. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. **Hypertens Research**, v. 35, p. 370-374, 2012.

ZHONG, S; MA, C; LIN, Y.C; LUO, Y. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp ( *Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. **Food Chemistry**, v.126, p.1636–1642, 2011.

## **CAPÍTULO I**

### **ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE GRÃOS DE MILHO E SORGO, FARELO E GRÃOS DE GIRASSOL E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE GIRASSOL**

**(Normas de acordo a revista Food Chemistry)**

## RESUMO

As proteínas vêm sendo cada vez mais estudadas, pois possuem propriedades benéficas a saúde humana, podendo ser utilizadas na área alimentícia e farmacêutica. Uma das propriedades das proteínas é a capacidade de evitar a oxidação de biomoléculas no processo mediado por radicais livres no corpo humano e em alimentos, denominadas proteínas com ação antioxidantes. O objetivo deste trabalho foi determinar a composição centesimal, extrair proteínas utilizando cinco diferentes métodos para cada amostra (grãos de milho, sorgo, girassol e farelo de girassol), determinar a atividade antioxidante das frações proteicas através dos métodos ABTS, DPPH e FRAP e realizar a hidrólise enzimática do farelo de girassol com enzimas proteolíticas (Neutrase e Flavourzyme). O farelo de girassol foi a amostra que apresentou o maior teor de proteínas (27,8 g/ 100 g), seguido dos grãos de girassol (15,12 g/100g), sorgo (9,87 g/100g) e milho (6,6 g/100g). Os métodos mais eficazes, que resultaram em maior extração proteica e atividade antioxidante, foram os métodos em que se utilizou  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (5mM, pH 8,0) e o método de extração com  $\text{H}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$  (2:3), ambos associados ao tratamento térmico. O maior teor de proteínas extraídas foi de 797,9, 303,8 e 11296,5  $\mu\text{g/g}$  e a maior atividade antioxidante de 34417,5, 9732,6 e 47473,1  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup>, sendo verificadas nos grãos de girassol desengordurados por soxhlet e por Bligh & dyer, e farelo de girassol, respectivamente. Em relação a hidrólise enzimática, o farelo de girassol foi o substrato que apresentou estatisticamente o maior grau de hidrólise, 11,06%, quando se utilizou a enzima Neutrase, seguido pela enzima Flavourzyme com 5,43%.

A hidrólise enzimática realizada sobre os extratos proteicos resultou em aumento da captura de radicais ABTS com 32868,94  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> utilizando-se a enzima Neutrase e 33924,39  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> para

a enzima Flavourzyme. Já em relação ao método de determinação de atividade antioxidante, foi verificado decréscimo da captura de radicais, com valores de 693,90  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> para a enzima Neutrase e 340,24  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> para a enzima Flavourzyme. Os extratos proteicos, assim como os hidrolisados obtidos, apresentaram elevada atividade antioxidante, demonstrando grande potencial como alternativa aos antioxidantes sintéticos.

**Palavras-chave:** Métodos de extração. Rendimento proteico. Ensaio de eliminação de radical. Enzimas proteolíticas.

## ABSTRACT

Proteins have been increasingly studied, since they have beneficial properties to human health, being able to be used in the alimentary and pharmaceutical area. One of the properties of proteins is the ability to prevent the oxidation of biomolecules in the process mediated by free radicals in the human body and in food, called proteins with antioxidant action. The aim of this work was to determine the centesimal composition, to extract proteins using five different methods for each sample (corn, sorghum, sunflower and sunflower meal), to determine the antioxidant activity of the protein fractions through the ABTS, DPPH and FRAP methods and to perform the enzymatic hydrolysis of sunflower meal with proteolytic enzymes (Neutrased and Flavourzyme). The sunflower meal was the sample with the highest protein content (27.8 g / 100 g), followed by sunflower (15.12 g / 100 g), sorghum (9.87 g / 100 g) and corn (6.6 g / 100g). The most efficient methods, which resulted in higher protein extraction and antioxidant activity, were the  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (5mM, pH 8.0) and  $\text{H}_2\text{O} / \text{C}_2\text{H}_6\text{O}$  (2:3) extraction methods, both methods were associated with the heat treatment. The highest protein content was 797.9, 303.8 and 11296.5  $\mu\text{g} / \text{g}$  and the highest antioxidant activity of 34417.5, 9732.6 and 47473.1  $\mu\text{g}$  trolox.g equivalent of sample<sup>-1</sup>, being verified in sunflower grains defatted by soxhlet and by Bligh & dyer, and sunflower meal, respectively. In relation to the enzymatic hydrolysis, the sunflower meal was the substrate that presented the highest degree of hydrolysis statistically (11.06%) when we used Neutrased enzyme, followed by the Flavourzyme enzyme with 5.43%. The enzymatic hydrolysis performed on the protein extracts resulted in an increase in the capture of ABTS radicals with 32868.94  $\mu\text{g}$  of trolox.g equivalent of sample<sup>-1</sup> using the Neutrased enzyme and 33924.39  $\mu\text{g}$  of trolox.g equivalent of sample<sup>-1</sup> for the Flavourzyme enzyme. Regarding the method of determining antioxidant activity was

observed a decrease of the capture radicals, with values of 693.90 ug equivalent trolox.g<sup>-1</sup> sample for Neutrased enzyme and 340.24 ug equivalent trolox.g of sample<sup>-1</sup> for the enzyme Flavourzyme. The protein extracts, as well as the hydrolysates obtained, presented high antioxidant activity, showing great potential as an alternative to synthetic antioxidants.

**Key words:** Extraction methods. Protein efficiency. Scavenging assay radical. Proteolytic enzymes.

## 2.1 Introdução

Nos últimos anos, os isolados proteicos com propriedades antioxidantes oriundos de plantas e animais vêm sendo obtidos para combater radicais livres, inativar quelantes de metais pró-oxidativos (SHEN *et al.*, 2010), quebrar a reação em cadeia auto-oxidativo e/ou reduzir concentrações localizadas de O<sub>2</sub> (ASIMI *et al.*, 2013). Além das proteínas antioxidantes serem obtidas de fontes naturais (vegetais e animais), elas possuem baixo peso molecular, fácil absorção e pouco ou nenhum efeito colateral ao corpo humano (SARMADI e ISMAIL, 2010), e torna importante seu estudo, uma vez que antioxidantes sintéticos podem causar efeitos tóxicos no organismo (QIAN *et al.*, 2008).

Os antioxidantes sintéticos, tais como butil hidroxil toluene (BHT) e butil hidroxilanisol (BHA) têm sido amplamente utilizados em sistemas alimentares e biológicos para captar radicais livres, porém têm potenciais riscos para a saúde humana (BARLOW e SCHLATTER, 2010), estando relacionados à carcinogênese (SUJA *et al.*, 2004).

Os problemas com os antioxidantes sintéticos têm sido grande preocupação, pelas consequências ao corpo humano, por isso, os estudos dos antioxidantes de fontes naturais vêm aumentando gradativamente, tornando-os substitutos eficientes dos antioxidantes sintéticos. Os antioxidantes naturais (flavonoides e ácidos fenólicos, taninos, vitamina C e E) têm diversas propriedades biológicas, tais como anti-inflamatórios, anticancerígenos e antiateroscleróticos. Além disso, estão relacionados a redução da incidência de doenças coronárias e contribuem para a manutenção e equilíbrio da microbiota intestinal (OROIAN e ESCRICHE, 2015).

A procura por antioxidantes naturais também se estendeu para proteínas e peptídeos de origem animal e vegetal, como proteínas de soja, milho, trigo, girassol,

proteínas lácteas e albumina do ovo (XUE et al., 2009; ZHANG et al., 2010; GONZALEZ-PEREZ e VEREIJKEN, 2007).

A investigação de diferentes métodos para extração de proteínas é importante, pois os solventes utilizados para extração variam de acordo com suas propriedades (polaridade, pH e salinidade) e condições (com ou sem tratamento térmico), podendo assim, avaliar sua eficiência em diferentes amostras (MAHATMANTO *et al.*, 2014).

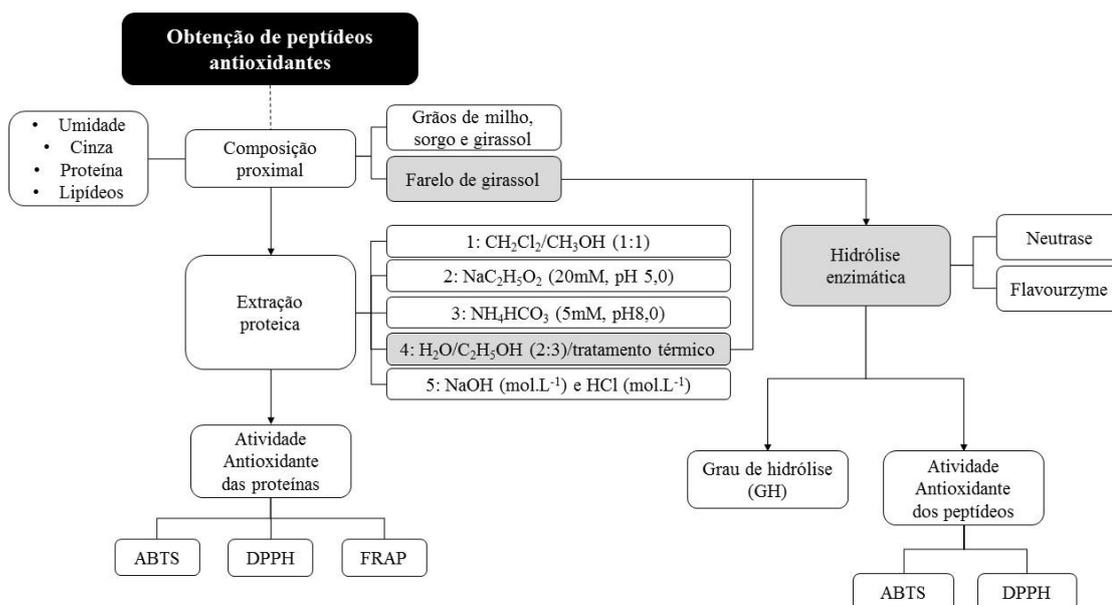
Além disso, faz-se necessário o uso de diferentes métodos para avaliar a capacidade antioxidante de extratos ou compostos, pois nas moléculas existem diversos tipos de radicais e diferentes sítios de ação. Dificilmente um único método é capaz de representar de forma segura e precisa a atividade antioxidante de um determinado composto (SMET *et al.*, 2008). As amostras contendo os compostos fenólicos possuem propriedades potencialmente antioxidantes pela presença de um anel aromático na sua estrutura química. Acredita-se que esses compostos podem estabilizar espécies reativas que possuem elétrons não emparelhados, atuando como sequestradores de radicais livres (FARDET *et al.*, 2008).

As proteínas isoladas de grãos provenientes na região Centro-Oeste (milho, sorgo e girassol) possuem significante teor de proteínas, e torna interessante o estudo de isolamento de proteínas através de diferentes métodos de extração proteica. Ademais, o uso do coproduto provenientes da extração lipídica dos grãos de girassol se torna imprescindível por agregar valor a eles em uma gama de utilização, além de somente serem utilizados na alimentação animal.

Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição proximal, extrair proteínas a partir de cinco diferentes métodos para cada amostra (grãos de milho, sorgo, girassol e farelo de girassol), determinar a atividade antioxidante das frações proteicas através dos métodos ABTS, DPPH e FRAP e realizar a hidrólise com enzimas proteolíticas (Neutrase e Flavourzyme) para o farelo de girassol.

## 2.2 Material e Métodos

A determinação da composição proximal, extração proteica das diferentes amostras, assim como a determinação da atividade antioxidante por diferentes métodos (ABTS, DPPH e FRAP) e hidrólise enzimática foram realizadas conforme esquema apresentado na Figura 1, visando a obtenção de peptídeos com atividade antioxidante.



**Figura 1:** Esquema genérico aplicado para obtenção dos peptídeos com atividade antioxidante.

### 2.2.1 Materiais

Os grãos de milho, sorgo, girassol e farelo de girassol foram doados pelas empresas locais situadas no município de Rio Verde, Goiás. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os grãos e farelo foram triturados em moinho de facas e homogeneizado até granulometria  $\leq 0,250$  mm (60 mesh) e armazenados em embalagens apropriadas a 4°C para posterior uso.

As enzimas proteolíticas utilizadas na hidrólise enzimática foram Neutrase e Flavourzyme. A neutrase 0.8L é um metalprotease de *Bacillus amyloliquefaciens* que hidrolisa aleatoriamente ligações peptídicas internas e também facilita a síntese enzimática de oligopéptidos pela reação proteólise reversa com metal zinco como cocatalisador, com atividade de 0,8 AU/g. Uma Unidade Anson (AU) equivale a um miliequivalente de tirosina liberada da hidrólise de hemoglobina por minuto. A Flavourzyme 1000L® é uma exopeptidase de *Aspergillus oryzae*, com atividade de 1 LAPU/g. Uma LAPU (Unidade Leucina Aminopeptidase) é a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu$ mol de leucina- $\rho$ -nitroanilida por minuto.

## 2.2.2 Composição química

A composição química dos grãos (girassol, milho e sorgo) e farelo (girassol) foram determinados segundo os métodos descritos na AOAC (1990). A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa ventilada (modelo da estufa) a 105 °C até o peso constante; as cinzas, por incineração em mufla a 550 °C; os lipídeos, por extração de éter de petróleo em Soxhlet (modelo); as proteínas foram determinadas pelo método de Kjeldahl e os carboidratos, por diferença (100 – (umidade + cinzas + proteínas + lipídeos)). O fator de conversão de nitrogênio quantificado em proteína foi de 6,25 para o sorgo e milho, e 5,30 para o girassol.

## 2.2.3 Desengorduramento dos grãos de girassol

Os grãos de girassol triturados foram desengordurados utilizando os métodos de Bligh & Dyer (frio) utilizando mistura de clorofórmio, metanol e água; e Soxhlet (quente) utilizando éter de petróleo. Se faz necessário o desengorduramento dos grãos como forma de incrementar a extração de proteínas - uma vez que tal matéria-prima apresenta conteúdo de lipídeos superior a 57,7g/100g – sendo os produtos obtidos após a extração, girassol desengordurado, utilizados nas etapas de extração proteica.

## 2.2.4 Métodos de extração proteica

Para a extração de proteínas dos grãos (milho, sorgo e girassol) e farelo (girassol) foram utilizados 5 métodos, seguindo metodologias de MAHATMANTO *et al.* (2014) e OSEGUERA-TOLEDO *et al.* (2011) com modificações. Para padronização dos métodos, fixou-se a quantidade de amostra em relação aos solventes utilizados. No final de cada extração proteica, o material foi armazenado a -18°C em tubos falcon devidamente identificados para posterior utilização.

### 2.2.4.1 Método 1: Extração Diclorometano/Metanol – CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:1)

Foi adicionado 5 mL da combinação de solvente Diclorometano/Metanol na proporção 1:1 por g de grãos triturados (granulometria ≤ 0,250 mm). A mistura foi agitada

em Vórtex em velocidade máxima durante 1 hora a 25°C e centrifugada (4.000 x g) durante 20 min a 25°C. O sobrenadante, contendo o extrato proteico, foi recolhido e transferido para tubo Falcon de 15 mL, sendo a mistura de solventes evaporada em banho a 50°C em capela de exaustão. Em seguida, foi reconstituído o volume inicial, adicionando-se água destilada no mesmo volume do solvente evaporado.

#### 2.2.4.2 Método 2: Extração com Acetato de Sódio – NaC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (20mM, pH 5,0)

Foi adicionado 5 mL de Acetato de Sódio - NaOAc (20mM, pH 5,0) por g de grãos triturados (granulometria  $\leq$  0,250 mm). A mistura foi agitada em Vórtex em velocidade máxima durante 1 hora a 4°C. Em seguida, foi centrifugado (4.000 x g) durante 20 min a 25°C. O sobrenadante, contendo o extrato proteico, foi recolhido e transferido para Tubo Falcon de 15 mL, e foi adicionado 1 mL de acetona refrigerada. A mistura foi agitada em Vórtex durante 5 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubo Falcon de 15 mL e a acetona evaporada em banho a 50°C em capela de exaustão. Posteriormente, foi reconstituído o volume inicial, adicionando-se água destilada no mesmo volume do solvente evaporado.

#### 2.2.4.3 Método 3: Extração com Bicarbonato de Amônia/tratamento térmico - NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (5mM, pH 8,0)

Foi adicionado 5 mL de solvente por g de grãos triturados (granulometria  $\leq$  0,250 mm). A mistura foi agitada em Vórtex em velocidade máxima durante 1 hora a 25°C e em seguida, centrifugado (4.000 x g) à 25°C durante 20 min. O sobrenadante, contendo o extrato proteico, foi recolhido e transferido para tubo Falcon de 15 mL. Em seguida, foi incubado a 100°C por 5 min, centrifugado (4.000 x g) a 25°C durante 20 min e recolhido o sobrenadante. O volume inicial foi reconstituído, adicionando-se água destilada no mesmo volume do solvente evaporado.

#### 2.2.4.4 Método 4: Extração com Água/etanol (2:3)/tratamento térmico – H<sub>2</sub>O/C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH

Foi adicionado 3 mL de etanol por g de grãos triturados (granulometria  $\leq$  0,250 mm). A mistura foi agitada em Vórtex brevemente para homogeneização. Em seguida,

foi adicionado 2 mL de água destilada, sendo a mistura agitada em Vórtex e incubado a 100°C durante 5 min. Posteriormente, a mistura foi centrifugada (4.000 x g) a 25°C durante 20 min, sendo o sobrenadante recolhido. O volume inicial foi reconstituído, adicionando-se água destilada no mesmo volume do solvente evaporado.

#### 2.2.4.5 Método 5: Extração alcalina e precipitação ácida – NaOH (mol.L<sup>-1</sup>) e HCl (mol.L<sup>-1</sup>)

Foi adicionado 5 mL de água destilada por g de grãos triturados (granulometria  $\leq 0,250$  mm). O pH da mistura foi ajustado para 8,0 com NaOH 0,2 M e a extração realizada pela agitação em mesa agitadora Shaker durante 1 h a 35°C. A mistura foi centrifugada (4.000 x g) durante 20 min a 25°C, sendo o sobrenadante coletado e armazenado. O precipitado foi extraído novamente em condições idênticas e ambas as extrações foram combinadas. Em seguida, o pH foi ajustado para 4,3 com ácido clorídrico diluído, e o precipitado recolhido por centrifugação (4.000 x g) durante 20 min a 25°C. O pH foi ajustado para 8,0 com NaOH 0,2 M, para solubilização das proteínas, seguido por uma segunda precipitação em pH 4,3, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado, contendo o extrato proteico, foi ressuspendido em água destilada.

#### 2.2.5 Dosagem da proteína e peptídeos

Para determinação de proteína e peptídeos nas amostras foi utilizado o método Lowry *et al.* (1951), onde 0,5 mL da amostra foi adicionado a 5 mL da mistura reativa contendo carbonato de sódio anidro, hidróxido de sódio, sulfato de cobre e tartarato de sódio. Após o período de 10 min foi adicionado o reagente de Folin-Ciocalteau diluído 1:5, e após período de 30 min a absorbância da solução foi verificada em espectrofotômetro em 750 nm. A concentração de proteínas foi determinada através de curva de calibração de dez pontos, em concentração de 40 a 400 µg de albumina de soro bovino.

#### 2.2.6 Determinação da Atividade Antioxidante

A determinação da atividade antioxidante dos extratos e hidrolisados proteicos foi realizada através dos métodos baseados no sequestro de radicais livres (ABTS e

DPPH) e na redução do íon férrico (FRAP). A capacidade antioxidante dos três métodos foi calculada utilizando curva padrão de Trolox conhecida (Apêndice B) e suas respectivas porcentagens de inibição. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de Trolox equivalente por grama de amostra ( $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra).

#### 2.2.6.1 Método ABTS

A capacidade antioxidante equivalente ao Trolox foi estimada de acordo com procedimento proposto por Kuskoski *et al.* (2004). O radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  foi preparado a partir da reação de 7 mM de solução aquosa de ABTS com 145 mM de persulfato de potássio, e a mistura foi mantida em repouso à temperatura ambiente por 12-16 horas, na ausência de luz. Em seguida, a solução de ABTS foi diluída com etanol para obter uma absorbância de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm. Alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  das amostras foram adicionadas a 3 mL da solução diluída de ABTS, e as absorbâncias da mistura foram registradas ao final de seis minutos.

#### 2.2.6.2 Método DPPH

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1picril-hidrazila) foi determinada conforme proposto por Brand-Williams *et al.* (1995), com modificações. Alíquotas de 0,1 mL dos extratos foram adicionadas a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH (25 mg/L), e mantidas à temperatura ambiente, na ausência de luz, por 120 min. A absorbância das amostras foram determinadas a 515 nm, em espectrofotômetro UV/Visível.

#### 2.2.6.3 Método FRAP

O ensaio da capacidade de redução do íon férrico foi conduzido de acordo com técnica descrita por Pulido *et al.* (2000), com modificações. O reagente FRAP foi obtido a partir da mistura de tampão acetato (0,3 M, pH 3,6), solução de TPTZ (10 mM) e solução de cloreto férrico (20 mM), em uma proporção de 100:10:10. Alíquotas de 90  $\mu\text{L}$  das amostras foram misturadas com 270  $\mu\text{L}$  de água e 2,7 mL do reagente FRAP, e a absorbância da mistura foi medida em 595 nm, após incubação a 37°C por 30 minutos.

### 2.2.7 Obtenção de hidrolisados proteicos

A hidrólise enzimática foi realizada pelas enzimas Neutrase e Flavourzyme sobre o substrato farelo de girassol na proporção 5:100 (enzima:substrato). Para tal, 100 mL de extrato proteico do farelo de girassol, em pH 7,0 foi incubado a 50°C, sendo posteriormente adicionado a enzima na proporção adequada, dando início a reação. O grau de hidrólise foi verificado nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos, pela retirada de alíquotas de 2 mL, as quais eram adicionadas de 500 µL de HCl 0,1N para interrupção da reação de hidrólise. Em seguida, as alíquotas foram centrifugadas a 13.000xg, 25°C por 15 minutos. O sobrenadante, contendo os peptídeos resultantes da hidrólise, foram congelados para análise posterior da sua atividade antioxidante (CONTRERAS *et al*, 2011).

### 2.2.8 Determinação da concentração proteica e Grau de hidrólise (%)

Para determinação da concentração de proteína e peptídeos nas amostras foi utilizado o método de Lowry *et al.* (1951). Meio mililitro da amostra foi acrescido de 5 mL da mistura reativa contendo carbonato de sódio anidro, hidróxido de sódio, sulfato de cobre e tartarato de sódio. Após período de 10 minutos foi adicionado reagente de Folin-Ciocalteau diluído 1:3, e após período de 30 minutos a absorbância da solução foi avaliada a 660 nm. O resultado foi quantificado com base em uma curva padrão de albumina de soro bovino.

O grau da hidrólise (GH) foi calculado segundo a metodologia descrita por Zhong *et al.* (2007), levando-se em consideração a concentração de proteínas hidrossolúveis (aminoácidos e peptídeos) no sobrenadante final e a concentração de proteínas hidrossolúveis no substrato inicial da reação, conforme Equação 1.

$$\text{grau de hidrólise} = \frac{\text{teor de peptídeo}}{\text{teor de proteína}} \times 100 \quad (1)$$

### 2.2.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para detectar diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

## 2.3 Resultados e Discussão

### 2.3.1 Composição química

Os dados referentes a composição química dos grãos de milho (*Zea mays* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), grãos e farelo de girassol (*Helianthus annuus* L.) são apresentados na Tabela 1, e pode-se destacar o elevado teor de proteínas encontrado no farelo de girassol (27,8 g/100g), seguido do grão de girassol (15,12 g/100g), sorgo (9,87 g/100g) e milho (6,62 g/100g), tornando-os ótimos substratos para obtenção de peptídeos com atividade antioxidante.

**Tabela 1:** Média e desvio padrão da composição proximal dos grãos de milho, sorgo e girassol e farelo de girassol.

<b>Componentes (g/100g)</b>	<b>Milho</b>	<b>Sorgo</b>	<b>Girassol</b>	<b>Farelo de Girassol</b>
<b>Umidade</b>	8,87±0,22	8,23±0,11	1,08±0,03	7,38±0,03
<b>Cinzas</b>	0,96±0,02	1,15±0,03	2,44±0,01	5,00±0,01
<b>Proteínas</b>	6,62±0,35	9,87±0,85	15,12±0,36	27,80±0,73
<b>Lipídeos</b>	4,45±0,11	4,32±0,11	57,70±0,23	2,32±0,09
<b>Carboidratos</b>	79,01±0,42	76,41±0,96	23,64±0,23	57,47±0,57
<b>Valor calórico (kcal/g)</b>	382,93±1,34	384,05±0,75	674,41±1,20	362,04±0,32

Sabe-se que fatores como o tipo e as condições edafoclimáticas, a variedade genética e o processamento agroindustrial podem influenciar a composição química e, conseqüentemente, o valor de energia metabolizável dos subprodutos de origem vegetal (FERNANDES *et al.*, 2013).

De acordo com Castro *et al.* (2009), o milho apresenta 9,23% de umidade, 8,05% de proteínas, 5,69% de lipídeos, 1,15% de cinzas e 63,30% de carboidratos. Para Paes (2006), o milho apresenta 4% de lipídeos e 9,5% de proteínas. Sendo que para Portas *et al.* (2001), as proteínas apresentam teor de 9% e 8,5% para Fialho *et al.* (2002). Segundo TACO (2011) e Carellos (2003), as proteínas no milho apresentam teores de 7,2% e 8,60%, respectivamente. Observa-se que os valores apresentados na tabela possuem uma pequena diferença em relação ao teor de lipídeos, cinzas e umidade. No entanto, para as proteínas há maior variação, com diferença de até 30%, e pode ser relacionado a

influência do nitrogênio dos grãos em relação as condições de cultivo, umidade do solo, nitrogênio do solo, entre outros fatores (FIALHO *et al.*, 2002).

A composição química dos grãos de sorgo é semelhante ao dos grãos de milho e, também, varia de acordo com o genótipo. Em média, apresenta em sua composição 79% de carboidratos, 14% de umidade, 3,37% de lipídeos, 1,15% de cinzas, 1,4% de fibra bruta e 9,8% de proteínas (BARCELOS, 2012). Assim, como os teores do milho, os grãos de sorgo também possuem diferenças de valores, de acordo com cada referência. Para Mehmood *et al.* (2008), os teores de lipídeos podem variar de 5-8,4%, entretanto, USD (2010) encontrou 3% de lipídeos e 11,3% de proteínas. Enquanto para Fialho *et al.* (2002), o valor encontrado para proteínas é 9,8%, e se assemelha aos resultados experimentais do trabalho (9,8%).

Outro fator que define o valor proteico do alimento é determinado pela sua composição em aminoácidos essenciais, em que o aproveitamento biológico dos aminoácidos (disponibilidade) depende também da digestibilidade da proteína (NAVES *et al.*, 2004). Em relação aos grãos de milho, os aminoácidos essenciais que possuem baixo teor são lisina e triptofano. Para os grãos de sorgo, os aminoácidos deficientes são arginina, lisina, glicina, tirosina e metionina. Esse desequilíbrio de aminoácidos pode ocasionar efeitos negativos ao aproveitamento da proteína (QUEIROZ *et al.*, 2011).

Para os grãos de girassol, em sua composição química, os teores de proteínas e lipídeos possuem uma variação em relação aos dados obtidos no trabalho, quando comparados aos valores de referência. Para Carrão-Panizzi e Mandarino (2005) os teores de proteínas e lipídeos apresentam 24% e 47,5%, para Nimet (2009) 27% e 41,3% e para Oliveira *et al.* (2007) apresentam 16,7% e 38,2%, e, ainda, para Fernandes (2013) tem-se 24,6% e 46,5%, respectivamente. Para teor de umidade e cinzas tem-se 4,8% e 4% (CARRÃO-PANIZZI e MANDARINO, 2005), 5,9% e 4% (NIMET, 2009), 6,4% e 2,8% (OLIVEIRA *et al.*, 2007), respectivamente.

De acordo com Oliveira *et al.* (2007), o farelo de girassol possui 9,8% de umidade, 4,6% de cinzas, 31,4% de proteínas e 1,1% de lipídeos. Os teores de proteínas e lipídeos podem ser encontrados em maior variedade percentual, como 50% e 3,1% (PINTO e FONTANA (2001)), 28,1% e 2,9% (TAVERNARI *et al.*, 2010), 30,2% e 1,8% (ROSTAGNO *et al.*, 2011), respectivamente. Essa variação de valores dos componentes químicos do grão e farelo de girassol se dá pelas condições edafoclimáticas, tipo, variedade genética e também pelo processamento agroindustrial. Esses fatores podem

influenciar a composição química e, conseqüentemente, o valor de energia metabolizável dos subprodutos de origem vegetal

### 2.3.2 Análise e comparação entre as extrações proteicas

As amostras de grãos de girassol foram primeiramente desengorduradas por dois métodos: Soxhlet, método a quente e Bligh & dyer, método a frio. Foi necessário o desengorduramento para conseguir melhor extração de proteínas dos grãos de girassol. Dessa maneira, além de compararmos a melhor extração proteica dos grãos, é possível também comparar a extração de proteínas entre métodos diferentes de extração lipídica dos grãos de girassol.

As amostras de grãos de milho, sorgo e os grãos e farelo de girassol desengordurados foram utilizados como matéria-prima para a extração proteica a partir da utilização de cinco diferentes métodos de extração combinando mistura de solvente e tratamentos térmicos específicos.

Na Figura 2, é possível verificar a eficiência da extração proteica para cada amostra. O sorgo foi a matéria-prima que foi possível obter a maior extração proteica, quando utilizado o método 1, cerca 206 ug/g. No método de extração 2, foi possível extrair aproximadamente 227 ug/g de proteínas e 11296 ug/g na extração 3 utilizando o farelo de girassol como matéria-prima. Na extração 4, novamente, o farelo de girassol foi a amostra em que se obteve o maior conteúdo de proteínas extraídas, cerca de 1360 ug/g. No método de extração 5, os grãos de girassol desengordurado pelo método de Soxhlet (quente) foi que se evidenciou a maior extração proteica, com aproximadamente 130 ug/g.

A polaridade de cada um dos solventes utilizados contribui para a extração proteica das amostras de milho, sorgo e girassol. Isso se deve, também, à polaridade dos resíduos de aminoácidos que constituem as proteínas, uma vez que cada grão possui uma proteína específica (maior quantidade dentro do grupo de proteínas de cada grão) que interage com mais facilidade com determinados solventes e, conseqüentemente, faz com que essa seja extraída (MAHATMANTO *et al.*, 2014).

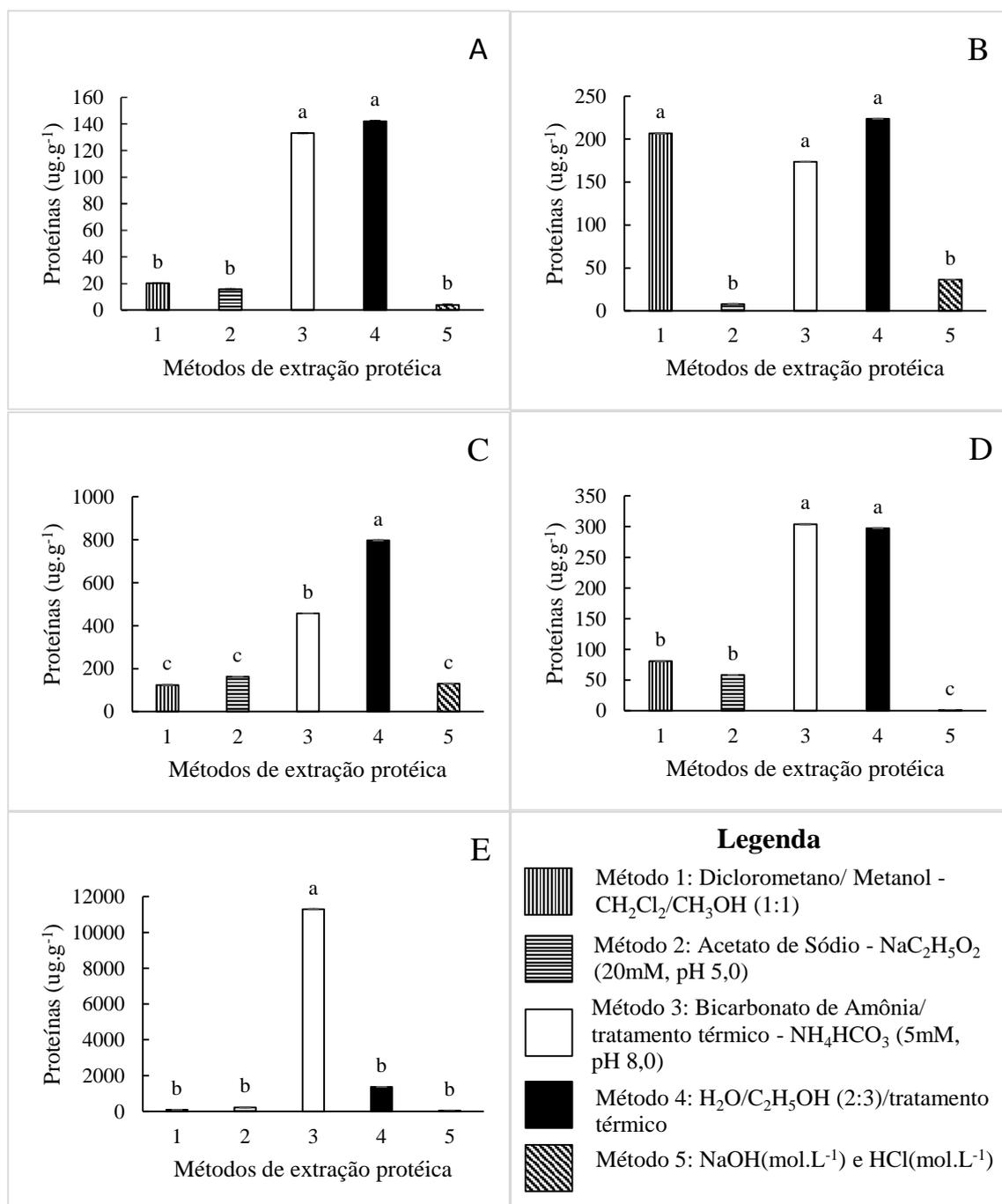
Para as amostras de milho, o método 4 foi o mais eficiente, com aumento de 97% do teor de proteínas extraídas, quando comparado ao método 5. Tal extração pode ser relacionada a presença da zeína, proteína majoritária do grão de milho. A zeína é constituída de 17 aminoácidos, sendo a maior porcentagem destes apolares. Segundo ARGOS *et al.* (1982), os aminoácidos apolares estão organizados em estrutura circular,

unidos através de três segmentos polares, repetidas em nove hélices sequenciais (Up) e antiparalelas (Dn) em superfície plana molecular, formando um empilhamento dessas hélices por interações de resíduos de glutamina, parte polar nas extremidades da cadeia. Dessa maneira, os melhores solventes para interagir com a zeína são álcoois alifáticos após redução das ligações dissulfetos (ANDERSON e LAMSL, 2011; FORATO *et al.*, 2000) o que justifica a eficiência do método 4 (água e etanol) para a extração das proteínas do grão de milho.

O método 4 foi o mais eficiente para extração de proteínas nas amostras de sorgo, cerca de 96% a mais que o método 2. Assim como o milho, as principais proteínas do grão de sorgo são as prolaminas, classificadas de acordo com sua estrutura, solubilidade e peso molecular em  $\alpha$ -kafirina (23-27kDa),  $\beta$ -kafirina (16-20kDa) e  $\gamma$ -kafirinas. As  $\alpha$ -kafirinas representam 80% de proteína do grão e são hidrofóbicas (ESPINOSA-RAMÍREZ e SERNA-SALDÍVAR, 2016). Por serem da mesma família, seqüências de aminoácidos podem ser semelhantes, porém, a quantidade de repetições de  $\alpha$ -hélice de diferenciam (SOUZA *et al.*, 2015). Desta forma, a presença de aminoácidos polares e apolares ao longo da formação das proteínas de sorgo faz com que haja interação com solvente etanol e água, facilitando a extração das proteínas.

Ao realizar a comparação da extração de proteínas das três amostras de grãos de girassol (método industrial, Soxhlet e Bligh & Dyer), percebe-se que o farelo de girassol (método industrial) possui uma quantidade superior de proteínas extraídas a partir do método 3, quando comparado aos grãos desengordurados. A diferença no teor de proteínas extraídas entre tais amostras pode chegar a 11000 ug/g, aproximadamente. Essa diferença pode estar relacionada aos distintos métodos de extração lipídica aplicado as amostras, uma vez que o farelo de girassol, método industrial, passa por dois processos distintos: uma etapa química, em que se utiliza hexano, e uma etapa mecânico, realizada através do uso de prensa. Já as demais amostras de grãos são desengorduradas pelo método de Soxhlet em que se utiliza o éter de petróleo e, ainda pelo método de Bligh & Dyer, com aplicação de uma mistura de clorofórmio, metanol e água.

Para o farelo de girassol, o método 3 foi o mais eficiente, extraindo a maior quantidade de proteínas entre todos os ensaios. Para as amostras de girassol desengorduradas pelos métodos de Soxhlet, o método 4 foi o que obteve a maior extração de proteínas, enquanto o método 3 foi o mais eficiente para as amostras desengorduradas pelo método de Bligh & Dyer.



**Figura 2:** Comparação estatística do Rendimento das extrações proteicas em diferentes métodos para as amostras: (A) Milho, (B) Sorgo, (C) Girassol Soxhlet, (D) Girassol Blich dyer e (E) Farelo de Girassol. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Como mencionado anteriormente, vários fatores podem contribuir para que ocorra diferenças entre extrações realizadas a partir de uma mesma amostra, porém submetidas a métodos diferentes de extração de lipídeos. Entre esses fatores pode-se mencionar o tipo de solvente e também solventes residuais do processo de extração lipídica que interagem com os solventes na fase da extração proteica. Outro ponto

importante é a ocorrência de competição entre os solventes da extração proteica. No método 3, verifica-se este tipo de competição em que o  $\text{NH}_4^+$  protona o hidrogênio da proteína, tornando assim um dos métodos mais eficientes em extrair proteínas.

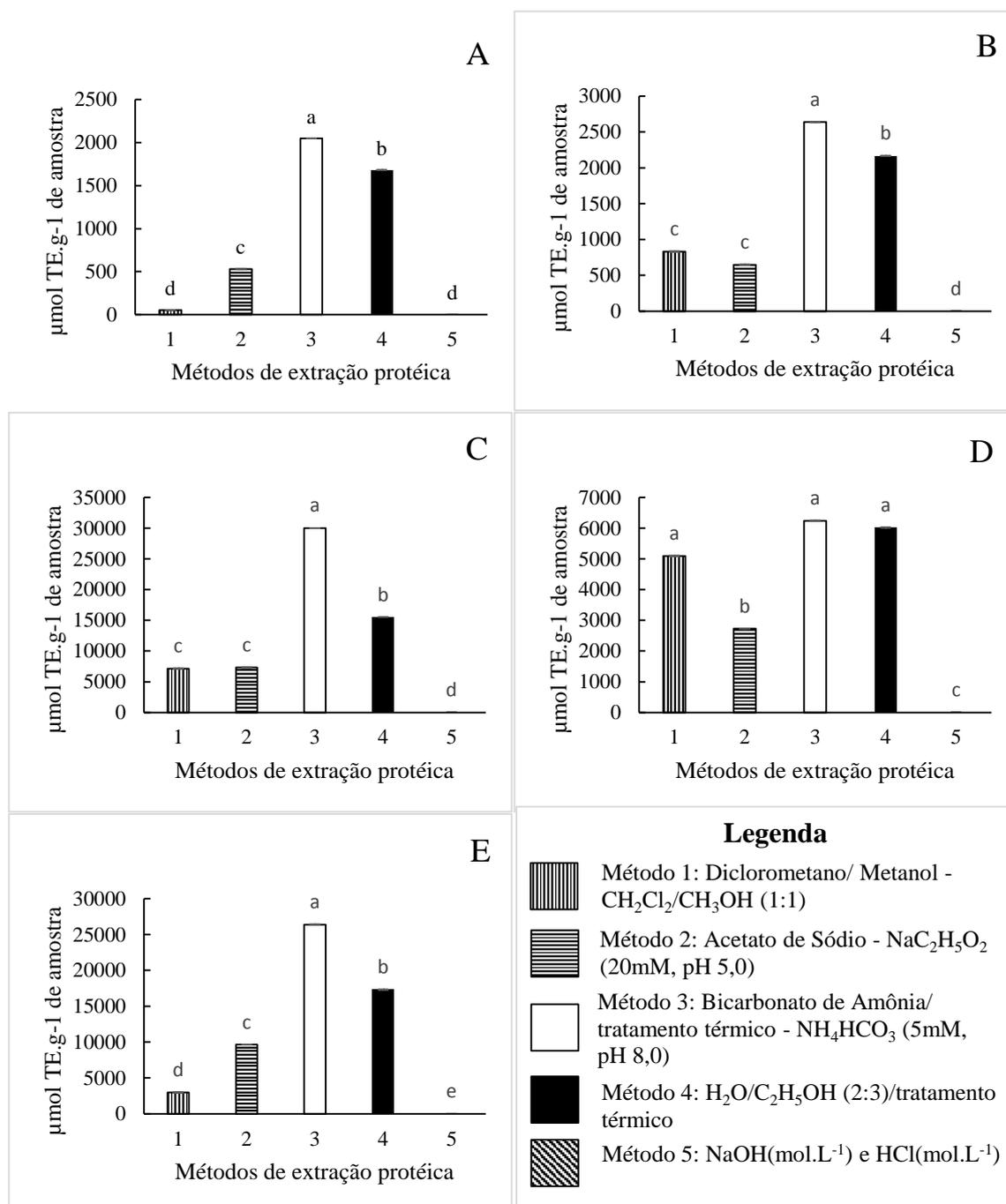
Além disso, as proteínas de girassol, caracterizadas por um nível moderado de albuminas (17-60%), glutelinas (11-17%), prolaminas (1-4%) e um alto nível de globulinas (55-60%) (CARRÃO-PANIZZI e MANDARINO, 1994) podem, durante o processo de extrusão (operação mecânica para obtenção do farelo) e, dependendo das condições, sofrer alterações estruturais, e resulta em maior exposição de mais sítios hidrofílicos, permitindo maior absorção e ligação de água (BHATTACHARYA, 1986) e, também, sítios não polares (KINSELLA, 1976) que interagem com solventes apolares. Os efeitos térmicos e mecânicos da extrusão podem ainda ter ocasionado a desnaturação parcial das proteínas e, assim, as moléculas se tornaram mais “abertas”, resultando no aumento da solubilidade, da hidrofobicidade de superfície e da flexibilidade da molécula. (DAMODARAN, 1994).

De fato, os métodos 3 e 4 foram os mais eficientes em quantidade de proteínas extraídas, e pode estar relacionado com o tratamento térmico, que resultou em maior exposição dos sítios hidrofílicos e hidrofóbicos das proteínas. Além disso, o tratamento térmico também ocasiona mudanças na estrutura da proteína, podendo passar da forma  $\alpha$ -helicoidal para  $\beta$ -laminar (EMMAMBUX e TAYLOR, 2009), facilitando a interação solvente e aminoácidos (polares e/ou apolares) da estrutura das proteínas.

Segundo Branlard e Bancel (2007), as proteínas contidas em sementes têm solubilidade diferentes, que necessitam de alguns solventes específicos para sua extração. Observa-se que os métodos 1 e 5 não foram eficientes para a extração das amostras dos grãos, isso pode estar ligado à natureza hidrofílica das proteínas e a baixa polaridade do solvente a ser utilizado (MAHATMANTO *et al.*, 2014).

### 2.3.3 Atividade antioxidante dos extratos proteicos

As atividades antioxidantes determinadas dos extratos proteicos obtidos a partir dos cinco métodos de extração e realizadas através dos métodos ABTS, DPPH e FRAP foram expressas como valor de atividade antioxidante total equivalente ao Trolox (TEAC), que se define como a concentração de trolox que apresenta o mesmo percentual de inibição que uma concentração de 1mM do composto de referência.



**Figura 3:** Comparação estatística do valor TEAC pelo método ABTS para as amostras: (A) Milho, (B) Sorgo, (C) Girassol Soxhlet, (D) Girassol Bligh dyer e (E) Farelo de Girassol para os diferentes métodos de extração proteica, valores expressos em  $\mu\text{M}$  de TROLOX.g<sup>-1</sup> de amostra. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Na Figura 3, é possível verificar através do ensaio ABTS<sup>++</sup> as amostras que apresentaram a maior atividade antioxidante para cada método de extração proteica. É possível observar que os extratos proteicos obtidos a partir das amostras de girassol

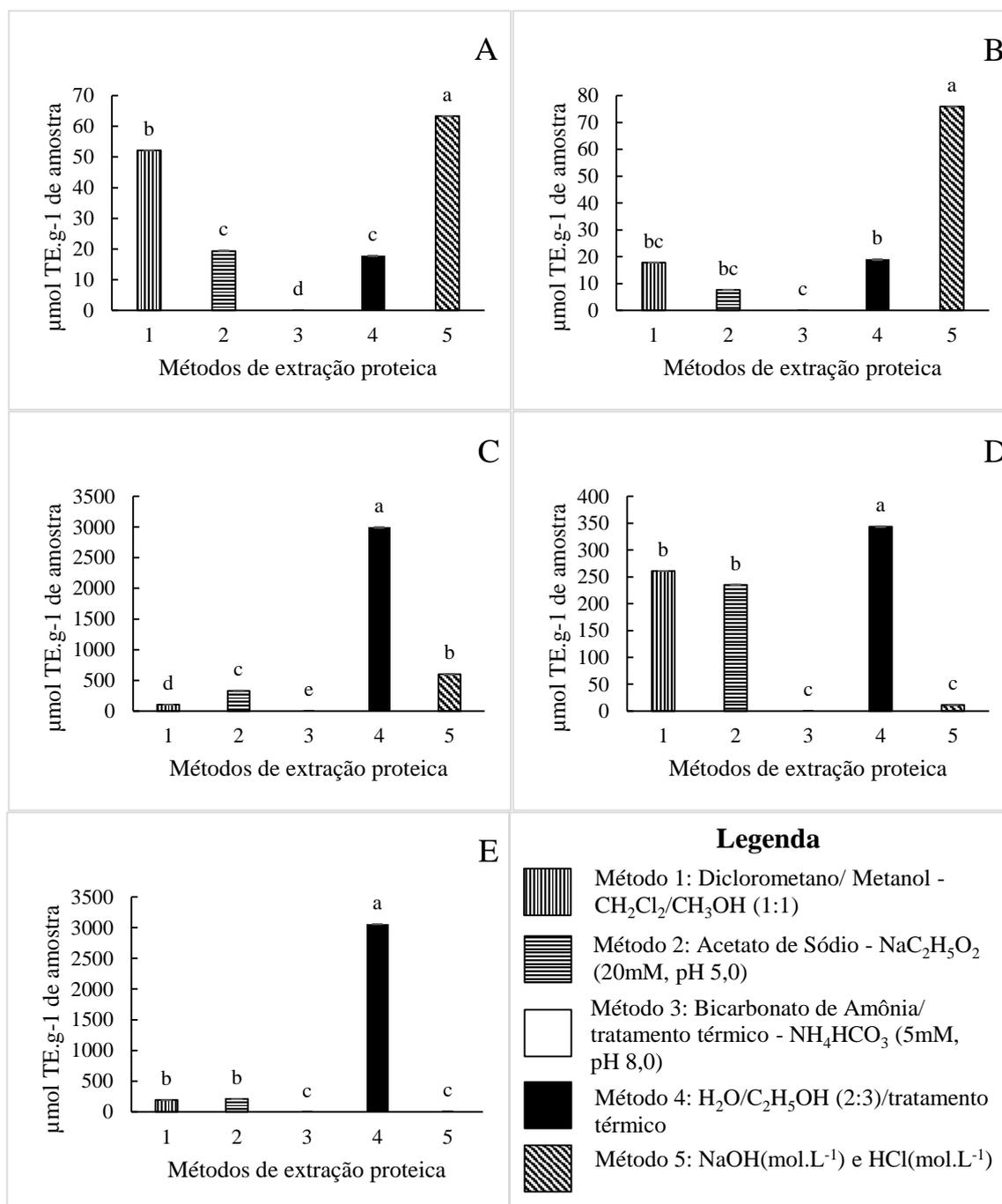
(farelo e grãos desengordurados) utilizando os métodos de extração 1, 2, 3 e 4, apresentaram a maior atividade antioxidante. Os valores obtidos demonstraram que os antioxidantes presentes nas amostras de girassol reagiram de forma significativa ( $p < 0,05$ ) no sequestro de radicais  $ABTS^{+\cdot}$ . Já para o extrato obtido a partir do método de extração proteína número 5, não foi verificada atividade antioxidante para nenhuma das amostras testadas.

Comparando-se a atividade antioxidante dos grãos de milho e sorgo entre os diferentes métodos de extração proteica, pode-se verificar que o método 3 foi o que resultou em um extrato proteico com maior capacidade de reagir, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), no sequestro de radicais  $ABTS^{+\cdot}$ , apresentando atividade antioxidante de 2050,61  $\mu\text{g}$  e 2639,50  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup>. Segundo Paraginski (2015), o milho possui uma atividade antioxidante que pode variar de acordo com a temperatura, e se verificou a variação de 504,41 – 695,02  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup>, enquanto para o sorgo, segundo Ragaee *et al* (2006), foi encontrado valor de 51,7  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup>. Sabe-se que os dados para as amostras de milho e sorgo relatadas pelos autores são da farinha do grão e não da proteína isolada como realizada no trabalho.

Utilizando-se o método de ABTS, os extratos proteicos obtidos a partir do método de extração 3 para as amostras de girassol (farelo e grãos desengordurados) apresentaram maior capacidade para realizar o sequestro do radical  $ABTS^{+\cdot}$ , apresentando valores de 26364,35  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> para o farelo de girassol, 30008,85  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> (girassol após Soxhlet) e 6239,16  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> (girassol após Bligh & Dyer). Os extratos proteicos oriundos a partir do método de extração 4, foram os que apresentaram o segundo maior valor de sequestro do radical ABTS, com valores de 17311,73  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> para o farelo de girassol, 15516,29  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> (girassol após extração por Soxhlet) e 6014,73  $\mu\text{g}$  de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> (girassol após extração por Bligh & Dyer).

A Figura 4 apresenta a capacidade dos extratos proteicos, obtidos através dos diferentes métodos de extração, em sequestrar os radicais DPPH. O princípio para determinação da atividade antioxidante por este método se baseia na reação do radical livre DPPH com o antioxidante, convertendo a sua forma reduzida. Durante a reação é possível observar a descoloração da cor violeta até a cor amarela. A mudança de coloração indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre. Assim como o método

ABTS, o método DPPH é baseado na captura do radical hidroxila (método desoxirribose), captura do radical orgânico (RUFINO *et al.*, 2007).



**Figura 4:** Comparação estatística do valor TEAC pelo método DPPH para as amostras: (A) Milho, (B) Sorgo, (C) Girassol Soxhlet, (D) Girassol Bligh dyer e (E) Farelo de Girassol para os diferentes métodos de extração proteica, valores expressos em  $\mu\text{M}$  de TROLOX.g<sup>-1</sup> de amostra. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

O extrato proteico obtido a partir da utilização do método de extração 5 para as amostras de milho e sorgo apresentou a maior capacidade de sequestro de radicais DPPH<sup>·</sup>, com valores de 63,29 µg de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> e 75,95 µg de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup>, respectivamente. Já para as amostras obtidas após a extração proteica do girassol (farelo e grãos desengordurados – Soxhlet e Bligh & Dyer) utilizando o método 4 foi o que resultou em um extrato com a maior eficiência em capturar os radicais DPPH<sup>·</sup>, com valores de 3053,52, 2992,55 e 343,53 µg de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup>, respectivamente.

A utilização do método 3 de extração proteica não resultou em extrato proteico com componentes com propriedades antioxidantes para todas as amostras avaliadas, uma vez que não houve interação com o radical DPPH.

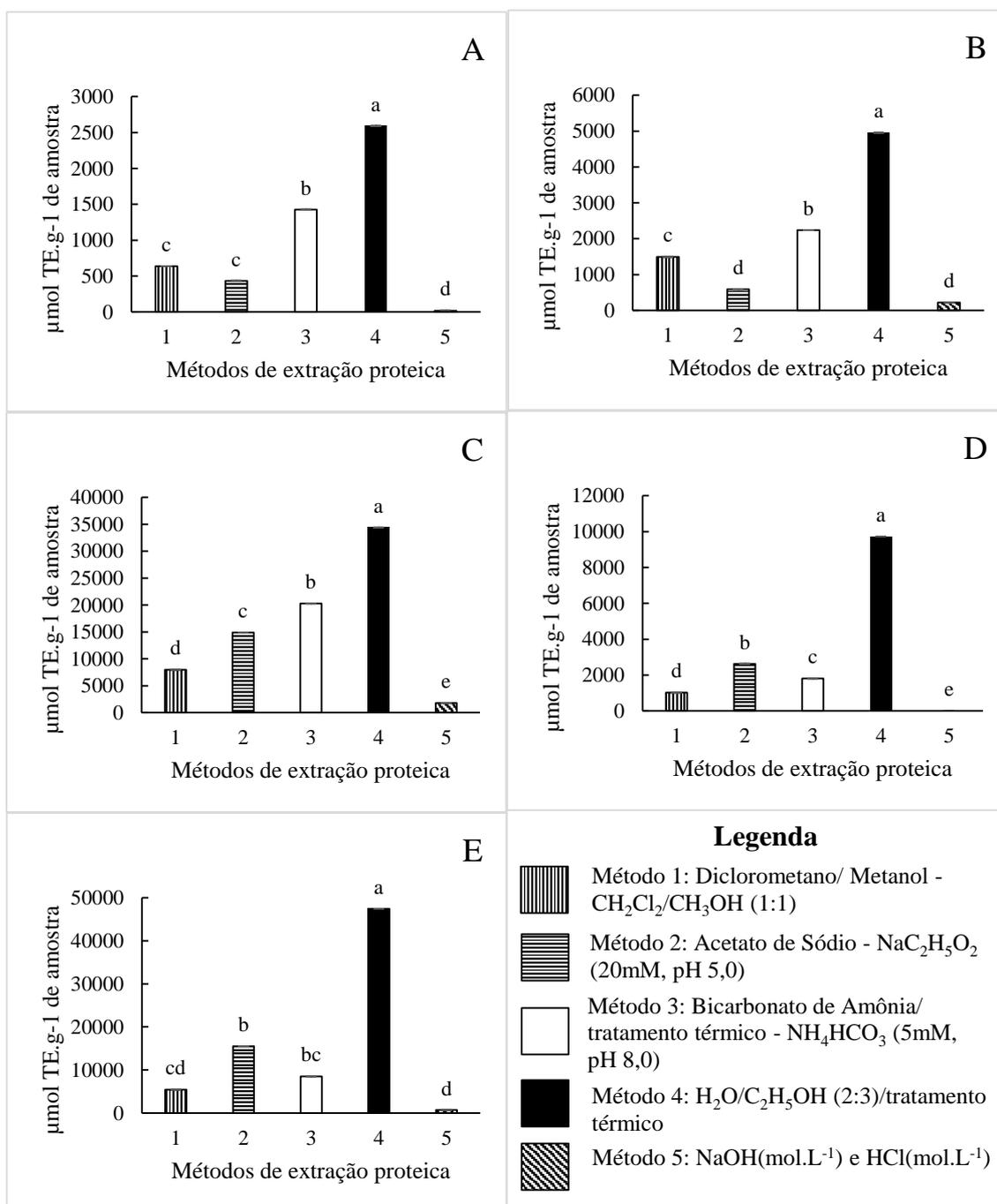
Os extratos proteicos obtidos foram, ainda, avaliados pelo método FRAP, que estima o poder antioxidante através da redução do íon férrico, e é baseado no mecanismo de transferência de elétrons, e permite avaliar a capacidade dos antioxidantes em reduzir o complexo ferritripiridiltiazina (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] a ferroso-tripiridiltiazina (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ), em pH ácido. Essa redução pode ser visualizada através da mudança de cor, de amarelo para azul escuro (RUFINO *et al.*, 2006).

A Figura 5 mostra a atividade antioxidante determinada pelo método FRAP para as amostras de milho, sorgo e girassol em suas diferentes extrações proteicas.

É possível observar que o método 4 permitiu a extração de proteínas e peptídeos que apresentam maior capacidade em reduzir o íon férrico, com valores de 2591,80, 4953,80, 47473,15, 34417,59 e 9732,69 µg de equivalente trolox.g de amostra<sup>-1</sup> para o milho, sorgo, farelo de girassol, girassol desengordurado por Soxhlet e girassol desengordurado por Bligh & Dyer, respectivamente.

Em contrapartida, o método 5, comparado aos outros métodos, não resultou em extrato proteico com atividade antioxidante para a amostra de girassol desengordurada pelo método Bligh & Dyer.

A eficiência da extração proteica, com conseqüente presença de composto com propriedade antioxidante, requer cuidado especial com vários fatores que podem influenciar sua viabilidade e aplicação, tais como: preparo de amostras (desidratação, liofilização, congelamento, moagem e/ou peneiramento, tamanho das partículas) e condições de extração (polaridade do solvente, tempo de extração, temperatura, pH, razão solvente/soluto) (JUNTACHOTE e BERGHOFER, 2005; CACACE e MAZZ, 2003).



**Figura 5:** Comparação estatística do valor TEAC pelo método FRAP para as amostras: (A) Milho, (B) Sorgo, (C) Girassol Soxhlet, (D) Girassol Bligh dyer e (E) Farelo de Girassol para os diferentes métodos de extração proteica, valores expressos em  $\mu\text{M}$  de TROLOX.g<sup>-1</sup> de amostra. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Para a realização da hidrólise enzimática foi escolhido a amostra que apresentou as seguintes características: maior quantidade de proteínas na sua composição química, facilidade e custo-benefício do método de extração proteica, maior atividade antioxidante

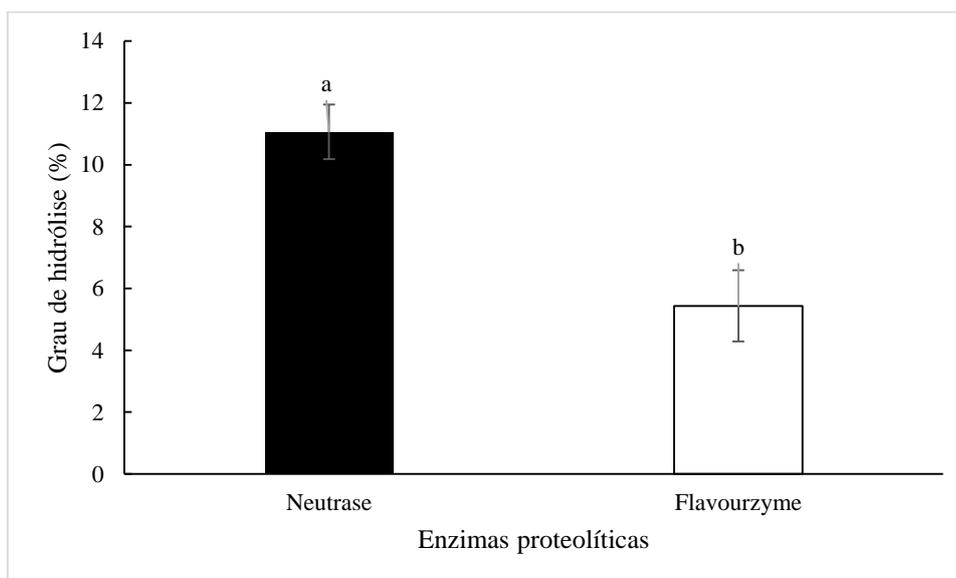
e fácil procedimento de isolar proteínas em meio aquoso para aplicação tecnológica, livre de reagentes químicos.

#### 2.3.4. Obtenção dos hidrolisados proteicos do farelo do girassol

O extrato proteico oriundo do farelo de girassol foi hidrolisado utilizando as enzimas Neutrase e Flavourzyme nas seguintes condições: pH 7,0, 50°C (UGOLINI *et al.*, 2015), relação enzima:substrato de 5:100 (KOU *et al.*, 2013). Ao final dos 120 minutos de hidrólise enzimática foi verificado aumento na concentração de peptídeos (hidrolisados proteicos).

O maior grau de hidrólise do farelo de girassol, 11,06%, foi alcançado utilizando a enzima Neutrase, seguido da enzima Flavourzyme com grau de hidrólise de 5,43% (Figura 6).

Diversos trabalhos na literatura relatam a hidrólise de diferentes proteínas para obtenção de hidrolisados proteicos. Para as proteínas do arroz foi verificado ao final do processo um grau de hidrólise de 12,56% utilizando a enzima Neutrase (ZHAO *et al.*, 2012) e 20,0% também para proteína do arroz utilizando a enzima Neutrase (ZHANG *et al.*, 2009). Para a enzima Flavourzyme foi alcançado um GH de 3,64% para proteína do milho (JIN *et al.*, 2016), 2,95% para proteína do arroz (Zhao *et al.*, 2012) e 4,84% para proteína de carcaças de frango (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

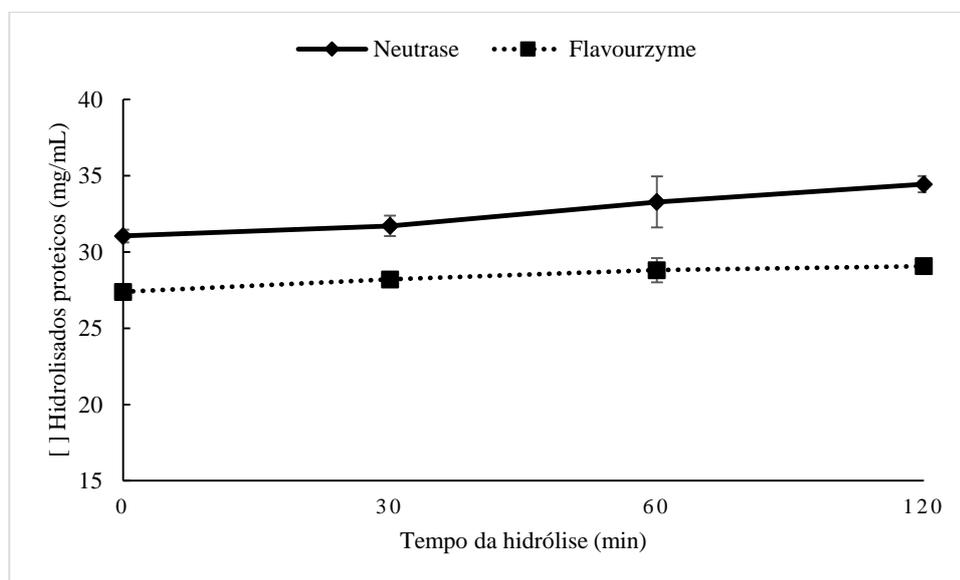


**Figura 6:** Comparação estatística do Grau de hidrólise (%) para as proteases Neutrase e Flavourzyme.

É possível verificar que a concentração de hidrolisados proteicos aumenta de forma contínua durante os 120 minutos da hidrólise enzimática (Figura 7). Comparando-se as duas proteases, a Neutrase foi a enzima que apresentou a maior atividade catalítica em relação a Flavourzyme, verificada pelo maior GH e maior concentração de hidrolisados proteicos durante a reação. Além disso, a melhor atuação da Neutrase pode indicar que tal enzima apresenta maior afinidade para realizar a clivagem das ligações peptídicas conditas no extrato proteico.

Outro fato determinante pode estar relacionado a região em que as enzimas conseguem atuar de maneira mais efetiva, a enzima Flavourzyme é uma exopeptidase que cliva as proteínas no N-terminal, enquanto a enzima Neutrase é uma metalprotease, clivando o interior das proteínas com o metal cobre. Sendo assim, é possível dizer que a especificidade das enzimas contribuiu para maior ou menor grau de hidrólise.

Maior eficiência do processo de hidrólise pode ser alcançada, futuramente, a partir da combinação de diferentes proteases, e pode resultar em aumento significativo da quantidade de proteínas hidrolisadas. Tal procedimento já foi proposto por Ambigaipalan *et al.* (2015) para proteínas de semente de tâmaras, Carrasco-Castilla *et al.* (2012) para proteínas de feijão, Liu *et al.* (2015) para proteína do glúten do milho.



**Figura 7:** Hidrólise enzimática nos tempos de 0, 30, 60 e 120 com proteases Neutrase e Flavourzyme.

### 2.3.5. Atividade antioxidante do hidrolisado

A atividade antioxidante dos vegetais inclui vários mecanismos multifuncionais. Uma forma útil de visualizar as interações entre vários antioxidantes é levar em conta a eliminação de radicais livres através da captura por antioxidantes. Podendo ser avaliado na captura de radicais ABTS na presença de átomos de hidrogênio e radical DPPH na captura de elétrons ou átomos de hidrogênio. Os métodos ABTS e DPPH baseiam-se no processo de descoloração, assim, quanto maior a captura de radicais e doação de átomos de hidrogênio e elétrons, maior será a descoloração da amostra (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

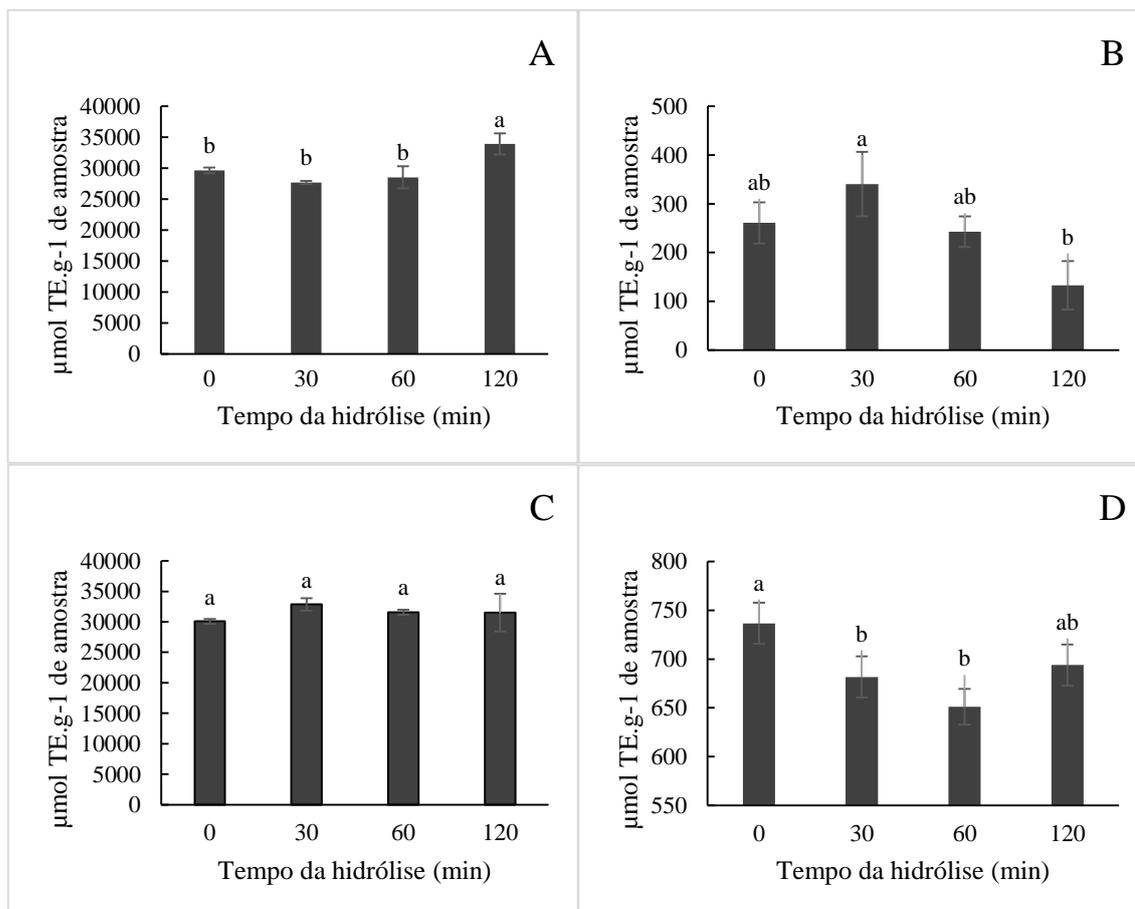
A Figura 8 apresenta a capacidade de eliminação dos radicais ABTS e DPPH durante o processo de hidrólise das proteínas do farelo de girassol realizada pelas enzimas Neutrased e Flavourzyme. Foi verificado que os hidrolisados com atividade antioxidante obtidos a partir da utilização da enzima Neutrased não aumentaram de forma significativa até aos 90 min de reação, uma vez que se mantiveram estatisticamente iguais. Já para os hidrolisados obtidos no tempo de 120 minutos de hidrólise pode-se verificar que o hidrolisado foi capaz de eliminar de forma mais eficiente o radical ABTS (33924,38  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra).

A atuação da enzima Flavourzyme sobre o extrato proteico obtido do farelo de girassol não resultou em aumento da atividade antioxidante durante todo o processo de hidrólise, atingindo valor máximo de 32868,93  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra.

Já para o método DPPH, foi verificado inicialmente, no tempo de 30 minutos, aumento da atividade antioxidante (340,24  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra) dos hidrolisados obtidos por ação da enzima Neutrased. No entanto, a partir deste ponto ocorreu a diminuição significativa (123,92  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra) da capacidade de eliminação de radicais, relacionada a diminuição da atividade antioxidante, que é associado, por sua vez, pela hidrólise de tais compostos pela própria enzima proteolítica.

Em relação aos hidrolisados obtidos pela ação da Flavourzyme sobre o extrato proteico, é possível verificar que houve decréscimo da atividade antioxidante durante os 60 minutos de reação, no entanto, a partir deste ponto ocorreu aumento até os 120 minutos, atingindo 693,90  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra.

Ao comparar pelo método ABTS a atividade antioxidante do extrato proteico obtido após a extração de proteínas do farelo de girassol e os hidrolisados obtidos enzimaticamente, percebe-se aumento de 19,8% da atividade antioxidante nos hidrolisados obtidos a partir do uso da enzima Neutrase e 22,3% dos obtidos a partir da enzima Flavourzyme. Em contrapartida, tem-se a diminuição da atividade antioxidante verificada pelo método DPPH, podendo chegar 89% para os hidrolisados com a enzima Neutrase e 78% com a enzima Flavourzyme.



**Figura 8:** Comparação estatística dos métodos ABTS e DPPH para os hidrolisados durante 120 minutos. (A) ABTS da Neutrase, (B) DPPH da Neutrase, (C) ABTS da Flavourzyme e (D) DPPH da Flavourzyme.

Esse perfil de decréscimo de atividade antioxidante nos hidrolisados proteicos também foi encontrada por Jiménez-Escrig *et al.* (2010) para proteínas de okara, e foi verificado que peptídeos de maior peso molecular possui maior atividade antioxidante. Resultados semelhantes também podem ser verificados em trabalho relacionados as proteínas de soja (MOURE *et al.*, 2006), do peixe-gato (THEODORE *et al.*, 2008) e proteína de colza (HE *et al.*, 2013).

## 2.4 Conclusão

A partir da composição centesimal foi verificado elevado teor de proteínas para o grão e farelo de girassol, com valores de 15,12% e 27,80%, seguidos pelas amostras sorgo com 9,87% e milho 6,62%, o que as tornam excelentes matérias-primas para extração proteica de compostos com atividade bioativa.

Entre os métodos de extração proteica avaliados o método 4 utilizando Água/etanol (2:3)/tratamento térmico foi o que resultou em maior teor de proteínas extraídas para as amostras de grãos de milho, sorgo e girassol e farelo de girassol com 142,23 ug/g., 223,63 ug/g, 797,96 ug/g, 297,67 ug/g e 11296,56 ug/g, respectivamente.

O método 3 resultou em extratos proteicos com maior atividade antioxidante pelo método ABTS com 2050,61  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra (milho), 2639,5  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra (sorgo), 26364,35  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra (farelo de girassol), 30008,85  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra (girassol Soxhlet) e 6239,16  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra (girassol Bligh & dyer).

Os extratos proteico obtidos pelo método de extração 4 foi o que apresentou maior atividade antioxidante pelo método DPPH para as amostras de girassol –Soxhlet (2992,55  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra), girassol – Bligh & dyer (343,53  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra) e farelo de girassol (3053,52  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra). O método 4, também apresentou para o método FRAP com 2591,80  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra (milho), 4953,80  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra (sorgo), 47473,15  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra (farelo de girassol), 34417,59  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra (girassol Soxhlet) e 9732,70  $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$  de amostra (girassol Bligh & dyer).

A utilização das enzimas Neutrase e Flavourzyme para hidrólise do extrato proteico obtido do farelo de girassol resultou em grau de hidrólise de 11,06% e 5,43%, respectivamente. As proteínas hidrolisadas pelas enzimas Neutrase e Flavourzyme resultaram aumento da atividade antioxidante determinada pelo método ABTS durante o processo de hidrólise, comparando-se ao extrato proteico antes da hidrólise enzimática.

Os extratos e hidrolisados proteicos apresentaram elevada atividade antioxidante, e sugere sua utilização em substituição a antioxidantes sintéticos.

## 2.5 Referências bibliográficas

AMBIGAIPALAN, P.; AL-KHALIFA, A. S.; SHAHIDI, F. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1125-1137, 2015.

ANDERSON, T. J.; LAMSAL, B. P. Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: a review. **Cereal Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 159-173, 2011.

ARGOS, P.; PEDERSEN, K.; MARKS, M. D.; LARKINS, B. A. A structural model for maize zein proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 9984-9990, 1982.

ASIMI, O. A.; SAHU, N. P.; PAL, A. K. Antioxidant activity and antimicrobial property of some Indian spices. **International Journal Scientific and Research Publications**, v. 541, 2013.

BARCELOS, C. A. **Aproveitamento das frações sacaríneas, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] para produção de bioetanol**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 334p., 2012.

BARLOW S, SCHLATTER J. Risk assessment of carcinogens in food. **Toxicology Application Pharmacology**, v. 243, p. 180-90, 2010.

BHATTACHARYA, S. K. **Metal filled polymers**. v. 11. CRC Press, 1986.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRANLARD, G.; BANCEL, E. Protein extraction from cereal seeds. In: THIELLEMENT, H.; ZIVY, M.; DERMEVAL, C.; MÉCHIN, V. Plant proteomics: methods and protocols. **Humana Press**, p. 15-25, 2007.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, n. 4, p. 379-389, 2003.

CARELLOS, D. C. **Avaliação do farelo de girassol para suínos em terminação**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, 2003. 79 p.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Produtos proteicos do girassol. In: LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. Girassol do Brasil. Londrina: **Embrapa Soja**, cap. 4, p. 51-68, 2005.

CARRASCO-CASTILLA, J.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A. J.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C.; JACINTO-HERNÁNDEZ, C.; ALAIZ, M.; GIRÓN-CALLE, J.; DÁVILA-ORTIZ, G. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. **Food chemistry**, v. 135, p. 1789-1795, 2012.

CASTRO, M. V. L.; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA, J. P.; FROES, L. O. Rendimento industrial e composição química de milho de alta qualidade proteica em relação a híbridos comerciais. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 39, n. 3, p. 233-242, 2009.

CONTRERAS M.M.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; RECIO, I. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 9-15, 2011.

DAMODARAN, S. Structure-function relationship of food proteins. **Protein functionality in food systems**, p. 1-37, 1994.

EMMAMBUX, M. N.; TAYLOR, J. R. N. Properties of heat-treated sorghum and maize meal and their prolamin proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 1045-1050, 2009.

ESPINOSA-RAMÍREZ, J.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Functionality and characterization of kafirin-rich protein extracts from different whole and decorticated sorghum genotypes. **Journal of Cereal Science**, v. 70, p. 57-65, 2016.

FARDET, A.; ROCK, E.; RÉMÉSY, C. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? **Journal of Cereal Science**, v. 48, p.258-276, 2008.

FERNANDES, R. T. V.; ARRUDA, A. M. V.; SILVA, L. N.S; OLIVEIRA, R. M.; VASCONCELOS, N. V. B. Grãos de girassol e seus subprodutos: potenciais fontes protéicos para alimentação de aves. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, p. 40-46, 2013.

FIALHO, E. T., Lima, J. A. F., OLIVEIRA, V., & SILVA, H. O. (2002). Substituição do milho pelo sorgo sem tanino em rações de leitões: digestibilidade dos nutrientes e desempenho animal. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, p. 105-111, 2002.

FORATO, L. A. **Estudo das estruturas das zeinas por RMN, FTIR e MFA**. 2000. Tese (Doutorado) Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos.

GONZÁLEZ-PÉREZ, S., VEREIJKEN, J.M. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. **Journal. Science. Food Agriculture**, v. 87, p. 2173–2191, 2007.

HE, R.; GIRGIH, A. T.; MALOMO, S. A.; JU, X.; ALUKO, R. E. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. **Journal Functional Foods**, v. 5, p. 219-227, 2013.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J.; RUPÉREZ, P. Health-promoting activities of ultra-filtered okara protein hydrolysates released by in vitro gastrointestinal digestion: identification of active peptide from soybean lipoxygenase. **European Food Research Technology**, v. 230, p. 655-663, 2010.

JIN, D.; LIU, X.; ZHENG, X.; WANG, X.; HE, J. Preparation of antioxidante corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidante peptides. **Food Chemistry**, v. 204, p. 427-436, 2016.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 193-202, 2005.

KINSELLA, J. E.; MELACHOURIS, N. Functional properties of proteins in foods: a survey. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 219-280, 1976.

KOU, X.; GAO, J.; XUE, Z.; ZHANG, Z.; WANG, H.; WANG, X. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. **Food Science and Technology**, v. 50, p. 591-598, 2013.

LIU, X. L.; ZHEN, X. Q.; SONG, Z. L.; LIU, X. F.; KOPPARAPU, N. K.; WANG, X. J.; ZHENG, Y. J. Preparation of enzymatic pretreated corn gluten meal hydrolysate and in vivo evaluation of its antioxidante activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1147-1157, 2015.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

MAHATMANTO, T.; POTH, A. G.; MYLNE, J. S.; CRAIK, D. J. A comparative study of extraction methods reveals preferred solvents for cystine knot peptide isolation from *Momordica cochinchinensis* seeds. **Fitoterapia**, v. 95, p. 22-33, 2014.

MEHMOOD, S.; ORHAN, I.; AHSAN, Z.; ASLAN, S.; GULFRAZ, M. Fatty acid composition of seed oil of different Sorghum bicolor varieties. **Food Chemistry, Barking**, v. 109, n. 4, p. 855-859, 2008

MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Antioxidant properties of ultrafiltration recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 447-456, 2006.

NAVES, M. M. V.; SILVA, M. S.; CERQUEIRA, F. M.; PAES, M. C. D. Avaliação química e biológica da proteína do grão em cultivares de milho de alta qualidade protéica. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 34, p. 1-8, 2004.

NIMET, G. **Avaliação dos solventes dióxido de carbon supercrítico e propano subcrítico na extração do óleo de girassol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2009. 119 p.

OLIVEIRA, M. S. R.; FRANZEN, F. L.; TERRA, N. N.; KUBOTA, E. H. Utilização de enzimas proteolíticas para produção de hidrolisados proteicos a partir de carcaças de frango desossadas manualmente. **Brazilian Journal Food Techonology**, v. 18, n. 3, p. 199-210, 2015.

OLIVEIRA, M.D.S.; MOTA, D.A.; BARBOSA, J.C., STEIN, M.; BORGONOV, F. Composição Bromatológica e Digestibilidade ruminal in vitro de concentrados contendo diferentes níveis de torta de girassol. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.4, p. 629-638, 2007.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, 2015.

OSEGUERA-TOLEDO, M. E.; MEJIA, G.; DIA, V. P.; AMAYA-LLANO, S. L. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- $\kappa$ B pathways. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1175-1185, 2011.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2006. 6 p. (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular Técnica, 75).

PARAGINSKI, R. T.; TALHAMENTO, A.; OLIVEIRA, M., ELIAS, M. C. Efeitos da temperatura nas alterações do teor de compostos com potencial antioxidante em grãos de milho durante o armazenamento. **Rev Bras Prod Agroind**, v. 17, p. 159-67, 2015.

PINTO, J. H. E; FONTANA, A. **Canola e girassol na alimentação humana**. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, Campinas, 2001. Anais. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p.109-134, 2001.

PORTAS, A. A. **O girassol na alimentação animal**. Campinas: CATI/D SM, 2001.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

QIAN, Z. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin. *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1690-1698, 2008.

QUEIROZ, V. A. V.; MORAES, E. A.; SCHAFFERT, R. E.; MOREIRA, A. V.; RIBEIRO, S. M. R.; MARTINO, H. S. D. Potencial funcional e tecnologia de processamento do sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], para alimentação humana. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, p. 180-195, 2011.

RAGAEI, S.; ABDEL-AAL, E. M.; NOAMAN, M. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. **Food Chemistry**, v. 98, p. 32-38, 2006.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRAS, A. S.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, R. F. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3. ed. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2011. p. 186.

RUFINO, M. D. S. M., ALVES, R. E., DE BRITO, E. S., DE MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. D. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., & SAURA-CALIXTO, F. D. (2006). **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 4 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 128).

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

SHEN, S.; CHAHAL, B.; MAJUMDER, K.; YOU, S. J.; WU, J. Identification of novel antioxidant peptides derived from a thermolytic hydrolysate of ovotransferrin by LC-MS/MS. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p. 7664-7672, 2010.

SMET, K.; RAES, K.; DE BLOCK, J.; HERMAN, L.; DEWETTINCK, K.; COUDIJZER, K. A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 520–530, 2008.

SOUZA, R. S. C.; BALBUENA, T. ARRUDA, P. Structure, organization and expression of the alpha prolamin multigenic family bring new insights into the evolutionary relationships among grasses. **The plant genome**, v. 8, p. 1-11, 2015.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica Ciência Biológica da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SUJA, K.P., ABRAHAM, J.T., THAMIZH, S.N., JAYALEKSHMY, A., ARUMUGHAN, C. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. **Food Chemistry**, vol. 84, pg. 393-400, 2004.

TAVERNARI, F. C.; MORATA, R. L.; RIBEIRO JÚNIOR, V.; ALBINO, L. F. T.; DUTRA JUNIOR, W. M.; ROSTAGNO, H. S. Avaliação nutricional e energética do farelo de girassol para aves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 1, p. 172-177, 2010.

THEODORE, A. E.; RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. **Journal Agriculture Food Science**, v. 56, p. 7459-7466, 2008.

UGOLINI, L.; CINTI, S.; RIGHETTI, L.; STEFAN, A.; MATTEO, R.; D'AVINO, L.; LAZZERI, L. Production of enzymatic protein hydrolysate from defatted sunflower seed meal for potential application as a plant biostimulant. **Industrial Crops and Products**, v. 75, p. 15-23, 2015.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. **Tabela brasileira de composição de alimentos: TACO**. 2ª edição. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006. 113 p. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/>. Acesso em: 16 ago. 2016.

USDA. National Nutrient Database for Standard Reference. Disponível em: [http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list\\_nut\\_edit.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl)>. Acesso em: 15/05/2010.

XUE, Z.; YU, W.; LIU, M.; KOU, X.; WANG, J. Preparation and antioxidative properties of a Rapeseed (*Brassica napus*) protein hydrolysate in three peptide fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5387-5293, 2009.

ZHANG, J., ZHANG, H., WANG, L., GUO, X., WANG, X., YAO, H. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: Identification of the active peptide. **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 709–719, 2009.

ZHANG, L.; LI, L.; ZHOU, K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2084-2089, 2010.

ZHAO, Y.; WANG, J.; BALLEVRE, O.; LUO, H.; ZHANG, W. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. **Hypertens Research**, v. 35, p. 370-374, 2012.

ZHONG, F.; LIU, J.; MA, J.; SHOEMAKER, C.F. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Research International**, v. 40, p. 661-667, 2007.

#### 4. TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se avaliar o tamanho dos peptídeos através da técnica de eletroforese e realizar a identificação e sequenciamento dos aminoácidos que compõem esses peptídeos por técnicas adequadas. Além disso, pode-se realizar hidrólises a partir do uso combinado de enzimas e realizar a comparação destes hidrolisados entre as outras amostras estudadas. Adicionalmente, pode-se realizar a aplicação tecnológica desses peptídeos com propriedades antioxidantes.

#### 5. TRABALHOS APRESENTADOS DURANTE O MESTRADO

PRADO, D. M. F.; EGEEA, M. B. ; AMEIDA, A. B. ; SILVA, A. K. C. . COMPOSIÇÃO PROXIMAL DOS GRÃOS PROVENIENTES DO SUDOESTE GOIANO. In: IV Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Câmpus Rio Verde do IF Goiano, 2015, Rio Verde. Anais IV CPPG. Rio Verde: IFGoiano, 2015.

PRADO, D. M. F.; AMEIDA, A. B. ; SILVA, A. K. C. ; LEMES, A. C. ; EGEEA, M. B. . COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PROTEICA DA SEMENTE E FARELO DE GIRASSOL (*Helianthus annuus* L.). In: V Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Campus Rio Verde, 2016, Rio Verde. V Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Campus Rio Verde, 2016.

PRADO, D. M. F.; AMEIDA, A. B. ; SILVA, A. K. C. ; LEMES, A. C. ; EGEEA, M. B. . COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PROTEICA A PARTIR DE

SORGO (*Sorghum bicolor* L. Moench). In: Semana de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016, Cuiabá. II SECITA, 2016.

PRADO, D. M. F.; AMEIDA, A. B. ; SILVA, A. K. C. ; ALVES, C. C. F. ; EGEEA, M. B. . ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MILHO (*Zea mays*). In: Semana de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016, Cuiabá. II SECITA, 2016.

PRADO, D. M. F.; AMEIDA, A. B. ; SILVA, A. K. C. ; GUIMARAES, R. M. ; ALVES, C. C. F. ; LEMES, A. C. ; EGEEA, M. B. . Protein extract and activity antioxidant of corn (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) grains. In: VI Congreso Internacional Ciencia y Tecnologia de los Alimentos, 2016, Cordoba. VI Congreso Internacional Ciencia y Tecnologia de los Alimentos, 2016

PRADO, D. M. F.; AMEIDA, A. B. ; SILVA, A. K. C. ; GUIMARAES, R. M. ; ALVES, C. C. F. ; LEMES, A. C. ; EGEEA, M. B. . Protein extraction of the sunflower grains and bran. In: VI Congreso Internacional Ciencia y Tecnologia de los Alimentos, 2016, Cordoba. VI Congreso Internacional Ciencia y Tecnologia de los Alimentos, 2016

## APÊNDICE A – CURVA PADRÃO DE ALBUMINA DE SORO BOVINO

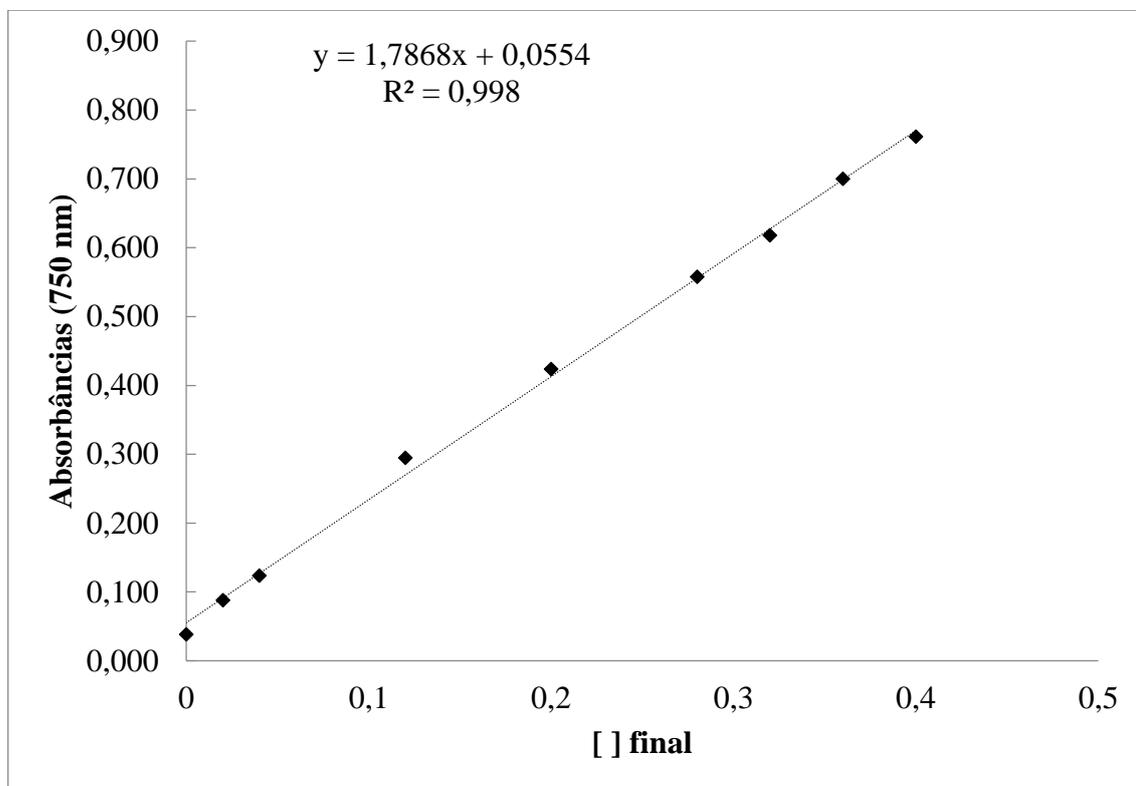


Figura 1: Curva padrão de Albumina de Soro Bovino.

## APÊNDICE B – CURVA PADRÃO DE TROLOX: ABTS, DPPH E FRAP

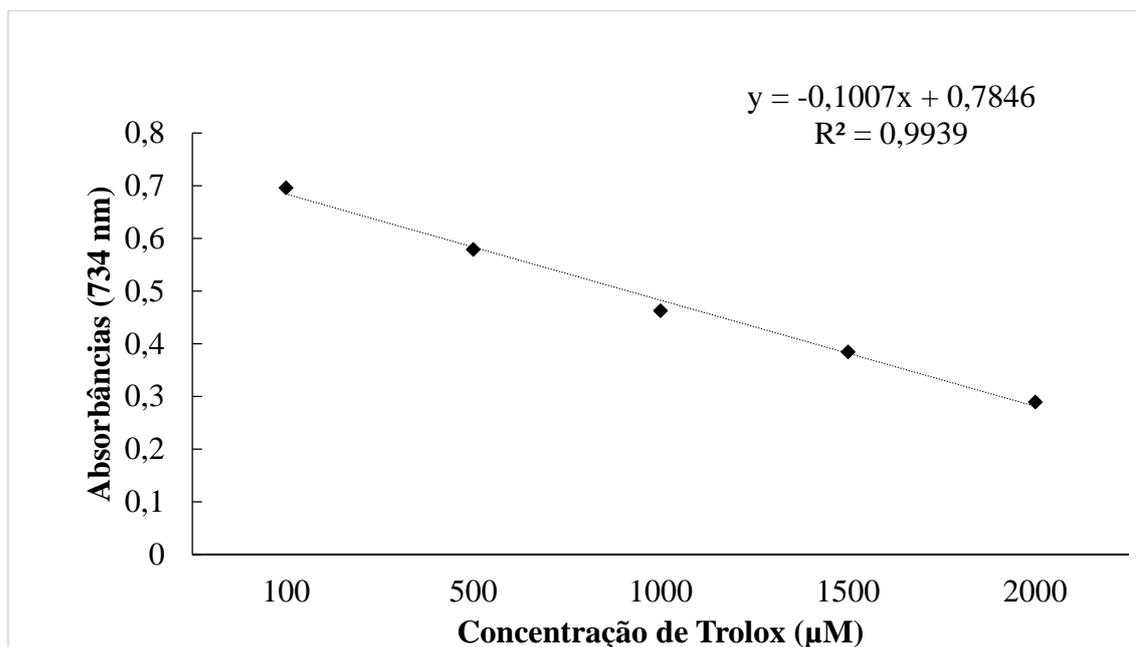


Figura 2: Curva padrão de Trolox para ABTS.

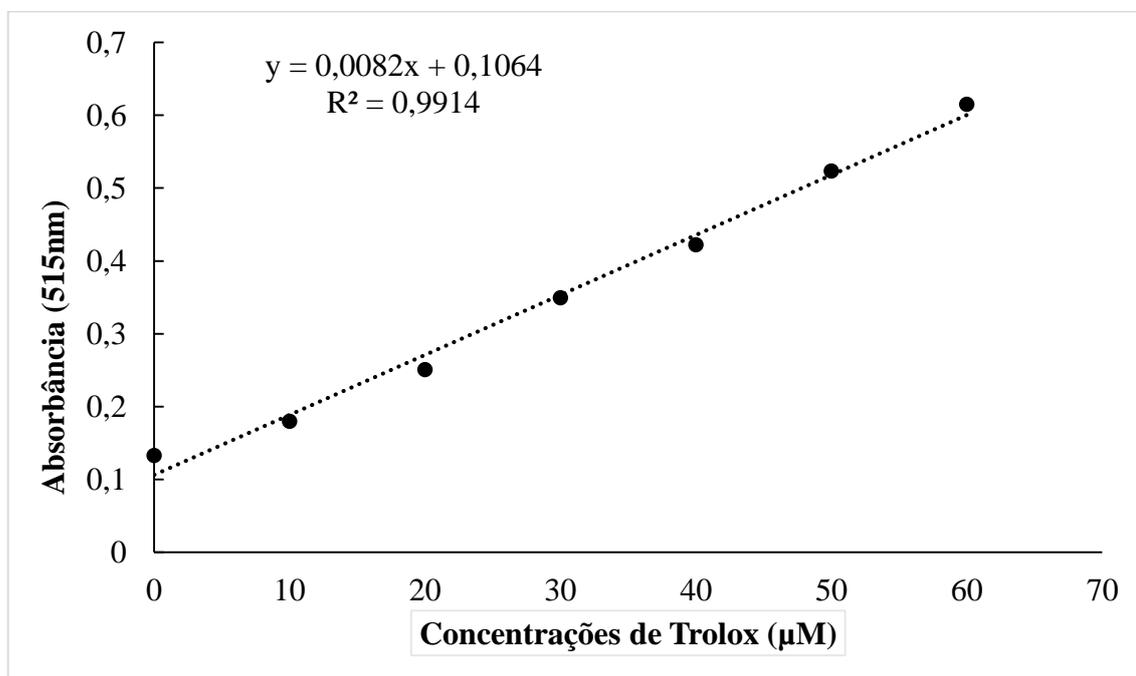
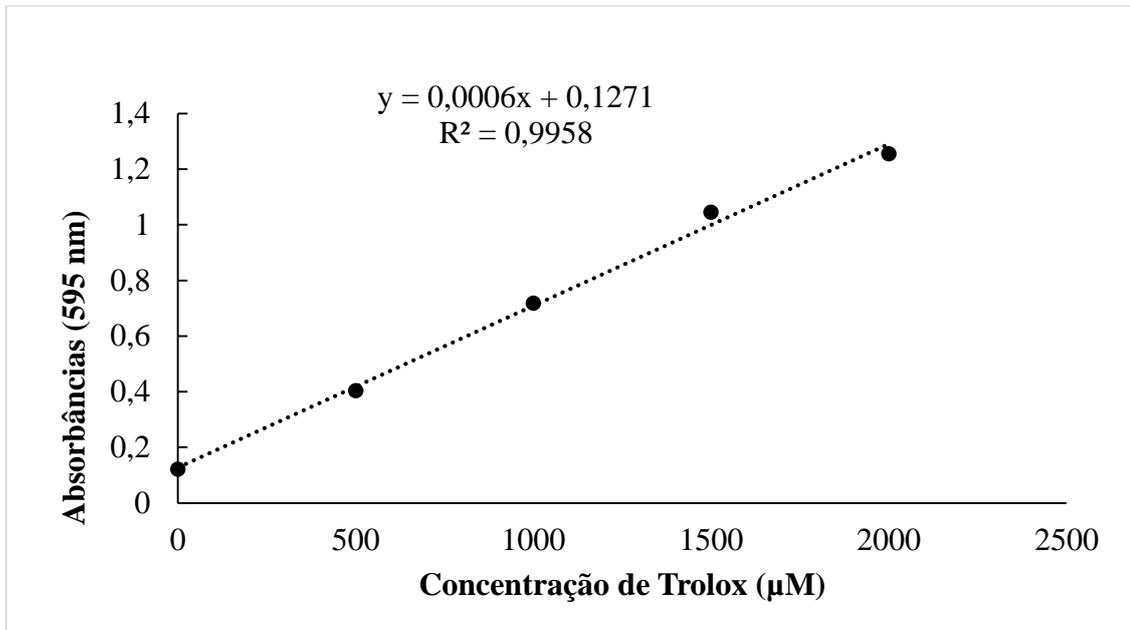


Figura 3: Curva padrão de Trolox para DPPH.



**Figura 4:** Curva padrão de Trolox para FRAP.

## APÊNDICE C – MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DO RENDIMENTOS DAS EXTRAÇÕES PROTEICAS

Métodos de extração	Milho		Sorgo		Farelo Girassol		Girassol Soxhlet		Girassol Bligh dyer	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	20,18	0,09	206,67	0,14	94,22	0,03	124,05	0,05	80,69	0,04
2	15,65	0,01	7,89	0,02	227,41	0,05	162,26	0,00	58,27	0,01
3	133,16	0,01	173,59	0,05	11296,57	0,03	457,88	0,01	303,90	0,02
4	142,24	0,11	223,63	0,03	1360,60	0,02	797,97	0,01	297,68	0,01
5	3,97	0,06	36,56	0,03	50,72	0,05	130,60	0,10	0,78	0,01

## APÊNDICE D – MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES (ABTS, DPPH E FRAP) DOS EXTRATOS PROTEICOS

	Métodos de extração	Milho	Desvio Padrão	Sorgo	Desvio Padrão	Farelo de Girassol	Desvio Padrão	Girassol Soxhlet	Desvio Padrão	Girassol Bligh dyer	Desvio Padrão
ABTS	1	53,39	0,02	830,61	0,02	2964,56	0,01	7119,72	0,04	5091,94	0,03
	2	529,50	0,01	648,50	0,00	9653,00	0,03	7311,67	0,00	2729,00	0,04
	3	2050,61	0,02	2639,50	0,01	26364,35	0,01	30008,85	0,01	6239,17	0,04
	4	1682,28	0,05	2166,72	0,01	17311,74	0,04	15516,29	0,01	6014,74	0,01
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

	Métodos de extração	Milho	Desvio Padrão	Sorgo	Desvio Padrão	Farelo de Girassol	Desvio Padrão	Girassol Soxhlet	Desvio Padrão	Girassol Bligh dyer	Desvio Padrão
DPPH	1	52,12	0,01	17,78	0,02	191,65	0,01	107,20	0,01	260,65	0,00
	2	19,37	0,04	7,68	0,01	208,75	0,01	330,25	0,00	235,16	0,00
	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	17,72	0,03	18,89	0,03	3053,52	0,00	2992,55	0,00	343,53	0,01
	5	63,30	0,00	75,95	0,08	8,01	0,00	599,82	0,00	11,75	0,00

	Métodos de extração	Milho	Desvio Padrão	Sorgo	Desvio Padrão	Farelo de Girassol	Desvio Padrão	Girassol Soxhlet	Desvio Padrão	Girassol Bligh dyer	Desvio Padrão
FRAP	1	639,07	0,04	1489,80	0,02	5446,39	0,06	7989,91	0,08	1026,70	0,04
	2	431,69	0,02	585,94	0,02	15488,36	0,05	14895,12	0,04	2629,67	0,01
	3	1425,80	0,02	2239,80	0,02	8494,96	0,03	20274,10	0,03	1815,22	0,03
	4	2591,80	0,02	4953,80	0,03	47473,15	0,04	34417,59	0,01	9732,70	0,01
	5	16,62	0,01	221,80	0,02	686,31	0,03	1784,51	0,03	0,00	0,00

