



PPGCTA
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

GABRIELA VIEIRA PANTOJA

FUNCIONALIDADES DE PEPTÍDEOS
PROVENIENTES DE BIOMASSAS DE OLEAGINOSAS
AMAZÔNICAS

BELÉM – PA, BRASIL

2025

GABRIELA VIEIRA PANTOJA

**Funcionalidades De Peptídeos Provenientes De Biomassas De
Oleaginosas Amazônicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal do Pará (UFPA) como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. LUIZA HELENA DA SILVA MARTINS

Coorientador: Prof. Dr. GUSTAVO GUADAGNUCCI FONTANARI

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA.**

BELÉM – PA, BRASIL

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V657f Vieira Pantoja, Gabriela.
Funcionalidades De Peptídeos Provenientes De Biomassas De
Oleaginosas Amazônicas / Gabriela Vieira Pantoja, . — 2025.
XVI, 96 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Luiza Helena da Silva Martins
Coorientador(a): Prof. Dr. Gustavo Guadagnucci Fontanari
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Belém, 2025.

1. Proteína concentrada. 2. Tortas oleaginosas residuais. 3.
Atividade antioxidante. 4. Atividade biológica. 5. Hidrólise
enzimática. I. Título.

CDD 574.19245

Data da defesa: 22 de abril de 2025

COMISSÃO EXAMINADORA

**Luiza Helena da Silva Martins
(Orientadora)**

**Gustavo Guadagnucci Fontanari
(Coorientador)**

**Antônio Manoel da Cruz Rodrigues
(Membro Interno – Universidade Federal do Pará – PPGCTA)**

**Marcelo Rodrigues Marques
(Membro Externo – Instituto Federal do Maranhão - IFMA)**

**Johnatt Allan Rocha de Oliveira
(Membro Interno suplente – Universidade Federal do Pará – PPGCTA)**

**Fernanda Wariss Figueiredo Bezerra
(Membro externo suplente – Universidade Federal Rural da Amazônia)**

AGRADECIMENTOS

Diante da conclusão deste trabalho, agradeço primeiramente à minha família que sempre acreditaram no meu potencial e me incentivaram a seguir o meu objetivo, o apoio que tive foi essencial em todas as etapas. Aos amigos que fiz durante o mestrado, que se tornaram uma parte incrível durante esses dois anos, em atividades acadêmicas ou fora da universidade e aos amigos de fora da pós-graduação que, antes mesmo de eu ingressar no mestrado, sempre estiveram presentes.

Agradeço à minha orientadora, Luiza Helena da Silva Martins, e ao coorientador, Gustavo Guadagnucci Fontanari, por todo o conhecimento repassado ao longo do desenvolvimento deste trabalho. A sabedoria, confiança e capacidade de estimular meu pensamento crítico foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui. E ao professor Johnatt Allan Rocha de Oliveira pela contribuição valiosa.

A todos os membros do Grupo de Análise de Funcionalidade dos Alimentos (GRAFA) que me auxiliaram no desenvolvimento dessa pesquisa, todos estagiários e pós-graduandos que fizeram parte desses dois anos foram extremamente essenciais para que esse estudo fosse concluído. Aos membros da banca examinadora, professores Antônio Manoel da Cruz Rodrigues e Marcelo Rodrigues Marques, agradeço sinceramente pela disposição de tempo em contribuir para o trabalho e meu crescimento profissional.

Por fim, agradeço à FAPESPA – Fundação Amazônica de Amparo a Estudos e Pesquisas do Estado do Pará, pelo fomento desta pesquisa. O apoio financeiro e institucional foi decisivo para que eu pudesse desenvolver este projeto, permitindo-me realizar o trabalho com qualidade e profundidade.

A todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, meu muito obrigado. Este trabalho é resultado de uma soma de esforços, e sou eternamente grata por cada pessoa que fez parte desta trajetória.

Agradecimento às agências de fomento à pesquisa
(Acknowledgement to the research funding agencies)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX). *(The presente work was conducted out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) through the Academic Excellence Program (PROEX)).*

O presente projeto foi desenvolvido com apoio da Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas – FAPESPA, através da concessão de bolsa de estudo de mestrado concedida no Projeto de pesquisa processo nº 2022/10148-4, termo de outorga Nº 041/2023. *(This project was developed with support from the Amazon Foundation for the Support of Studies and Research – FAPESPA, through the granting of a master's degree scholarship granted in Research Project process nº 2022/10148-4, grant nº 041/2023).*

O presente projeto foi desenvolvido com apoio do Conselho Nacional do Desenvolvimento – CNPq, através do auxílio financeiro concedido no projeto Universal de apoio à pesquisa processo nº 408023/2021-0. *(This project was developed with the support of the National Development Council – CNPq, through financial aid granted in the Universal research support project process nº 408023/2021-0).*

“Sustentabilidade não é apenas preservar o que temos, mas transformar o que descartamos em valor. O aproveitamento de resíduos é o elo entre a consciência ambiental e a inovação que constrói o futuro.”

BIOGRAFIA DOS AUTORES



Gabriela Viera Pantoja (Autora da tese)

Graduada em Biotecnologia pela Universidade Federal do Pará, fez iniciação científica na área de produção do etanol lignocelulósico a partir de biomassas amazônicas.

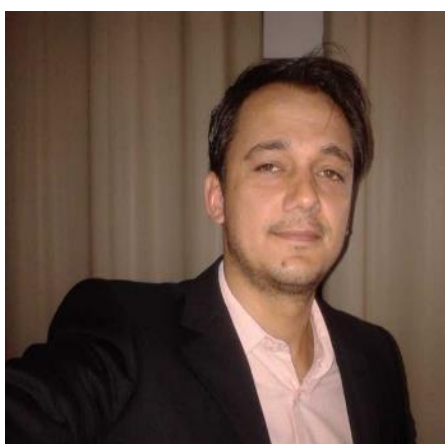
IDLATTES: <http://lattes.cnpq.br/2886973869303208>



Prof. Dra. Luiza Helena da Silva Martins (Orientadora)

Professora Adjunta do Instituto da Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia. Possui Pós-doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela UFPA. Possui doutorado em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na área de tratamentos de biomassas lignocelulósicas.

IDLATTES: <http://lattes.cnpq.br/1164249317889517>



Prof. Dr. Gustavo Guadagnucci Fontanari (Coorientador)

Professor adjunto da Universidade Federal Rural da Amazônia atuando no eixo de matérias primas alimentícias de origem vegetal no curso de ciência e tecnologia de alimentos. Graduado em Nutrição, possui Mestrado e Doutorado em Alimentos e Nutrição na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista.

IDLATTES: <http://lattes.cnpq.br/6654478241936919>

RESUMO

A utilização de subprodutos agroindustriais tem sido cada vez mais acentuada, pois foca nas questões de sustentabilidade e escassez de recursos, além disso, os subprodutos do processamento industrial também podem conter moléculas bioativas. Os peptídeos bioativos são moléculas que apresentam uma ampla gama de funcionalidades, incluindo atividades antimicrobianas e antioxidantes. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi obter hidrolisados proteicos com atividade antioxidante e antimicrobiana a partir das proteínas de tortas residuais das biomassas amazônicas tucumã (*Astrocaryum vulgare*), murumuru (*Astrocaryum murumuru*) e andiroba (*Carapa guianensis*), por meio de hidrólise enzimática. Para isto, foi realizada, primeiramente a otimização da extração proteica e, após ter definido as condições de pH, proporção e tempo de extração, as proteínas concentradas foram obtidas e, em seguida, submetidas a hidrólises enzimáticas com tripsina e alcalase. Esses hidrolisados foram testados quanto a compostos fenólicos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e separados por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados do estudo foram positivos quanto a atividade antioxidante, sendo os hidrolisados de tucumã os que tiveram maior teor e os hidrolisados de andiroba alcalase e tucumã tripsina apresentaram atividade de inibição microbiana moderada, tendo esse resultado, uma tendência, a partir da correlação de pearson, de ser devido as frações peptídicas obtidas. Dessa forma foi possível concluir que a utilização das tortas residuais de oleaginosas da Amazônia para a extração de peptídeos bioativos apresenta-se como prática viável de geração de subprodutos de alto valor.

Palavras-chave: Proteína concentrada; tortas oleaginosas residuais; atividade antioxidante; atividade biológica, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

The use of agro-industrial by-products has been increasingly emphasized, as it focuses on sustainability and resource scarcity issues. Moreover, industrial processing by-products may also contain bioactive molecules. Bioactive peptides are molecules that exhibit a wide range of functionalities, including antimicrobial and antioxidant activities. Therefore, the aim of this study was to obtain protein hydrolysates with antioxidant and antimicrobial activity from the residual cakes of Amazonian biomasses tucumã (*Astrocaryum vulgare*), murumuru (*Astrocaryum murumuru*), and andiroba (*Carapa guianensis*) through enzymatic hydrolysis. To achieve this, the protein extraction was first optimized, and once the conditions of pH, ratio, and extraction time were defined, concentrated proteins were obtained and subsequently subjected to enzymatic hydrolysis using trypsin and alcalase. These hydrolysates were tested for phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity, and separated by high-performance liquid chromatography (HPLC). The results of the study were positive regarding antioxidant activity, with tucumã hydrolysates showing the highest content. The andiroba-alcalase and tucumã-trypsin hydrolysates exhibited moderate microbial inhibition activity, with this result tending, according to Pearson correlation, to be due to the peptide fractions obtained. Thus, it was possible to conclude that the use of residual oilseed cakes from the Amazon for the extraction of bioactive peptides is a viable practice for generating high-value by-products.

Keywords: Concentrated protein; residual oil cakes; antioxidant activity; biological activity, enzymatic hydrolysis.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1)	41
Equação (2)	41
Equação (3)	41
Equação (4)	41
Equação (5)	41
Equação (6)	41
Equação (7)	52
Equação (8)	52
Equação (9)	52
Equação (10)	52
Equação (11)	63
Equação (12)	64
Equação (13)	64
Equação (14)	65
Equação (15)	68
Equação (16)	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sementes de andiroba (<i>Carapa guianensis</i>). (Fonte: A autora, 2025).....	25
Figura 2 Murumuru (<i>Astrocaryum murumuru</i>). (Fonte: A autora, 2025).	28
Figura 3. Frutos de <i>Astrocaryum vulgare</i> . (Fonte: A autora, 2025).	30
Figura 4. Processo de obtenção de biomassas de oleaginosas após extração do óleo bruto. (Fonte: A autora, 2025).	35
Figura 5. Estrutura dos vinte aminoácidos essenciais e sua classificação. (Fonte: A autora, 2025).....	40
Figura 6. Estrutura das proteínas. (Fonte: A autora, 2025).	43
Figura 7. Solubilidade da proteína globulina próxima do seu ponto isoelétrico (PI). Fonte: Adaptado de Gunathilake, (2015).....	45
Figura 8. Reação do reagente Folin em meio a catalisador cobre (ii). (Fonte: A autora, 2025).	53
Figura 9. Reação de Bradford. (Fonte: A autora, 2025).....	54
Figura 10. Atuação de peptídeos antioxidantes no organismo. (Fonte: A autora, 2025).	57
Figura 11. Reação do radical DPPH. (Fonte: A autora, 2025).	61
Figura 12. Reação do radical ABTS. (Fonte: A autora, 2025).	62
Figura 13. Análise de compostos fenólicos (CFT) para biomassas. (Fonte: A autora, 2025).	75
Figura 14. Resultados das análises de antioxidantes para biomassas. a) DPPH b) ABTS. (Fonte: A autora, 2025).	76
Figura 15. Curvas de solubilidade em relação ao pH, andiroba (a), murumuru (b) e (c) tucumã. (Fonte: A autora, 2025).....	81
Figura 16. Cromatogramas dos hidrolisados com Alcalase em comparação com o branco da enzima (a) andiroba alcalase (b) murumuru alcalase (c) tucumã alcalase. A linha vermelha corresponde ao branco de enzima. (Fonte: A autora, 2025).....	86
Figura 17. Cromatogramas dos hidrolisados de tripsina. (a) Andiroba Tripsina (b)Muru Tripsina (c)Tucumã Tripsina. A linha vermelha corresponde ao branco de enzima. (Fonte: A autora, 2025).....	88
Figura 18. Compostos fenólicos para Biomassas, Proteínas concentradas e hidrolisados (a) Andiroba (b) Muru muru e (c) Tucumã. (Fonte: A autora, 2025).	90
Figura 19. Compostos fenólicos totais presentes nos hidrolisados proteicos de andiroba, murumuru e tucumã. (Fonte: A autora, 2025).	91

Figura 20. Comparação de médias para a atividade antioxidante dos hidrolisados por DPPH (a) e ABTS (b). (Fonte: A autora, 2025).	93
Figura 21. Resultados de teste de inibição de crescimento bacteriano com corante resazurina. A) Hidrolisado de Murumuru com Alcalase. B) Hidrolisado de Murumuru com Tripsina. C) Hidrolisado de Tucumã com Alcalase. (Fonte: A autora, 2025).	94
Figura 22. Correlação de Pearson entre teor de compostos fenólicos totais e inibição microbiana. (Fonte: A autora, 2025).	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal do fruto e do óleo das biomassas amazônicas.	31
Tabela 2. Composição centesimal de biomassas de oleaginosas amazônicas em base seca. ..	35
Tabela 3. Técnicas para obtenção de peptídeos e suas eficiências, prós e contras.	59
Tabela 4. Composição centesimal das tortas residuais em base seca.	73
Tabela 5. Proteína solubilizada variando a proporção de massa da farinha e volume do extrator.	77
Tabela 6. Resultados de conteúdo proteico conforme a variação do tempo.	78
Tabela 7. Resultado de extração de proteína das biomassas	82
Tabela 8. Resultados de atividade inibitória e bactericida para <i>Staphylococcus aureus</i>	95

LISTA DE SIGLAS

ANOVA - Análise de variância

Aa – Aminoácido

ABTS - 2,2'-Azinobis (3-Etilbenzotiazolina-6-Ácido Sulfônico)

AGE – Ácidos Graxos Essenciais

AOPS - Peptídeos antioxidantes

CEP – Proteases ligadas ao envelope celular

CFT – Compostos fenólicos totais

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLS – Ciclolinopeptídeos

DIC – Delineamento inteiramente casualizado

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – Reagente 2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil

EAU – Extração assistida por ultrassom

ECA – Enzima conversora de angiotensina

EE – Extrato etéreo

FDA - Fibra em detergente ácido

FDN – Fibra em detergente neutro

FES – Fermentação em estado sólido

FS – Fermentação Submersa

HE – Hidrólise enzimática

IP – Isolado Proteico

KTI - Inibidor de tripsina de Kunitz

LT – Leucotrienos

LX – Lipoxinas

MM – Matéria mineral

MS – Matéria seca

PB – Proteína bruta

PC – Proteína concentrada

PG – Prostaglandinas

PI – Ponto isoeletrico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TFA – Ácido trifluoroacético

TX – Tromboxanas

TR – Tempo de retenção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2.	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3.	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1.	Sementes oleaginosas	24
3.2.	Oleaginosas Amazônicas	24
3.2.1.	Andiroba (<i>Carapa guianensis</i>)	25
3.2.2.	Murumuru (<i>Astrocaryum murumuru</i>)	27
3.2.3.	Tucumã (<i>Astrocaryum vulgare</i>)	30
3.3.	Composição centesimal e perfil químico das oleaginosas amazônicas	31
3.4.	Dados de geração de resíduos de oleaginosas no estado do Pará	33
3.5.	Biomassas oleaginosas amazônicas e seus usos	34
3.6.	Proteínas vegetais	37
3.6.1.	Bioquímica das proteínas	39
3.6.2.	Métodos de Produção de isolado proteico	43
3.6.3.	Precipitação isoeletrica	44
3.7.	Métodos de hidrólise de proteínas	46
3.7.1.	Hidrólise por métodos químicos	46
3.7.1.1.	Hidrólise ácida	46
3.7.1.2.	Hidrólise alcalina	47
3.7.2.	Hidrólise enzimática de proteínas	48
3.7.3.	Hidrólise por fermentação microbiana	50
3.8.	Métodos utilizados para a determinação de proteínas	51
3.8.1.	Método Kjeldahl	51
3.8.1.1.	Método de Lowry	52
3.8.1.2.	Método Bradford	54
3.9.	Peptídeos bioativos e suas funcionalidades	54
3.9.1.	Atividade antioxidante de peptídeos	56
3.10.	Compostos fenólicos em matérias-primas de origem vegetal	60
3.11.	Química da atividade antioxidante por diferentes métodos de determinação	61
4.	METODOLOGIA	63
4.1.	Coleta das amostras	63
4.2.	Composição centesimal	63

4.2.1.	Teor de Umidade	63
4.2.2.	Teor de cinzas	64
4.2.3.	Teor de lipídios	64
4.2.4.	Quantificação de proteínas	64
4.2.5.	Análise de proteínas por espectrofotometria	65
4.3.	Análise de compostos fenólicos	66
4.4.	Verificação de condições para extração de proteínas das biomassas	66
4.4.1.	Proporção massa de farinha (biomassa) – volume de extrator (água)	66
4.4.2.	Variação do tempo na extração da proteína	67
4.4.3.	Efeito do pH na solubilidade da proteína	67
4.5.	Hidrólise enzimática	68
4.5.1.	Hidrólise enzimática com tripsina	68
4.5.2.	Hidrólise enzimática com alcalase	68
4.5.3.	Caracterização dos hidrolisados	69
4.6.	Análises de atividade biológicas	69
4.6.1.	Atividade antioxidante por ABTS	69
4.6.2.	Atividade antioxidante por DPPH	70
4.6.3.	Análise antimicrobiana	70
4.7.	Análise estatística	72
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1.	Composição centesimal das tortas residuais	73
5.2.	Análise de compostos fenólicos totais	74
5.3.	Análise antioxidante	75
5.4.	Efeito da variação das condições de extração de proteína	77
5.4.1.	Proporção de massa da farinha e volume do extrator	77
5.4.2.	Variação do tempo na extração da proteína	78
5.4.3.	Efeito do pH na solubilidade da proteína	79
5.4.4.	Extração de proteínas	82
5.5.	Caracterização dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	
	84	
5.6.	Funcionalidades das proteínas concentradas (PC) extraídas das biomassas, dos hidrolisados proteicos e das biomassas	89
5.6.1.	Análise de compostos fenólicos totais	89
5.6.2.	Análise estatística dos compostos fenólicos presentes nos hidrolisados comparados estatisticamente por seus pares pelo teste <i>t- student</i>	91
5.6.3.	Atividade antioxidante	92

5.6.4. Análise de atividade antimicrobiana.....	94
5.7. Correlação de <i>Pearson</i> entre os compostos bioativos e a ação inibitória da bactéria	96
6. CONCLUSÃO	99
7. REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

A floresta Amazônica é rica em biodiversidade, no que se refere as plantas, algumas apresentam propriedades farmacológicas e nutracêuticas, devido principalmente a presença de compostos bioativos (FRANCA, 2022). Tais substâncias apresentam propriedades antioxidantes, motivando pesquisas que visam encontrar moléculas capazes de prevenir o estresse oxidativo associado a numerosas doenças, além disso, essas moléculas podem ser aplicadas na indústria farmacêutica e alimentícia (CAVAZOS; GONZALEZ DE MEJIA, 2013).

A indústria de extração de óleo, gera grandes volumes de resíduos, conhecidos como biomassas oleaginosas ou tortas residuais, que são constituídos por uma série de compostos com alta atividade biológica, além de possuírem proteínas, compostos nitrogenados e minerais (SINGH et al., 2022) Estas biomassas quando não são utilizadas como adubo ou silagem para ração animal geralmente são inutilizadas sendo descartadas de forma indevida no meio ambiente, fazendo com que o acúmulo de resíduos sólidos cause inconvenientes sanitários por serem vetores de insetos e roedores que transmitem doenças, além de contribuírem para o aumento do efeito estufa no planeta (SOUZA et al., 2021).

O reaproveitamento de resíduos é uma estratégia promissora no auxílio de respostas positivas á demandas das condições climáticas e poluição ambiental que vêm preocupado a humanidade, bem como grandes órgãos governamentais. Nesse contexto é interessante o aproveitamento das biomassas oleaginosas, pois segundo BESEN; GRANDISOLI, (2015), a queima das biomassas é a segunda principal causa na emissão de gases do efeito estufa, contribuindo com 8% a 10% das emissões na região da Amazônia brasileira.

A utilização de subprodutos agroindustriais tem sido cada vez mais acentuada, pois foca nas questões de sustentabilidade e escassez de recursos, além disso, os subprodutos derivados de cascas e sementes após processamento industrial também podem conter produtos interessantes como fibras e compostos bioativos(CASTRO et al., 2018). Assim, utilizar subprodutos originários de matérias-primas de fontes renováveis (como cascas e sementes) torna-se uma abordagem promissora para diversas aplicações com perspectivas de geração de riqueza, além de se mostrar como uma alternativa para a valorização da cadeia produtiva por meio da geração de subprodutos na formulação de medicamentos, cosméticos e suplementos alimentares por serem ricas em compostos fenólicos, com polifenóis, oligofenóis e monofenóis (DOS SANTOS et al., 2021)

Outra abordagem promissora para a utilização de biomassas oleaginosas da Amazônia é sem dúvida, a sua utilização para a extração de proteínas que podem ser posteriormente hidrolisadas para a obtenção de peptídeos bioativos.

Os peptídeos bioativos são moléculas que apresentam uma ampla gama de funcionalidades, incluindo atividades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, e até mesmo propriedades terapêuticas como modular o sistema imunológico e promover a cicatrização de feridas (HANCOCK; SAHL, 2006; REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004; ZASLOFF, 2002), essas características tornam esses compostos extremamente valiosos para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, entre outras.

A obtenção dos peptídeos é feita através da hidrólise química ou enzimática dos isolados proteicos (IPs), um processo sutil e seguro, pois as condições de trabalho são brandas, e as enzimas vão agir especificamente naquele substrato, não havendo problemáticas de corrosão dos reatores, problemas nas colunas de separação, nem destruição dos aminoácidos como ocorre em processos de hidrólise química (FOUNTOULAKIS; LAHM, 1998). Em geral para obtenção de peptídeos a partir de IPs hidrolisados enzimaticamente, são utilizadas proteases sendo as mais comuns a alcalase e a tripsina.

A literatura apresenta uma gama de trabalhos neste tema, e no que se refere a oleaginosas tem-se: peptídeos liberados das proteínas da semente de chia produzidos com alcalase microbiana, os quais demonstram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (COELHO et al., 2018). (KANEDA et al., 2016) realizaram estudos para a semente de linhaça, onde foi descoberto que alguns peptídeos isolados apresentaram atividade biológica, e foram analisados um total de 25 peptídeos cíclicos ou ciclinopeptídeos (CLs) os quais mostraram uma potente atividade de inibição da diferenciação de osteoclastos e um papel potencial na remodelação óssea. FONTANARI et al., (2008) realizaram um estudo para o aproveitamento da semente de goiaba, onde foi feita a extração das proteínas totais e obtenção dos IPs. por precipitação isoeletrica obtendo então a glutelina por fracionamento que foi analisada por meio de análises térmicas.

Segundo BARBOSA et al., (2021), a implementação de uma bioeconomia baseada em tortas residuais na Amazônia enfrenta vários desafios técnicos, econômicos e sociais, de modo a garantir que a utilização de tortas residuais seja feita de maneira socialmente justa, alinhando o aproveitamento desses resíduos com o interesse da comunidade que produz as sementes, além de ser ecologicamente sustentável.

Ainda não há na literatura nenhum trabalho que tenha explorado o potencial funcional de peptídeos obtidos a partir deste tipo de biomassas, apesar de apresentarem em sua

composição baixo teor de proteínas, apresentam altas concentrações de compostos bioativos que poderiam potencializar a atividade biológica destes produtos.

Portanto, investir em pesquisas e tecnologias voltadas para a exploração das biomassas oleaginosas da Amazônia é uma estratégia promissora, impulsionando a descoberta de novos compostos bioativos, e também promovendo a conservação da biodiversidade e o desenvolvimento econômico sustentável, agregando valor aos recursos naturais de uma das regiões mais ricas e diversas do planeta.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter hidrolisados proteicos com atividade antioxidante e antimicrobiana a partir das proteínas de tortas residuais decorrentes da extração de óleos de biomassas amazônicas.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as biomassas de tucumã (*Astrocaryum vulgare*), murumuru (*Astrocaryum muru-muru*) e andiroba (*Carapa guianensis*) em termos de composição centesimal;
- Obter hidrolisados das proteínas isoladas da biomassa através do uso de enzimas alcalase e tripsina;
- Realizar análises de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante por ABTS e DPPH nas biomassas *in natura*, nos isolados e hidrolisados proteicos das três amostras estudadas.
- Analisar os hidrolisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para verificar a presença dos peptídeos após a HE.
- Realizar a atividade antimicrobiana e antioxidante dos hidrolisados proteicos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Sementes oleaginosas

As sementes oleaginosas são sementes de plantas ricas em óleos, que são extraídas e usadas para várias aplicações, dentre as mais conhecidas, tem-se sementes de girassol, soja, colza e coco, entre outras. Os óleos derivados dessas sementes são ricos em ácidos graxos essenciais, vitaminas e compostos antioxidantes, tornando estas matérias-primas altamente benéficas para a saúde e nutrição; vale salientar que as oleaginosas não são apenas consumidas na forma de óleos comestíveis, mas também são usadas em aplicações industriais, como produção de biodiesel, lubrificantes e revestimentos (Bárta et al., 2021).

O alto teor de ácidos graxos essenciais, como ômega-3 e ômega-6, juntamente com vitaminas como E e K, os torna as oleaginosas valiosas para melhorar o perfil nutricional de vários produtos alimentícios. Além disso, os óleos destas sementes podem ser empregados na produção de margarina e cremes não lácteos, contribuindo para a textura e o sabor de alimentos processados (Abedini et al., 2022).

Segundo List, (2016) o corpo humano não é capaz de sintetizar os ácidos ômega-3 e -6, sendo esses ácidos considerados essenciais para a nutrição e importantes serem obtidos na dieta. A falta de ácidos graxos essenciais (AGE) está ligada a problemas de pele, enquanto o ômega 3 contribui para prevenir problemas neurológicos e visuais.

Embora os AGE pareçam desempenhar um papel crucial na pele e no sistema nervoso (SN), os AGE também desempenham um papel crucial no funcionamento de vários órgãos e sistemas. Principalmente através da sua transformação em eicosanoides, mediadores lipídicos farmacológicos que englobam, entre outros, as prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT), tromboxanas (TX) e lipoxinas (LX) (List, 2016).

3.2. Oleaginosas Amazônicas

As sementes oleaginosas da Amazônia, derivadas da rica biodiversidade da floresta, são altamente valorizadas por suas propriedades e aplicações únicas, especialmente na indústria

cosmética. Dentre elas, temos em especial a andiroba, murumuru e tucumã como exemplos notáveis.

O óleo de andiroba é conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e curativas, tornando-o um ingrediente procurado em produtos para a pele (Lira et al., 2021). A manteiga de murumuru, extraída das sementes da palmeira *Astrocaryum murumuru*, é valorizada por seu alto teor de ácido láurico, que fornece benefícios hidratantes e emolientes excepcionais, ideais para formulações de cuidados com a pele e os cabelos (Dos Santos et al., 2023). A manteiga de tucumã, derivada do fruto da palmeira *Astrocaryum vulgare*, é rica em betacaroteno e ácidos graxos, oferecendo proteção antioxidante e hidratação, essenciais para manter a pele e os cabelos saudáveis (Vilena Oliveira et al., 2023).

A colheita e utilização sustentáveis dessas sementes oleaginosas não apenas apoiam as economias locais das comunidades amazônicas, mas também contribuem para a conservação do ecossistema da floresta tropical, promovendo práticas favoráveis à biodiversidade. Nos tópicos a seguir será abordado de forma detalhada sobre as oleaginosas amazônicas que são o objeto de estudo desta pesquisa.

3.2.1. Andiroba (*Carapa guianensis*)

A Andiroba pertence à família *Meliaceae* é uma árvore de dossel que pode atingir até 30 m de altura. É nativa da bacia amazônica, América Central, Caribe e África tropical. O fruto consiste em uma cápsula de formato globoso a subgloboso, que se abre em quatro válvulas quando cai no solo. Durante esse processo, são liberadas de quatro a doze sementes (Figura 1), com um peso médio de aproximadamente 21 gramas (Das Graças Henriques; Penido, 2014).



Figura 1. Sementes de andiroba (*Carapa guianensis*). (Fonte: A autora, 2025).

Existem pelo menos dois métodos de extração de óleo de andiroba: o artesanal, realizado manualmente, e o industrial, que envolve a secagem em estufa, seguida pela extração em prensas hidráulicas, alcançando um rendimento de até 30% do peso da semente após a redução da umidade (Lourenço; Fapesp, 2000). O óleo de andiroba, extraído das sementes, é um dos produtos medicinais mais vendidos na Amazônia por possuir propriedades medicinais anti-inflamatórias. O método de extração do óleo ajuda a conservar as propriedades do óleo.

Além de seus benefícios cosméticos, o óleo de andiroba oferece várias outras vantagens devido à sua rica composição química, sendo bastante utilizado na medicina indígena por suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, tornando-o valioso para tratar condições como artrite, reumatismo e dores musculares (Ribeiro et al., 2021). Além disso, os efeitos anti-inflamatórios do óleo também se estendem ao alívio de sintomas de problemas respiratórios, como tosse e resfriados, e também, o óleo de andiroba apresenta propriedades repelentes, que podem ser úteis na prevenção de picadas de insetos e no controle de irritações cutâneas causadas por eles (Menezes et al., 2023), suas propriedades antimicrobianas têm sido aproveitadas para a cicatrização de feridas e tratamento de infecções de pele (Kikuchi et al., 2020b; Ninomiya et al., 2016a).

O óleo da andiroba contém predominantemente ácido oleico, que é conhecido por suas propriedades hidratantes e anti-inflamatórias, também possui o ácido palmítico, que contribui para suas características emolientes, possui o ácido linoleico, um ácido graxo essencial que ajuda a manter a barreira da pele e apresenta efeitos anti-inflamatórios e por último o ácido esteárico, que aumenta suas qualidades de amaciamento da pele. Essa combinação equilibrada de ácidos graxos não apenas torna o óleo de andiroba altamente eficaz em formulações de cuidados com a pele, mas também sustenta seus usos medicinais tradicionais para tratar condições inflamatórias e promover a saúde da pele (Knop et al., 2021b).

Outras partes do vegetal também apresentam interesse econômico, como exemplo, a casca que pode ser transformada em pó e colocada sobre feridas, servindo como cicatrizante para as afecções de pele. Estudos indicam que a casca possui atividades antioxidantes exercidas pela presença de compostos fenólicos em sua constituição, entre eles o esqualeno e fitoesteróis. Ainda se constata a presença de limonóides, compostos químicos capazes de exercer ação insetífugas e anti-inflamatórias (Kikuchi et al., 2020; Miyake et al., 2015; Ninomiya et al., 2016; Novello et al., 2015).

Os limonóides também são responsáveis pelo amargor da andiroba, além da presença de grupos químicos como os tetranortriterpenoides e as meliacinas, estes compostos têm efeitos inseticidas e são produzidos pelas plantas como um mecanismo de defesa contra insetos fitófagos (Leal et al., 2023).

Os limonoides são bastante promissores e têm sido bastante estudados devido às suas fortes atividades biológicas, incluindo propriedades antifúngicas, bactericidas, antivirais e reguladoras do crescimento (Leal et al., 2023).

O óleo também é empregado na fabricação de velas, como repelente; e em sabonetes e cosméticos (Silva; Cavalcante, 2023). Também serve como insumo para as indústrias cosmética, farmacêutica, alimentícia e têxtil e faz parte da composição de perfumes, cuidados pessoais, produtos de beleza, corantes e alimentos funcionais (Knop et al., 2021b).

3.2.2. Murumuru (*Astrocaryum murumuru*)

Pertencente à família Arecaceae, comumente conhecida como palmeira (plantas encontradas em regiões temperadas quentes e regiões tropicais úmidas) nativa da América do Sul, estendendo-se ao norte até a América Central, Trinidad e Índias Ocidentais, faz parte do grupo das monocotiledôneas que compreende 188 gêneros e aproximadamente 2570 espécies diferentes. O gênero *Astrocaryum* compreende 40 espécies, sendo as espécies *A. murumuru* e *A. aculeatum* as mais importantes fontes de alimento, e matéria-prima para a produção de óleo (SILVA, 2024).

A palmeira murumuru (*Astrocaryum murumuru*) é encontrada em toda a ecorregião amazônica, desde países como Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, Guiana, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela até o Brasil, onde se encontra nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia (Lorenzi et al., 2004). Na região amazônica, a palmeira é normalmente encontrada em áreas inundadas em certas épocas do ano, principalmente em áreas de várzea baixa no estuário do Rio Amazonas e seus afluentes (Bezerra, 2012).

Cada palmeira anualmente gera entre 2-6 cachos, pesando aproximadamente 12 kg, podendo atingir até 15 kg, cada cacho, com peso médio de 2,15 kg, contribui para a produção total, mantendo-se a faixa de 200 a 400 frutos por cacho. Dessa forma, uma única planta pode gerar, em média, 1.200 frutos por ano (Silva, 2024).

Segundo Bezerra, (2012) a parte frutífera geralmente pende, com frutos medindo de 4,5 a 9 cm de comprimento por 1,2 a 4,5 cm de largura, já os frutos maduros têm forma oblonga a ovoide (Figura 2), variando de marrom claro a amarelo-ouro, com a polpa representando 53% do fruto, e o caroço tem formato cônico, com casca lenhosa cinza. Os caroços, sem o pericarpo, têm 25% de umidade, e pesam em torno de 5-30 g quando secos. As dimensões das sementes variam conforme as condições do solo (Bezerra, 2012).



Figura 2 Murumuru (*Astrocaryum murumuru*). (Fonte: A autora, 2025).

A extração do óleo das sementes de murumuru resulta em uma gordura semissólida conhecida como manteiga de murumuru, que desperta interesse em diversas indústrias, podendo ser empregada na área cosmética, e também na indústria de tintas como secante (Bezerra, 2012), devido ao seu elevado conteúdo de gordura sólida, o murumuru é útil em preparações que requerem lipídeos majoritariamente saturados para desempenhem funcionalidades plásticas nos alimentos.

A gordura do murumuru possui propriedades emolientes excepcionais, sendo amplamente utilizada em produtos cosméticos para hidratar e nutrir a pele e os cabelos, pois a gordura é rica em ácidos graxos essenciais que ajudam a manter a barreira cutânea, prevenindo a perda de água e promovendo a elasticidade da pele (Silva; Dos Santos; Silva, 2022).

Além dos benefícios cosméticos, o *Astrocaryum murumuru* é uma fonte rica de compostos bioativos que conferem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas. Os principais bioativos presentes na manteiga de murumuru incluem tocoferóis (vitamina E), que atuam como poderosos antioxidantes, protegendo as células contra danos causados por radicais livres; estes compostos também têm mostrado potencial para promover a saúde da pele, acelerando a cicatrização de feridas e reduzindo inflamações (Silva; Dos Santos; Silva, 2022).

O perfil único de ácidos graxos e fitonutrientes do murumuru também contribui para suas propriedades anti-inflamatórias, ajudando a aliviar condições de pele irritada e sensível. Pesquisas continuam a explorar os vastos potenciais terapêuticos e cosméticos do *Astrocaryum murumuru*, destacando-o como um ingrediente valioso tanto para a saúde quanto para a beleza (ALVES, 2018)

Em relação aos compostos bioativos, encontra-se no murumuru majoritariamente os compostos fenólicos como o ácido gálico e o ácido elágico, sendo conhecidos por suas capacidades de sequestrar radicais livres e prevenir danos celulares. Há também a presença dos flavonoides, como quercetina e kaempferol, que também são abundantes na semente e contribuem para suas propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas, além de promoverem a saúde cardiovascular (Pereira Lima et al., 2017).

Os compostos fenólicos também são importantes para a estabilidade e eficácia dos produtos cosméticos e farmacêuticos, pois suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas ajudam a proteger os ingredientes ativos nas formulações contra a degradação, prolongando a vida útil dos produtos, reduzindo a necessidade de conservantes sintéticos (Oliveira et al., 2009). A combinação de ácidos fenólicos, flavonoides e taninos no *Astrocaryum murumuru* sublinha seu valor como uma fonte natural de antioxidantes potentes, com aplicações em cuidados com a saúde (Oliveira; Luzia; Jorge, 2021).

De acordo com Pesce, (2009), a gordura do murumuru possui características peculiares que favorecem o seu processamento, como o ponto de fusão mais elevado em comparação com outras matérias-primas oleaginosas conferido a esta gordura uma textura distinta. Ademais, a gordura possui baixa acidez, especialmente quando obtida das amêndoas frescas, e isto lhe confere um sabor único, além de qualidade superior no momento do transporte para o mercado externo. Devido a todos esses fatores, a procura pela semente de murumuru tem superado a oferta, o que tem levado à valorização desta matéria-prima no mercado internacional.

3.2.3. Tucumã (*Astrocaryum vulgare*)

O Tucumã é uma palmeira nativa da Amazônia pertence à família Aceraceae, destacando-se pelo fruto (Figura 3) é uma drupa, globosa a elíptica, de 3,1 a 5,4 cm de comprimento e de 2,5 a 4,8 cm de diâmetro, mesocarpo carnoso, fibroso a pouco fibroso, adocicado ou não, indo do creme ao alaranjado. Suas drupas, cobertas por uma casca dura, abrigam uma polpa succulenta, rica em nutrientes como vitamina A e ácidos graxos essenciais (Oliveira et al., 2018).



Figura 3. Frutos de *Astrocaryum vulgare*. (Fonte: A autora, 2025).

Os frutos do tucumã são pouco conhecidos, exceto pelas regiões onde pertencem ou são comercializados, limitando-se principalmente ao Norte do Brasil e parte da América Central. Os frutos possuem quantidades consideráveis de compostos bioativos, principalmente carotenoides, fibras alimentares, ácidos graxos e polifenóis, que têm demonstrado efeitos benéficos em condições ou doenças humanas (Machado et al., 2022).

Nas últimas décadas, estudos relataram efeitos pró-saúde in vitro e in vivo associados aos frutos do tucumã ou seus produtos. Evidências da literatura sugerem os seguintes efeitos estabelecidos: antioxidante, anti-inflamatório, antidislipidêmico, anti-hiperglicêmico, antimicrobiano, antifúngico, citoprotetor, genoprotetor, antiproliferativo, anticarcinogênico e neuroprotetor. Especialmente, estudos associados à inflamação, estresse oxidativo e câncer parecem ser mais frequentes (Machado et al., 2022).

Segundo Machado et al., (2022), além do potencial medicinal, os frutos do tucumã têm demonstrado potencial para inovação tecnológica, no geral, os usos potenciais dos frutos de tucumã e seus subprodutos se estendem além da indústria alimentícia e talvez devam ser mais explorados tecnologicamente como uma nova oportunidade para as indústrias farmacêutica, nutracêutica, médica, cosmética, agrícola, de embalagens, petroquímica e química. Assim, o

desenvolvimento de condições adequadas de comercialização, bem como novas aplicações são cada vez mais necessárias.

O óleo do tucumã é o produto de maior valor comercial e bioativo e sua extração é um processo que visa aproveitar os benefícios nutricionais e cosméticos presentes nessa rica fonte da Amazônia. O resultado é um óleo rico em antioxidantes, ácidos graxos essenciais e vitamina A. O óleo de tucumã é amplamente utilizado em produtos cosméticos, como cremes e óleos para a pele e cabelo, devido às suas propriedades hidratantes e nutritivas. O óleo também é valorizado na culinária, agregando sabor e benefícios nutricionais a diversos pratos (Oliveira et al., 2008).

3.3. Composição centesimal e perfil químico das oleaginosas amazônicas

Conhecer a composição da matéria-prima objeto de estudo, pode auxiliar a diversas tomadas de decisões no decorrer da pesquisa, assim, este tópico visou organizar de forma geral e completa a composição química, bioativa, antioxidante e mineral dos frutos e óleo das biomassas oleaginosas de andiroba, murumuru e tucumã e pode ser observada com detalhes na Tabela 1, onde foi feito um compilado de informações e organização de dados de diferentes autores.

Tabela 1. Composição centesimal do fruto e do óleo das biomassas amazônicas.

Composição centesimal (g. 100 g⁻¹) sementes e polpa	Andiroba Santos et al., (2020)	Murumuru Pereira et al., (2006)	Tucumã Gualberto, (2022)
Umidade	93,12	83,76	12,36
Proteínas	5,91	8,16	3,45
Lipídios	53,70	16,12	19,35
Cinzas	1,43	-	1,46
Fibras totais	-	-	29,11
Carboidratos	38,96	-	34,27
Composição do óleo	Silva, (2018)	Pereira Lima et al., (2017b)	Silva et al., (2018) Gualberto, (2022)
Índice de acidez (KOH g ⁻¹)	3,89	0,8	26,84
Índice de peróxido (meq kg ⁻¹)	1,86	5,0	-
Índice de saponificação (KOH g ⁻¹)	238,84	228,3	70,82

Índice de matéria Insaponificável (g.100 g ⁻¹)	-	0,11	-
Índice de iodo (cg I ₂ g ⁻¹)	89,77	11,0	13,50
Índice de refração	-	1,4501	1,462
Densidade (kgm ⁻³)	-	907,8	-
Viscosidade cinemática (mm ² s ⁻¹)	-	31,0	-
Estabilidade oxidativa (h)	-	>40,0	-
Composição bioativa óleo	Silva, (2018)	Castro et al., (2023)	(Gualberto, 2022)
Fenólicos Totais (mg EAG 100 g ⁻¹)	114,95	956.91	101,68
Carotenoides totais (mg 100 g ⁻¹)	-	-	0,03
β-caroteno (mg·kg ⁻¹)	-	-	567,08
cis γ-caroteno γ (mg·kg ⁻¹)	-	-	230,92
Luteína (mg·kg ⁻¹)	-	-	44,34
Atividade antioxidante do óleo	Fonseca et al., (2024)	Falcão, (2015)	Gualberto, (2022)
ABTS (μM trolox g ⁻¹)	13,03	-	-
DPPH (μM trolox eq g ⁻¹)	0,9123	-	-
FRAP (μM sulfato ferroso g ⁻¹)	56,18	-	66,22
ORAC	-	61,19	-
Perfil de ácidos graxos do óleo (g.100 g⁻¹)	Knop et al., (2021b)	Pereira Lima et al., (2017b)	Ferreira et al., (2008)
Ácido caprílico	-	1,0	1,59
Ácido cáprico (C10:0)	-	1,1	1,60
Ácido láurico (C12:0)	-	48,6	49,95
Ácido mirístico (C14:0)	-	30,0	23,35
Ácido palmítico (C16:0)	25,0	6,8	5,85
Ácido esteárico (C18:0)	7,0	2,5	2,78
Ácido oleico (C18:1)	50,0	6,7	11,06
Ácido linoléico (C18:2)	10,0	3,0	3,53

Todas as propriedades químicas e terapêuticas das oleaginosas amazônicas estão atribuídas a sua composição. Nota-se na Tabela 1 que de forma majoritária nas oleaginosas de murumuru e tucumã encontram-se os ácidos graxos: ácido láurico (C12:0) e o ácido mirístico (C14:0) que trazem benefícios à saúde, possuindo propriedades antimicrobianas e antivirais,

fortalecendo a imunidade, fornecendo energia e contribuindo para a saúde da pele e do sistema cardiovascular (LIMA et al., 2000). O ácido mirístico participa da síntese de proteínas e lipídios, apoia o sistema imunológico, possui Ação antimicrobiana e é usado em cosméticos para hidratação e proteção da pele e cabelos (Ferreira et al., 2008).

O ácido oleico (C18:1), encontrado majoritariamente na andiroba pode oferecer diversos benefícios à saúde, incluindo a redução do colesterol LDL e aumento do HDL, promovendo a saúde cardiovascular possuindo propriedades anti-inflamatórias, melhora a sensibilidade à insulina, pode proteger o cérebro contra doenças neurodegenerativas e auxilia na saúde da pele, mantendo-a hidratada e protegida contra o envelhecimento. Além disso, o ácido oleico pode ajudar no controle de peso, favorecendo a queima de gordura, especialmente a abdominal (Costa; Jorge, 2011).

O tucumã apresenta conteúdos majoritários dos seguintes flavonoides no fruto: rutina, catequina e quercetina identificados por Silva et al., (2018). A cor laranja do fruto apresenta vinte e um tipos diferentes de carotenoides, sendo 75% representado pelo trans- β -caroteno (47,36 $\mu\text{g. g}^{-1}$), importante por ser precursor da vitamina A (De Rosso; Mercadante, 2007).

O potencial antioxidante do tucumã está diretamente relacionado à quantidade de β -caroteno presente no fruto. A polpa é rica em ácidos graxos poliinsaturados, e as sementes fornecem um óleo rico em ácido láurico (Pereira et al., 2019).

As oleaginosas também apresentam em sua composição compostos fenólicos que são compostos químicos amplamente distribuídos nas plantas, conhecidos por suas propriedades antioxidantes, que desempenham um papel importante na proteção das células contra os danos causados pelos radicais livres, prevenindo o estresse oxidativo, que está associado ao desenvolvimento de várias doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares e envelhecimento precoce (Cunha et al., 2016).

3.4. Dados de geração de resíduos de oleaginosas no estado do Pará

A literatura é bastante escassa no que tange a produção de resíduos de oleaginosas, entretanto de acordo com De Menezes, (2005) em relação ao rendimento do óleo da andiroba este está estimado como que para cada um litro de óleo são necessários 20 kg de sementes fresca colhida, sendo que este pode variar demasiadamente segundo o processo de extração utilizado

e do volume de sementes a ser processado, podendo esses rendimentos serem de 30 kg de sementes para um litro de óleo.

De acordo Mendonça et al., (2015) com podem ser gerados na extração do óleo de andiroba aproximadamente 614,6 ton/ano de resíduo de torta de, por meio da extração mecânica. Nas usinas de extração de óleo em Rondônia, para se obter um litro de óleo de andiroba são necessários de 3,3 a 6 kg realizando a extração a frio com as sementes trituradas e sem controle de umidade. Ainda de acordo com Mendonça et al., (2015) , mesmo após duas prensagens, raramente as indústrias na Amazônia exceda 30% de rendimento de óleo. Gomes, (2010) comparou em seu estudo a extração do óleo de andiroba por meio de prensa mecânica de 9 toneladas de andirobas (de origem do Amapá-PA) secas 70 °C, obtendo um litro de óleo para cada 4,9 kg de sementes, já para as sementes obtidas da terra firme esse rendimento foi de um litro de óleo para cada 5,8 kg de semente.

Estimando que o rendimento do óleo de andiroba seja aproximadamente 30%, podemos determinar que a quantidade de resíduo gerada é de 70%, ou seja para obter uma tonelada de óleo de andiroba é necessárias 3,33 toneladas de semente, e a produção de resíduos será de 2,33 toneladas.

O rendimento da produção de óleo na semente de murumuru é de 40% por prensagem, de acordo com De Queiroz; Bezerra; Mochiutti, (2008). O óleo é convertido em manteiga de murumuru, um produto de grande importância nos estados do Pará e Amapá, que chegam a exportar cerca de 25 mil toneladas de cocos de murumuru (De Queiroz; Bezerra; Mochiutti, 2008). Assim para obter uma tonelada de gordura de murumuru são necessárias 2,5 toneladas de sementes, e o resíduo gerado é em torno de 1,5 toneladas.

Barbosa et al., (2009) encontraram para óleos de amêndoa de tucumã obtidos por prensagem mecânica rendimento médio de 20 %, já para a extração por Soxhlet o rendimento de extração do óleo foi de 40%. C. Se consideramos o rendimento de 20% então para cada uma tonelada de óleo produzido são necessárias 5 toneladas de semente, gerando um total de 4 toneladas de resíduos da torta.

Desse modo, se pensarmos em uma produção industrial do óleo dessas oleaginosas, a produção de resíduos é em larga escala, e conseguir utilizar este material é de extrema importância tanto para o dono da fábrica quanto para o meio ambiente.

3.5. Biomassas oleaginosas amazônicas e seus usos

Os processos de extração e refino de sementes oleaginosas produzem um resíduo que é designado como biomassa oleaginosa ou torta (Figura 4) que pode ser utilizada na alimentação animal e como fertilizante orgânico, garantindo o mínimo de desperdício e promovendo práticas sustentáveis na agricultura (Abedini et al., 2022).

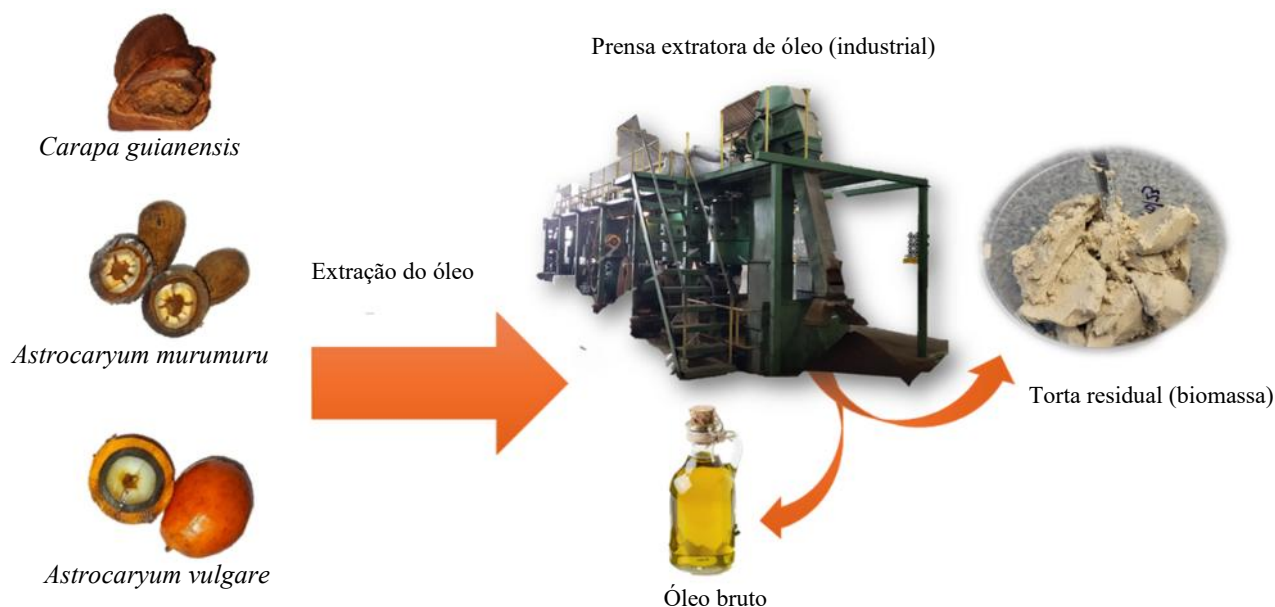


Figura 4. Processo de obtenção de biomassas de oleaginosas após extração do óleo bruto. (Fonte: A autora, 2025).

As tortas das oleaginosas amazônicas ainda são pouco exploradas na literatura científica. Embora conhecidas por suas propriedades medicinais e cosméticas, estas tortas não têm recebido a mesma atenção no campo da química, medicina, nutrição animal ou humana. Portanto, há uma necessidade urgente de pesquisas mais aprofundadas para explorar e validar os benefícios dos compostos presentes nestes resíduos. A Tabela 2 apresenta resumidamente a composição centesimal já realizada somente para as biomassas de andiroba, murumuru e tucumã.

Tabela 2. Composição centesimal de biomassas de oleaginosas amazônicas em base seca.

Composição centesimal dos frutos (g. 100 g ⁻¹)	Andiroba GUIMARÃES et al., (1970)	Murumuru LIMA, (2024)	Tucumã FERREIRA et al., (2008)
Umidade	4,77	6,30	8,20
Matéria seca	95,23	93,70	91,8
Proteínas	8,25	7,70	7,13

Lipídios	16,00	11,30	14,49
Cinzas	2,15	2,30	2,53
Fibras totais	10,39	-	18,63
FDN	-	66,20	-
FDA	-	61,00	-
Lignina	-	17,60	-
Carboidratos	73,6	78,70	75,85

FDN – Fibra em Detergente Neutro;

FDA – Fibra em Detergente ácido;

Alguns dos poucos trabalhos serão a seguir abordados com o uso das tortas oleaginosas da Amazônia, em especial a andiroba, murumu e tucumã que foram aplicadas na alimentação animal mostrando ser um uso promissor para estes materiais.

Lima, (2024) realizou um dos poucos trabalhos que explorou o potencial das proteínas da torta de Andiroba avaliando a sua digestibilidade na alimentação de frangos de corte. O experimento foi realizado no setor de avicultura da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), campus Belém, utilizando 144 pintos machos da linhagem Cobb 500, com 18 dias de idade. Os animais foram divididos em três dietas com seis repetições, cada uma contendo oito aves por gaiola, e as gaiolas foram consideradas unidades experimentais. As dietas incluíam a ração controle (0% de resíduos) e duas rações experimentais com 30% de inclusão de resíduos das tortas de andiroba e ucuuba. As excretas foram coletadas duas vezes ao dia, em intervalos de 12 horas, durante três dias consecutivos, e posteriormente foram realizadas análises bromatológicas para determinar a matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA).

Os resultados mostraram que os valores de digestibilidade de PB, EE, FDA e FDN da torta de andiroba foram superiores aos valores esperados. Em relação à MS e MM, não houve diferença significativa na digestibilidade comparada a outras tortas comumente estudadas. Concluiu-se que a torta residual de andiroba apresentou digestibilidade adequada para frangos de corte, com médias de proteína bruta de 62% e lipídios de 81% em base seca. Assim, a torta de andiroba pode ser considerada uma alternativa viável para a dieta de frangos, embora sejam necessárias mais pesquisas para uma compreensão mais abrangente dos seus efeitos (LIMA, 2024).

Em relação ao uso da torta de tucumã no trabalho de Ferreira et al., (2008) foi realizada uma caracterização físico-química do fruto e torta residual de tucumã. Para o fruto foram

encontrados 44,90% de umidade, 3,54% de proteínas, 40,49% de teor de lipídeos e 2,53% de cinzas. Já para a torta, os resultados foram 8,20% de umidade, 7,13% de proteínas, 14,49% de lipídeos e 4,40% de cinzas. Além de ser uma fonte nutricional valiosa para as comunidades locais, o Tucumã participa na preservação do ecossistema amazônico. Suas folhas são usadas para a confecção de artesanato e cobertura de casas. A sustentabilidade dessa espécie torna-a um elemento vital na interconexão entre a biodiversidade amazônica e o bem-estar humano (Oliveira et al., 2018).

Menezes et al., (2016) estudaram o potencial de utilização da torta de *Astrocaryum murumuru* na alimentação de ovinos, e realizaram ensaio metabólico com 20 ovinos machos, castrados, na Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, durante 26 dias concluindo que a torta de murumuru apresentou-se como uma alternativa para a suplementação alimentar de ruminantes, em substituição à gramínea, ocasionando um aumento na digestibilidade dos nutrientes por ovinos. A composição da torta de murumuru encontrada por estes autores em g 100 g⁻¹ foi de 10,98 de umidade, 16,32 de lipídios, 9,92 de proteínas e 1,59 de cinzas.

3.6. Proteínas vegetais

A crescente demanda global por proteínas impulsiona a busca por fontes alimentares sustentáveis. As proteínas animais são dispendiosas e associadas a problemas ambientais, incentivando a produção de alimentos proteicos de qualidade e baixo custo (González-Pérez; Arellano, 2009).

As proteínas provenientes de fontes vegetais desempenham um papel importante como insumos na indústria alimentícia, destacando-se pela sua versatilidade como ingredientes alimentícios para desempenharem funcionalidades físico-químicas e pela sua vantagem econômica em comparação com as proteínas de origem animal (Nunes et al., 2017).

Segundo González-Pérez; Arellano, (2009), as proteínas vegetais oferecem alternativas econômicas e versáteis em relação as proteínas animais em formulações alimentares, a substituição eficaz requer inovações tecnológicas, com a compreensão da relação entre estrutura proteica e propriedades funcionais.

Sendo assim, proteínas vegetais derivadas de resíduos representam uma solução inovadora e sustentável para a crescente demanda por fontes proteicas. Originárias de resíduos

agrícolas e industriais, essas proteínas oferecem benefícios nutricionais significativos, sendo uma fonte completa de aminoácidos essenciais (Grande; Cren, 2016).

Segundo González-Pérez; Arellano, (2009), além de contribuir para a economia circular, a utilização de resíduos na reduz a pressão sobre recursos naturais e minimiza o impacto ambiental associado ao desperdício alimentar. O futuro dessas proteínas vegetais é promissor, impulsionado por avanços tecnológicos contínuos, conscientização ambiental crescente e uma demanda crescente por alternativas sustentáveis.

Por oferecerem vantagens à saúde além dos elementos vitais específicos de sua espécie, as proteínas vegetais são retratadas como funcionais, e um número crescente de pessoas está interessado em utilizá-las em alimentos como resultado de mudanças na dieta humana (Betoret et al., 2011).

Proteínas oriundas de resíduos agroindustrial são boas alternativas às fontes convencionais na produção de peptídeos bioativos devido ao seu baixo -custo, promove a total valorização do produto e colabora com a sustentabilidade e bioeconomia local. A bioatividade dos peptídeos derivados de proteínas vegetais, incluindo efeito anti-hipertensivo, hipocolesterolêmico, imunomodulador, antioxidante, antimicrobiano, antidiabético, opiáceo e hepatoprotetor, estão sendo cada vez mais reconhecidas no que diz respeito à promoção da saúde e prevenção de doenças. Além das bioatividades, os peptídeos bioativos derivados de plantas possuem várias propriedades funcionais, incluindo propriedades emulsificantes e espumantes, e capacidades de retenção de água e óleo devido à propriedade hidrofílica/lipofílica, flexibilidade conformacional e comprimento da cadeia dos peptídeos (Fan et al., 2022).

Segundo Bildanova; Salina; Shumny, (2013) isolados de proteínas vegetais têm aplicações potenciais como ingredientes funcionais, pois as proteínas têm benefícios nutricionais variados com base na digestibilidade e composição de seus aminoácidos, assim é importante enfatizar que o conteúdo nutricional ou a qualidade das proteínas varia e é influenciado por fatores como a composição dos aminoácidos, a sua suscetibilidade à hidrólise durante a digestão, a sua pureza e os resultados de qualquer processamento aplicado (Ntatsi et al., 2018).

Esta seção tem como objetivo abordar de forma detalhada sobre a bioquímica das proteínas, seus constituintes: aminoácidos, peptídeos e polipeptídios e suas funcionalidades como moléculas com ação biológica.

3.6.1. Bioquímica das proteínas

Para trabalhar com proteínas vegetais é importante ter uma base consolidada em relação a sua bioquímica e aspectos gerais, assim este tópico visa expor informações relevantes sobre a bioquímica de suas moléculas, o que irá fundamentar e justificar a proposta da presente pesquisa.

As proteínas são macromoléculas orgânicas formadas por cadeias de aminoácidos formadas por ligações peptídicas e desempenham diversas funções biológicas essenciais para os seres vivos, como catalisar reações químicas, transportar substâncias, regular processos fisiológicos, defender o organismo, entre outras (Berg et al., 2022). Essas moléculas são formadas por uma ou mais cadeias de aminoácidos, chamadas de polipeptídios. Cada polipeptídio possui uma sequência específica de aminoácidos, que determina a sua estrutura tridimensional e a sua função.

Os aminoácidos (aa) (Figura 5) são as unidades fundamentais das proteínas, possuem uma estrutura básica composta por um átomo de carbono central, grupos amina e carboxila, hidrogênio e uma cadeia lateral que determina suas propriedades; existem cerca de vinte tipos distintos de aminoácidos e sua classificação leva em conta a polaridade e a carga das cadeias laterais (Berg et al., 2022).

Segundo (Bossa, 2013) com exceção da glicina, os dezenove aa têm o carbono ligado a quatro diferentes grupos substituintes: os grupos funcionais $\text{-H}_2\text{N}$, =O e -OH , um H e uma cadeia lateral cuja estrutura será a responsável pela diferenciação entre os aminoácidos.

Segundo Nelson; Cox, (2022), os aminoácidos apolares ou hidrofóbicos apresentam cadeias laterais que não interagem bem com a água, levando-os a se localizar no interior das proteínas, afastados do meio aquoso. Exemplos incluem alanina, valina, leucina e triptofano. Por outro lado, os aminoácidos polares possuem cadeias laterais que interagem favoravelmente com a água.

Podemos subdividi-los em polares não carregados (como serina e treonina) e polares carregados (como lisina e glutamato). Estes últimos, por sua vez, dividem-se em ácidos (com grupos carboxila) e básicos (com grupos amina) (Nelson; Cox, 2022).

Aminoácidos aromáticos, como fenilalanina e tirosina, apresentam anéis aromáticos, influenciando na absorção de luz e em processos enzimáticos. A categorização ácida, com ácido aspártico e ácido glutâmico, e básica, com lisina, arginina e histidina, está relacionada à carga, influenciando no pH intracelular e na carga elétrica proteica (Nelson; Cox, 2022).

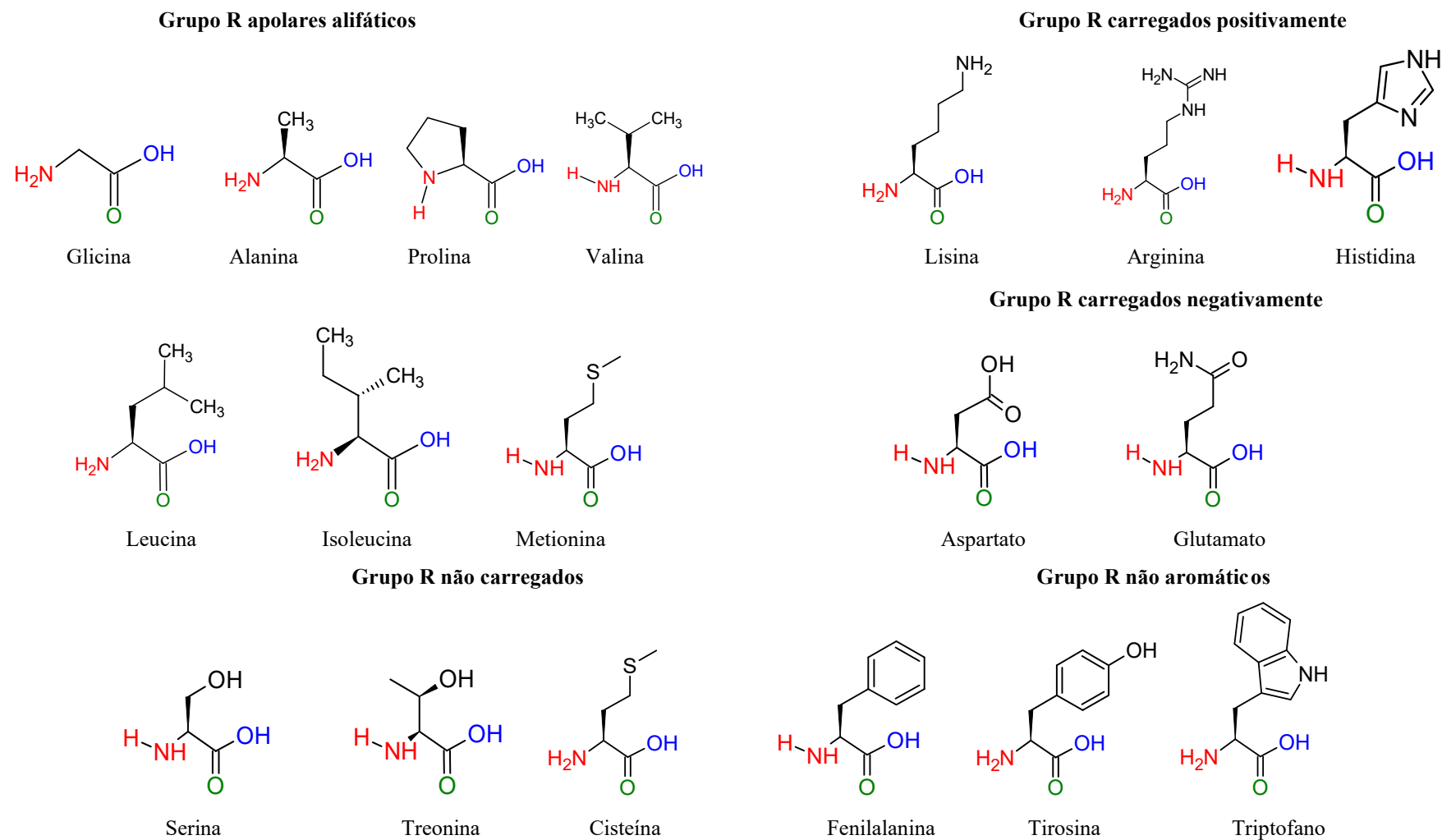


Figura 5. Estrutura dos vinte aminoácidos essenciais e sua classificação. (Fonte: A autora, 2025).

Segundo Bossa, (2013) maioria dos aa estará presente em soluções aquosas de pH neutro (pH 7) em uma configuração ionizada, onde o grupo amina está protonado ($-\text{CH}_3\text{NH}_3^+$). O ácido carboxílico desprotonado a carboxilato (COO^-) e essa variante é conhecida como *zwitterionica*. A constante de equilíbrio (k) caracteriza o processo de ionização de uma reação ácido-base, sendo chamada também de constante de ionização (k). Com o uso da lei de ação das massas definem-se, respectivamente, para os grupos ácido e básico de um aminoácido:

$$k_1 = \frac{[\text{H}_3\text{CCOO}^-] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{H}_3\text{CCOOH}]} \quad (1)$$

$$k_2 = \frac{[\text{CH}_3\text{NH}_2] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{CH}_3\text{NH}_3^+]} \quad (2)$$

Nos aa de cadeia lateral polar carregada, além dos grupos ácido-base, existe mais um grupo ionizável localizado na cadeia lateral, assim, para estudar esta classe de aminoácidos é necessária a definição de mais uma constante de ionização (k_3) e pode ser exemplificada pelo íon butilamínio da cadeia lateral da lisina expresso pela Equação 3 (Bossa, 2013).

$$k_3 = \frac{[\text{H}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{H}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+]} \quad (3)$$

Segundo Bossa, (2013) grau de ionização (α) é a relação entre o número (concentração) de grupos ionizados e o número total de grupos que pode ser expresso pelas Equações 4, 5 e 6.

$$\alpha_1 = \frac{[\text{H}_3\text{CCOO}^-]}{[\text{H}_3\text{CCOO}^-] + [\text{H}_3\text{CCOOH}]} \xrightarrow{\text{ácido}} \quad (4)$$

$$\alpha_2 = \frac{[\text{CH}_3\text{NH}_2]}{[\text{CH}_3\text{NH}_3^+] + [\text{CH}_3\text{NH}_2]} \xrightarrow{\text{base (amina)}} \quad (5)$$

$$\alpha_3 = \frac{[\text{H}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]}{[\text{H}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+] + [\text{H}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]} \xrightarrow{\text{cadeia lateral}} \quad (6)$$

Conhecendo a estrutura dos aminoácidos podemos partir para o estudo das proteínas, e conhecer a estrutura dessas proteínas é de extrema importância para a compreensão de suas funcionalidades.

As proteínas são constituídas pelos aa e podem apresentar quatro níveis de estrutura: primária, secundária, terciária e quaternária (Nelson; Cox, 2022). E a seguir será abordado sobre cada uma delas.

Segundo Berg et al., (2022), a estrutura primária de uma proteína (Figura 6-a) é a sequência linear de aminoácidos que compõem o polipeptídeo, e esta sequência é determinada pelo código genético, que é a informação contida no DNA que especifica a ordem dos aminoácidos. Esta estrutura é fundamental para a formação dos demais níveis de estrutura, pois define as propriedades químicas e físicas da cadeia polipeptídica dos aminoácidos fundamentais para a construção das proteínas, que podem ser agrupados de acordo com as propriedades químicas de suas cadeias laterais. Essa classificação é essencial para compreender como esses componentes se comportam nas proteínas e no ambiente celular.

Quando a estrutura proteica enrolar sobre si mesma, a proteína passa a estar na estrutura secundária, que é estabilizada por ligações de hidrogênio entre os átomos da espinha dorsal da cadeia, que é formada pelo grupo carboxila e pelo grupo amina dos aminoácidos. Os principais tipos de estrutura secundária são a hélice alfa e a folha beta (Alberts et al., 2017).

As alfas hélices (Figura 6 - b) são estruturas helicoidais compactas e resistentes, onde as ligações de hidrogênio ocorrem entre aminoácidos específicos e proporcionam elasticidade às proteínas. Em contraste, as folhas betas são estruturas planas e flexíveis, com ligações de hidrogênio entre aminoácidos de segmentos distintos, conferindo resistência às proteínas (Nelson; Cox, 2022).

Segundo (Alberts et al., 2017), a estrutura terciária (Figura 6- c) é a forma tridimensional que a proteína adquire após a interação entre as suas cadeias laterais, que são os resíduos de aminoácidos que os diferenciam, tal estrutura é estabilizada por diferentes tipos de ligações e forças, que dependem das propriedades químicas das cadeias laterais.

Os principais tipos de interações são as pontes dissulfeto, as forças de van der Waals e as forças eletrostáticas; a primeira são ligações covalentes entre os átomos de enxofre de cisteínas, proporcionando estabilidade à estrutura, já a força de van der Waals são fracas e transitórias, resultam de flutuações nas distribuições de elétrons, favorecendo interações hidrofóbicas; e por último as forças eletrostáticas, dependentes da polaridade, podem envolver ligações de hidrogênio, iônicas ou dipolo-dipolo, predominando em regiões hidrofílicas (Nelson; Cox, 2022).

A estrutura quaternária (Figura 6 – d) de uma proteína é a associação de dois ou mais polipeptídeos terciários que formam uma proteína complexa, esta estrutura é estabilizada pelos mesmos tipos de interações da estrutura terciária, mas entre as cadeias polipeptídicas. A estrutura quaternária permite a formação de proteínas com maior diversidade e complexidade funcional (Alberts et al., 2017).

Além de sua função na síntese proteica, alguns aminoácidos atuam como reguladores metabólicos: a tirosina, por exemplo, é um precursor de importantes neurotransmissores. Esses aminoácidos desempenham papéis fundamentais na regulação de processos fisiológicos além da simples construção de proteínas, destacando sua versatilidade e importância em diversas vias metabólicas no organismo (Alberts et al., 2017).

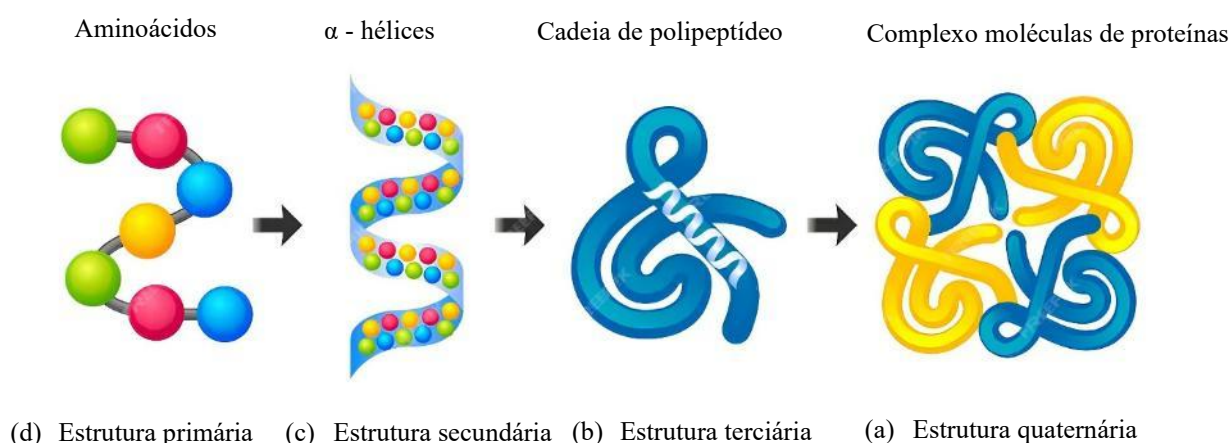


Figura 6. Estrutura das proteínas. (Fonte: A autora, 2025).

3.6.2. Métodos de Produção de isolado proteico

Segundo (Berg et al., 2022), a purificação de proteínas visa gerar uma amostra que contenha apenas a molécula desejada. Os isolados proteicos (IPs) podem ser obtidos por meio de processos como cromatografia de troca iônica, filtração por membranas, precipitação isoeletrica e extração alcalina e ácida e solução salina (Aluko, 2018; Garba; Kaur, 2014; Kaur; Singh, 2022).

A eficiência na extração de proteínas é essencial para muitos processos biológicos e industriais e diversos fatores podem influenciar essa eficiência, incluindo a temperatura e o tempo de extração, a proporção entre massa e volume, a solubilidade da proteína em questão e o tipo de equipamento utilizado no processo. Cada um desses fatores deve ser cuidadosamente controlado para otimizar a extração de proteínas (Aluko, 2018).

3.6.3. Precipitação isoelétrica

As proteínas possuem carga positiva em pH baixo e carga negativa em pH elevado. Numa faixa de pH intermediária, uma molécula proteica possui uma carga líquida nula, onde a quantidade de cargas positivas na proteína é igual à quantidade de cargas negativas, tal fenômeno é conhecido como ponto isoelétrico (PI) (Gunathilake, 2015), e é amplamente reconhecido que a solubilidade das proteínas é a mais baixa quando o pH é igual ao seu PI. Portanto, nessa condição, a intensidade da repulsão iônica entre as moléculas proteicas é mínima, ao passo que o número de interações iônicas de atração intermolecular é elevado (Gunathilake, 2015).

Baseado neste fenômeno, na precipitação isoelétrica a separação de proteínas é realizada com base em seu PI, tal método é conveniente para a extração de proteínas com base em suas propriedades elétricas. No entanto, é importante destacar que para obter resultados precisos, é essencial conhecer o PI das proteínas-alvo e fatores como pH, força iônica, temperatura, relação massa/volume e duração da extração devem ser considerados, pois estes podem influenciar no processo de extração e rendimento final (Kaur; Singh, 2022).

Na precipitação isoelétrica (Figura 7), as proteínas são primeiramente solubilizadas em um ambiente alcalino e, posteriormente, em um ambiente ácido. Então, as precipitações ocorrem ao ajustar o pH para o ponto isoelétrico, onde possuem carga líquida neutra, resultando na formação de agregados insolúveis (Illingworth; Lee; Siow, 2022).

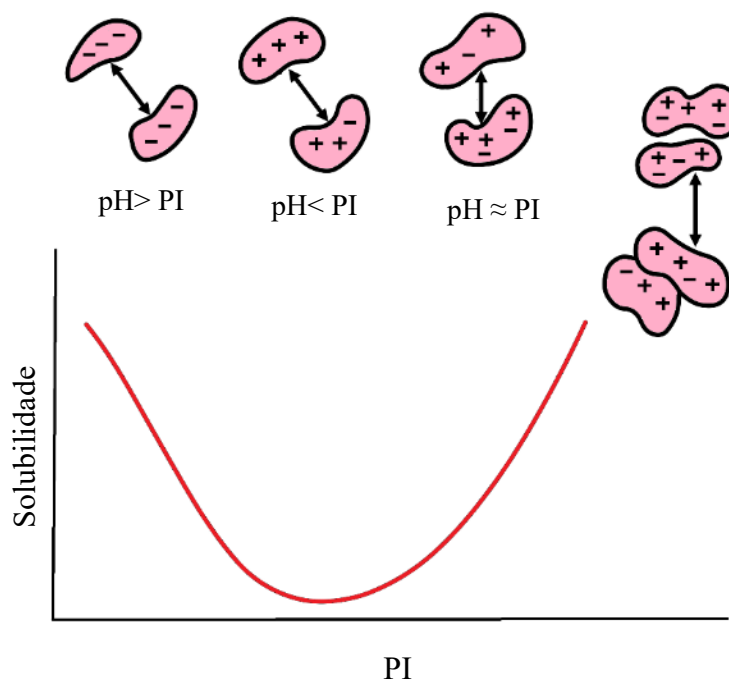


Figura 7. Solubilidade da proteína globulina próxima do seu ponto isoelétrico (PI). Fonte: Adaptado de Gunathilake, (2015).

O fenômeno de agregação, causado pela diminuição da solubilidade da proteína quando o pH do meio se aproxima do pI, é mais evidente em proteínas com baixa capacidade de hidratação ou alta hidrofobicidade superficial. A carga total da proteína em relação ao pH é determinada pelos valores de seus grupos ionizáveis, que são positivos para pHs abaixo do pI e negativos para pHs superiores ao pI (Harrison et al., 2015).

Gheyasuddin; Cater; Mattil, (1970) analisaram o intervalo de pH de extratibilidade mínima nas proteínas das sementes de girassol, no qual todos os experimentos de extração de proteínas foram realizados à temperatura ambiente, variando entre 25 a 27 °C. Um fator crítico na metodologia foi a relação entre a quantidade de farelo de sementes e o solvente utilizado, que foi padronizada em uma proporção de 1:20 (w/v) nas extrações. Nesse estudo, obtiveram como resultado que entre o pH 4 e 6 houve apenas 20% de extração das proteínas, o que corresponde ao ponto isoelétrico. Enquanto isso, houve melhora da extração em pH ácido e um aumento muito significativo de rendimento em pH entre 10 e 12.

3.7. Métodos de hidrólise de proteínas

3.7.1. Hidrólise por métodos químicos

A hidrólise química de proteínas foi uma das primeiras técnicas a serem aplicadas quando se começou a estudar sobre proteínas e sua hidrólise para obtenção de peptídeos, essa técnica foi utilizada por muito tempo por ser simples e menos dispendiosa (Cruz-Casas et al., 2021).

Para esta técnica podem ser usados ácido ou bases para clivar ligações peptídicas e produzir peptídeos e aminoácidos livres (Wang et al., 2017).

Entretanto, esta técnica apresenta muitas limitações, tais como controle do processo, composições químicas variáveis, destruição dos peptídeos, etc. Assim, a hidrólise das proteínas com produtos químicos fortes sob condições extremas de temperatura e pH podem ocasionar qualidades nutricionais ruins e funcionalidades baixas do produto final (Kristinsson; Rasco, 2000).

Antigamente, a maioria das proteínas hidrolisadas foi produzida por hidrólise ácida de proteínas vegetais nos EUA para aplicação em processamento de carnes, biscoitos e misturas de sopa (Cruz-Casas et al., 2021; Kristinsson; Rasco, 2000).

Cruz-Casas et al., (2021) afirmam que a hidrólise química não é recomendada para a produção dos peptídeos bioativos, no entanto, será citada neste trabalho a nível de informação e nos tópicos a seguir as técnicas estão descritas de forma sucinta sobre as técnicas de hidrólise química das proteínas que foram mais estudadas na literatura.

3.7.1.1. Hidrólise ácida

A hidrólise ácida de proteínas é um processo amplamente utilizado para quebrar ligações peptídicas, convertendo proteínas complexas em aminoácidos ou pequenos peptídeos. Este método envolve a utilização de ácidos fortes, como o ácido clorídrico (HCl), em condições controladas de temperatura e tempo. O aquecimento a 110 °C por até 24 horas em solução de HCl 6N é uma prática comum, permitindo a completa hidrólise de proteínas em aminoácidos livres, embora certos aminoácidos, como triptofano, possam ser degradados (Tsugita; Scheffler, 1982). Uma aplicação relevante está na determinação da composição de aminoácidos em alimentos, auxiliando na análise nutricional. Apesar da eficiência, o método apresenta limitações, como a degradação parcial de aminoácidos sensíveis e a formação de subprodutos indesejáveis, tornando essencial o desenvolvimento de protocolos otimizados (Castro-Puyana;

Marina, 2022). A hidrólise ácida permanece como um método robusto e amplamente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica. As proteínas têm regiões que resistem à hidrólise ácida com ácido minerais, porém se tiver a presença de um ácido orgânico forte a hidrólise pode ser melhorada e isso foi constatado na pesquisa de Tsugita; Scheffler, (1982) que realizam um estudo da hidrólise ácida da lipoproteína da membrana celular externa de *Proteus mirabilis* utilizando um ácido orgânico forte (ácido trifluoroacético ou $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$), que foi considerado altamente eficiente para a hidrólise de uma ligação peptídica hidrofóbica.

Estes autores utilizaram a seguinte condição para o estudo: uma mistura na proporção de 2:1 (v/v) de ácido clorídrico concentrado e ácido trifluoroacético em uma temperatura de 166 °C e tempo de residência de 25 min sendo esta condição equivalente a uma condição convencional como (6 M de HCl a 110 °C por 24 h), a condição do estudo observou que não houveram decomposições significativas dos aminoácidos, e tal método mostrou-se superior às condições convencionais, considerando principalmente as proteínas hidrofóbicas, entretanto, este método promoveu a decomposição do triptofano, assim como ocorre na hidrólise ácida convencional (Tsugita; Scheffler, 1982).

3.7.1.2. Hidrólise alcalina

A hidrólise alcalina de proteínas é um processo químico amplamente utilizado para a obtenção de peptídeos e aminoácidos, com aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. O método consiste na quebra das ligações peptídicas por meio da utilização de bases fortes, como o hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH), sob condições controladas de temperatura e tempo. O mecanismo da hidrólise alcalina baseia-se na nucleofilicidade do íon hidroxila (OH^-), que ataca o grupo carbonila das ligações peptídicas. Este processo é favorecido em pH elevado e temperaturas moderadas a altas, geralmente entre 50 e 90 °C. A escolha das condições depende das características do substrato e do produto desejado. Eberhardt e colaboradores (2021) investigaram a hidrólise enzimática do concentrado proteico do soro de leite utilizando as enzimas Alcalase® e Flavourzyme®, com o objetivo de avaliar os parâmetros cinéticos e as propriedades bioativas dos hidrolisados gerados em diferentes condições de reação e observaram que o pH influenciou significativamente o grau de hidrólise e os parâmetros cinéticos das reações. Uma limitação importante da hidrólise alcalina é a possibilidade de racemização de aminoácidos e degradação de compostos sensíveis. Contudo, alternativas têm sido propostas, como a combinação de hidrólise alcalina com

métodos enzimáticos para obter produtos de maior especificidade e funcionalidade (Fernandes et al., 2023).

3.7.2. Hidrólise enzimática de proteínas

A hidrólise enzimática de proteínas é um processo que quebra proteínas em peptídeos menores usando enzimas como alcalase e pepsina. Este método controlado pode ser utilizado para a obtenção de peptídeos bioativos com benefícios à saúde, melhor digestibilidade e sem alergênicos. Os peptídeos resultantes são usados em alimentos, suplementos e produtos farmacêuticos devido às suas propriedades funcionais (Garbacz et al., 2023).

Esse processo pode ocorrer naturalmente no corpo durante a digestão onde enzimas específicas como a pepsina no estômago e a tripsina no intestino, desempenhando um papel importante na quebra de proteínas. A hidrólise enzimática é comumente usada em diversas indústrias, incluindo alimentos e bebidas, produtos farmacêuticos e produção de biocombustíveis, para converter substratos complexos em produtos mais úteis. Esse processo é influenciado por vários fatores, incluindo concentração de enzima, concentração do substrato, pH, temperatura e tempo de ocorrência (Adler-Nissen, 1976).

A pepsina, uma endopeptidase derivada da mucosa gástrica de animais, é empregada em processos de hidrólise enzimática de proteínas. Ativa em pH ácido, cerca de 2, a enzima especificamente cliva ligações peptídicas, resultando em peptídeos menores.

Com preferência por aminoácidos hidrofóbicos como fenilalanina, leucina e tirosina, a pepsina, geralmente proveniente de porcos, tem potencial para gerar peptídeos bioativos. Esses peptídeos exibem propriedades benéficas à saúde, tais como antioxidantes, antimicrobianas e anti-hipertensivas, destacando seu papel positivo nos processos biológicos e potencial aplicação terapêutica (Garba; Kaur, 2014).

A pancreatina, enzima produzida no pâncreas, desempenha papel vital na digestão. Composta por amilase, lipase e protease, age no intestino delgado para quebrar carboidratos, gorduras e proteínas. A amilase converte amidos em açúcares, a lipase decompõe gorduras em ácidos graxos, e a protease divide proteínas em aminoácidos (Aronson, 2006). Em casos de insuficiência pancreática, a suplementação de pancreatina melhora a digestão e a absorção de nutrientes.

Outra enzima importante do sistema digestivo, a tripsina, ativa outras pró-enzimas, desempenhando um papel importante como biomarcador para o diagnóstico de condições como pancreatite, câncer pancreático, fibrose cística e cirrose biliar. Classificada como uma serina protease (Número da Comissão de Enzimas 3.4.21.4) da superfamília PA, a tripsina é secretada pelo pâncreas como uma pró-enzima inativa chamada tripsinogênio, que é ativada no intestino delgado. Abaixo é apresentada uma imagem da estrutura da enzima tripsina.

Ainda segundo dados obtidos no protein data bank in europeu knowledge base (PDB-KB- <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pdbe-kb/>), a enzima hidrolisa especificamente o lado carboxil-terminal (C-terminal) dos aminoácidos carregados positivamente arginina e lisina. A tripsina consiste em uma cadeia polipeptídica de 223 aminoácidos e apresenta um peso molecular de 23,3 kDa. Segundo Kaur e Singh (2022), o mecanismo enzimático da hidrólise do substrato pode ser descrito da seguinte forma: o substrato, uma cadeia lateral polipeptídica, liga-se ao sítio ativo da enzima, posicionando o carbono carbonílico dos resíduos de aminoácidos em direção ao resíduo nucleofílico Ser195 da enzima. O resíduo His57, no sítio ativo, abstrai um próton do grupo -OH do Ser195. Consequentemente, Ser195 ataca o carbono carbonílico da ligação peptídica do substrato, gerando uma ligação covalente com o substrato. A carga negativa desenvolvida no carbono carbonílico é estabilizada por dois prótons de amida da cadeia principal da enzima. O nitrogênio amídico do substrato doa um átomo de hidrogênio ao His57, liberando a parte C-terminal do substrato livremente. Finalmente, uma molécula de água hidrolisa a ligação éster formada entre o peptídeo do substrato e o oxigênio do Ser195 da enzima, regenerando o grupo -OH do Ser195 para o próximo ciclo de catálise, seguido pela dissociação do peptídeo do substrato hidrolisado.

Segundo Garba; Kaur, (2014) a tripsina é ativa em pH alcalino, seu uso na hidrólise proteica pode resultar na produção de peptídeos menores com diversas funcionalidades, incluindo peptídeos possivelmente bioativos com potenciais benefícios à saúde. Formada a partir do tripsinogênio, é ativada pela enterocinase e autocatálise. No intestino, o conteúdo parcialmente digerido (chamado de quimo) é digerido por enzimas como a tripsina que atua de maneira específica, clivando resíduos de aminoácidos específicos, como lisina e arginina. Essa especificidade garante que a tripsina corte as proteínas de maneira controlada e produza frações peptídicas.

Sendo também uma serino-protease, a alcalase utiliza um mecanismo de catálise que envolve uma tríade catalítica composta por três aminoácidos no seu sítio ativo: serina, histidina e aspartato. Na imagem a seguir é apresentada a estrutura da alcalase.

O processo de catálise pode ser descrito em várias etapas. Inicialmente, a proteína substrato se liga ao sítio ativo da enzima, onde a serina na posição 221 (Ser221) é a principal responsável pela catálise. Em seguida, a histidina no sítio ativo atua como uma base, aceitando um próton da serina, o que aumenta a nucleofilicidade do oxigênio da serina. Este oxigênio nucleofílico ataca o carbono do grupo carbonila da ligação peptídica da proteína substrato, formando um intermediário tetraédrico (Garba; Kaur, 2014).

A partir desse ponto, o intermediário tetraédrico colapsa, levando à clivagem da ligação peptídica e formando um intermediário acila-enzima, liberando o fragmento C-terminal da proteína. Posteriormente, a molécula de água entra no sítio ativo, onde é ativada pela histidina para atuar como nucleófilo, atacando o intermediário acila-enzima. Isso resulta na liberação do fragmento N-terminal da proteína, completando a reação de hidrólise e regenerando a enzima para um novo ciclo catalítico (Garba; Kaur, 2014).

3.7.3. Hidrólise por fermentação microbiana

A hidrólise de proteínas também pode ser realizada através do processo biotecnológico de fermentação microbiana, que utiliza microrganismos que produzem enzimas proteolíticas, que são responsáveis por transformar as proteínas em peptídeos mais curtos. A utilização desses microrganismos pode ocorrer em seu estado natural ou como parte da cultura inicial (Cruz-Casas et al., 2021).

Há diversas técnicas de fermentação, contudo, as mais empregadas são a fermentação em estado sólido (FES) e a submersa (FS). A FS é uma cultura de microrganismos em um meio líquido, rico em nutrientes. Este sistema é apropriado para microrganismos que possuem atividades de alto teor de água, como as bactérias, e proporciona a vantagem de que os peptídeos bioativos produzidos são de fácil purificação. Por outro lado, a FSE envolve o desenvolvimento de microrganismos em substratos sólidos ricos em nutrientes, com a vantagem de liberar nutrientes de maneira controlada, sendo mais apropriada para fungos e microrganismos que requerem menos umidade (Cruz-Casas et al., 2021).

No decorrer do processo de fermentação microbiana, é muito importante manipular o substrato correto, o microrganismo apropriado e as condições ambientais ideais, tais como pH, temperatura e umidade, a fim de produzir peptídeos com maior bioatividade (Melini et al., 2019).

De acordo com Cruz-Casas et al., (2021), o processo de degradação de proteínas inicia-se quando as proteases ligadas ao envelope celular (CEP) dos microrganismos envolvidos decompõem as proteínas e as convertem em oligopeptídeos. Os microrganismos que mais se destacam na produção de peptídeos bioativos incluem bactérias como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* e *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*.

O processo de fermentação microbiana para a produção de peptídeos bioativos é relativamente econômico em relação à enzimática. Contudo, a utilização industrial da fermentação para a produção de peptídeos bioativos é inviável devido a um rendimento reduzido na produção de peptídeos e à ausência de especificidade na formação desses peptídeos (Tsugita; Scheffler, 1982).

3.8. Métodos utilizados para a determinação de proteínas

3.8.1. Método Kjeldahl

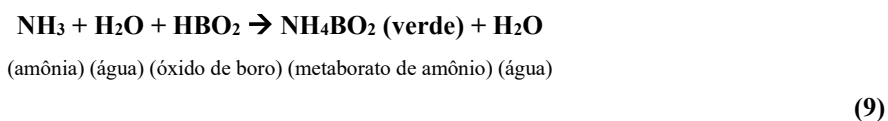
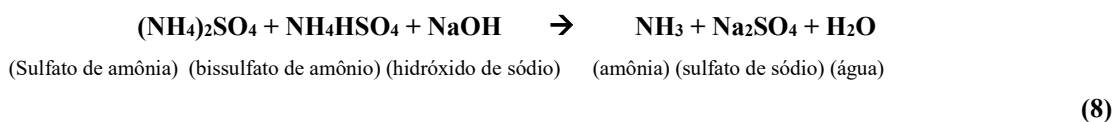
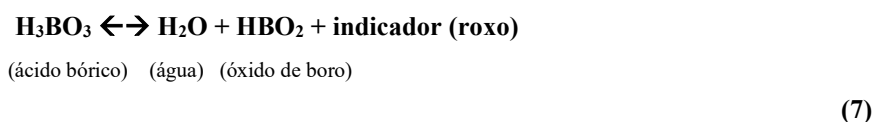
O método Kjeldahl é o método de referência internacional usado em alimentos e rações, sendo o ensaio mais comumente utilizado em isolados de proteína. A amostra do alimento é digerida por aquecimento na presença de ácido sulfúrico (agente oxidante) e converte qualquer nitrogênio no alimento (exceto aquele que está na forma de nitratos ou nitritos) em amônia (Kjeldahl, 1883).

O gás amônia não é liberado em uma solução ácida porque a amônia está na forma do íon amônio (NH_4^+) que se liga ao íon sulfato (SO_4^{2-}) e, portanto, permanece em solução. A solução é então tornada alcalina pela adição de hidróxido de sódio (em concentração próxima a 40% m/v), que converte o sulfato de amônio em gás amônia (Gunathilake, 2015; Kjeldahl, 1883).

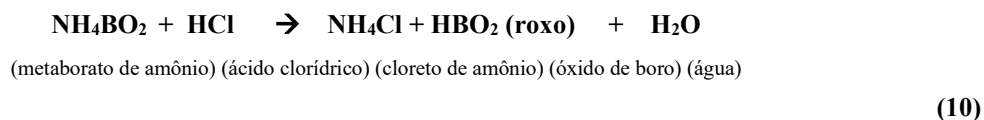
O baixo pH da solução converte o gás amônia no íon amônio e, simultaneamente, converte o ácido bórico no íon borato. O teor de nitrogênio é então estimado pela titulação do borato de amônio formado com ácido sulfúrico ou clorídrico padrão, usando um indicador adequado para determinar o ponto final da reação (Gunathilake, 2015; Kjeldahl, 1883).

As reações que ocorrem em cada etapa estão descritas a seguir:

- 1ª fase - Digestão: quebra das proteínas, aqui o ácido sulfúrico ou H_2SO_4 funciona como o agente oxidante que quando combinado com altas temperaturas quebra as proteínas; e o sulfato de cobre ou CuSO_4 e o sulfato de potássio K_2SO_4 irão agir como catalisadores, onde o segundo vai evitar a evaporação do ácido sulfúrico aumentando o seu ponto de ebulição.
- 2ª fase - Destilação: Os sais de amônio quando em hidróxido de sódio ou NaOH liberam a amônia; e o ácido bórico quando reage com a amônia irá formar o metaborato de amônio de acordo com as equações 7, 8, 9 e 10.



- 3ª fase – Titulação onde irá ocorrer a seguinte reação



Tal método ainda carece de seletividade analítica para proteína porque mede a proteína com base no teor total de nitrogênio e não distingue o nitrogênio da proteína, aminoácido livre ou outros compostos nitrogenados presentes na amostra, como nitrogênio inorgânico, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, amidas, sais de amônio, glicosídeos nitrogenados, porfirinas, gorduras, hormônios, ácidos nucleicos, entre outros. Portanto, o fator de conversão de 6,25 é inexato e resulta em superestimação da proteína total (Gunathilake, 2015).

3.8.1.1. Método de Lowry

O método Lowry et al., (1951) foi originalmente sugerido por Wu, (1922), sendo umas das técnicas mais empregadas para determinar a concentração de proteínas.

O princípio do método se fundamenta pela combinação de molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que pode reagir com proteínas, em meio ao catalisador cobre (II), gerando um composto de coloração azul com absorção máxima em 750 nm (Zaia; Zaia; Lichtig, 1998). A cisteína, tirosina e o triptofano são os aminoácidos cromógenos. A coloração do teste parece manter-se relativamente estável até 4 horas após a adição do reagente de Folin-Ciocalteu (POMORY, 2008). A reação pode ser mais bem observada na Figura 8.

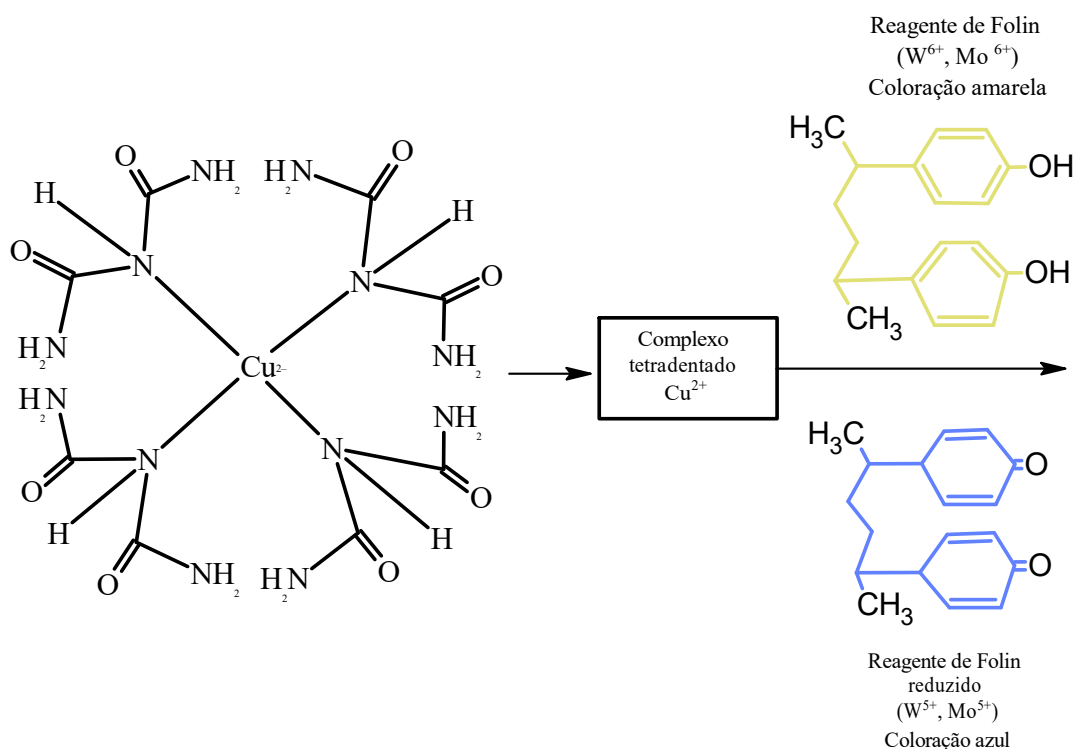


Figura 8. Reação do reagente Folin em meio a catalisador cobre (ii). (Fonte: A autora, 2025).

O método de Lowry é bastante sensível, oferecendo maior precisão em comparação com outros métodos de determinação de proteínas, além de requerer menos amostras e ser menos propenso a certos tipos de interferências (Zaia; Zaia; Lichtig, 1998). Entretanto, tais vantagens não são suficientes para que este método seja 100% eficaz, uma vez que, o mesmo apresenta um tempo de análise extenso e também absortividade específica elevada, o que leva a alta variabilidade para diversas proteínas, e a lei de Lambert-Beer funciona somente em um limitado intervalo de concentração de proteínas (Lowry et al., 1951a).

Em seus estudos, Dawson; Heatlie, (1984) confirmaram que outro fator que poderia interferir no método de Lowry seria a luz, pois os autores observaram que as absorbâncias estavam sempre mais altas em amostras expostas diretamente à luz natural, chegando à conclusão de que o teste pode ser sensível a luz.

3.8.1.2. Método Bradford

O ensaio de Bradford baseia-se na ligação do corante Coomassie Blue G₂₅₀ às proteínas. Esse método apresenta pouca interferência da maioria dos reagentes bioquímicos comumente utilizados. O corante pode estar presente em três formas: catiônica (vermelha), neutra (verde) e aniônica (azul) (Compton; Jones, 1985).

Em condições ácidas, o corante é encontrado predominantemente na forma catiônica vermelha, com duplo próton (Absorbância máxima = 470 nm). No entanto, ao se ligar a proteínas, o corante é convertido em uma forma azul estável e não protonada (Absorbância máxima = 595 nm) e essa forma azul de ligação entre proteína e corante que é detectada no comprimento de onda de 595 nm durante o ensaio, utilizando um espectrofotômetro (Reisner; Nemes; Bucholtz, 1975). Essa reação está representada na Figura 9.

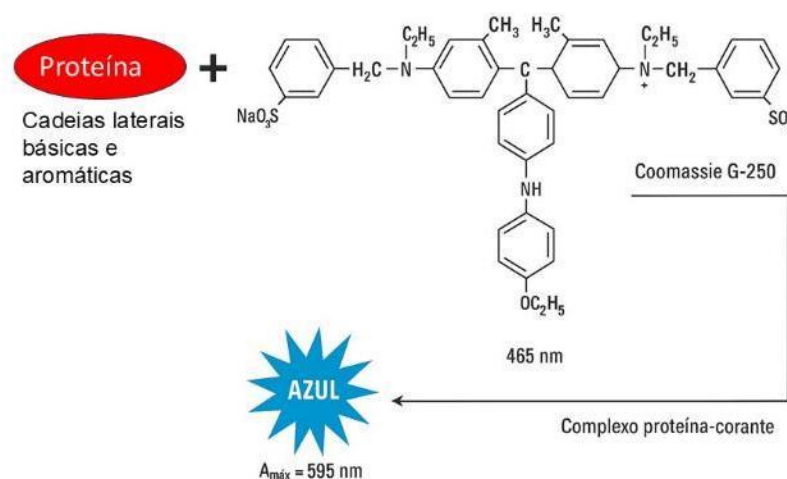


Figura 9. Reação de Bradford. (Fonte: A autora, 2025).

3.9. Peptídeos bioativos e suas funcionalidades

Peptídeos são moléculas formadas pela união de dois ou mais aminoácidos através de ligações peptídicas. Eles são cadeias curtas de aminoácidos, em contraste com proteínas que são cadeias mais longas e complexas (Fan *et al.*, 2022).

Peptídeos bioativos são fragmentos de proteínas que, além de suas funções nutricionais básicas, têm um impacto positivo específico nas funções ou condições fisiológicas do corpo.

Eles são liberados durante a digestão de proteínas alimentares ou através de processos tecnológicos, como fermentação ou hidrólise enzimática. Esses peptídeos podem exercer diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-hipertensivas, imunomoduladoras e de ligação ao cálcio. Sua ação pode contribuir para a prevenção e tratamento de doenças crônicas, melhorando a saúde geral e o bem-estar (Fan et al., 2022).

Até o momento, numerosos peptídeos bioativos foram isolados de diversas fontes. Os peptídeos bioativos podem ser absorvidos através dos intestinos e podem entrar no sistema circulatório em formas intactas, permitindo-lhes exercer suas atividades biológicas, atividades de melhoria da memória e cognitiva, reguladores do apetite, opiáceos, hepatoprotetor, antidiabético. Alguns produtos comerciais que contêm peptídeos bioativos foram lançados no mercado, como Calpis® e Evolus®, que contêm inibidores ECA derivados do leite e ricos em tripeptídeos (Fan et al., 2022).

Os peptídeos desempenham uma variedade de funções no corpo, incluindo a atuação como neurotransmissores e hormônios. A estrutura e a função de um peptídeo são determinadas pela sequência e pela estrutura tridimensional dos seus aminoácidos. Em particular, a identificação de peptídeos bioativos derivados de proteínas vegetais acompanha o crescente interesse em relação aos alimentos vegetais, devido a sustentabilidade em relação aos alimentos de origem animal e exigências do consumidor de dietas saudáveis e balanceadas (Rizzello et al., 2016).

Marques et al., (2015) avaliaram a atividade hipocolesterolêmica de peptídeos derivados de proteínas de feijão-caupi, obtidos por digestão fisiológica simulada *in vitro*. O hidrolisado resultante foi caracterizado e teve suas frações separadas, que demonstraram inibir a enzima HMG-CoA redutase e reduzir a solubilidade micelar do colesterol. A análise de sequenciamento de peptídeos e modelagem computacional identificou o peptídeo GCTLN como capaz de se ligar à HMG-CoA redutase.

Ajayi et al., (2023), obtiveram peptídeos com atividade anti-hipercolesterolêmica a partir de hidrolisados proteicos de quinoa. Neste estudo foi realizado três métodos de hidrólise enzimática diferentes (com quimiotripsina, protease e bromelaína). Os hidrolisados gerados pela hidrólise com quimiotripsina apresentaram maior poder inibitório.

3.9.1. Atividade antioxidante de peptídeos

Existem moléculas ou radicais que representam preocupação para a saúde humana, uma vez que promovem a oxidação de biomoléculas e estão fortemente vinculadas ao avanço do envelhecimento e a diversas doenças, como polifenóis e peptídeos antioxidantes que podem ajudar a mitigar os efeitos nocivos dos radicais livres, oferecendo proteção contra danos oxidativos e retardando o processo de envelhecimento (Halliwell, 2012).

De acordo com o trabalho de Zhu et al., (2023) peptídeos antioxidantes (AOPs) são moléculas formadas por cadeias curtas de aminoácidos que possuem a capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS) e outros radicais livres, reduzindo assim o estresse oxidativo. Esses peptídeos podem ser encontrados naturalmente em alimentos ricos em proteínas, como peixes, ovos e produtos lácteos, ou podem ser sintetizados artificialmente. AOPs agem por diversos mecanismos, incluindo a doação de elétrons para neutralizar radicais livres, a quelagem de íons metálicos que catalisam a formação de ROS, e a regulação de enzimas antioxidantes no organismo.

Zhu et al., (2023) destacam a importância dos AOPs na prevenção e no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes e câncer. Além disso, os peptídeos antioxidantes têm mostrado potencial na proteção contra o fotoenvelhecimento da pele, tornando-os promissores para aplicações cosméticas. O estudo também aborda métodos de avaliação da atividade antioxidante dos AOPs, como ensaios de captura de radicais livres e estudos *in vitro* e *in vivo*, que são cruciais para entender a eficácia e o mecanismo de ação desses peptídeos. A pesquisa de Zhu et al., (2023) enfatiza a necessidade de mais estudos para explorar novas fontes de AOPs e otimizar suas propriedades antioxidantes para aplicações terapêuticas.

A ação da atuação dos peptídeos bioativos no corpo humano é mostrada na Figura 10.

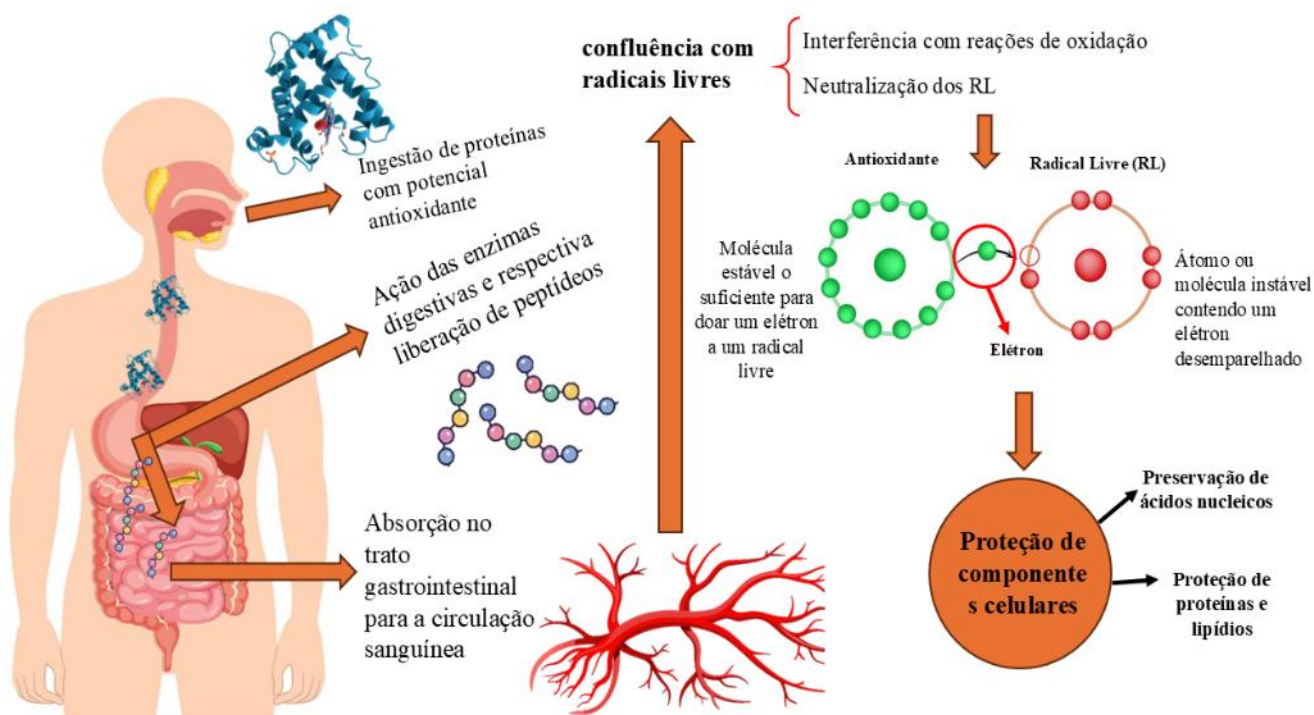


Figura 10. Atuação de peptídeos antioxidantes no organismo. (Fonte: A autora, 2025).

A digestão dos AOPs começa no estômago, onde as enzimas proteolíticas começam a quebrar as proteínas em peptídeos menores. Esses peptídeos são então absorvidos no intestino delgado e entram na corrente sanguínea (Bianchi; Antunes, 1999).

Segundo Bianchi; Antunes, (1999), uma vez na corrente sanguínea, os peptídeos antioxidantes são distribuídos para os vários tecidos do corpo. Eles podem ser encontrados em altas concentrações em tecidos que são particularmente suscetíveis ao estresse oxidativo, como o cérebro, o coração e o fígado. Os peptídeos antioxidantes entram nas células através de transportadores específicos localizados na membrana celular. Uma vez dentro da célula, eles podem exercer seus efeitos antioxidantes.

Dentro da célula, os peptídeos antioxidantes encontram radicais livres e os neutralizam doando um elétron, o que estabiliza esses radicais e impede que causem mais danos. Após a neutralização, os peptídeos antioxidantes são expulsos da célula, permitindo que esta mantenha um equilíbrio saudável entre antioxidantes e radicais livres. Com isso, protegem componentes celulares importantes, como proteínas, lipídios e DNA, do dano oxidativo. Isso ajuda a manter a função celular normal e a prevenir doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Além disso, os

peptídeos antioxidantes podem estimular a produção de antioxidantes endógenos pelo corpo, aumentando a capacidade antioxidante geral e fortalecendo as defesas contra o estresse oxidativo (Bianchi; Antunes, 1999).

Vários estudos estão focando na funcionalidade e atividade biológica dos isolados de proteínas alimentares e os hidrolisados proteicos. Estes peptídeos apresentam uma estrutura relativamente simples, baixo massa molecular, fácil absorção, alta atividade e maior estabilidade em diversas condições, se comparados aos antioxidantes sintéticos (Agrawal; Joshi; Gupta, 2016).

Bayram et al., (2008), investigaram a atividade antioxidante de frações de proteína do soro de leite, com destaque para α -lactoglobulina e β -lactalbumina. Essas frações demonstraram capacidade de eliminar radicais superóxidos, indicando potencial antioxidante. As frações foram isoladas por cromatografia de exclusão de tamanho e tratamento enzimático. A eletroforese em gel identificou as proteínas presentes. Essa atividade antioxidante pode melhorar a estabilidade do produto, prevenindo a deterioração oxidativa. Além disso, Tawalbeh et al., (2023), revisaram os avanços recentes na pesquisa de peptídeos bioativos derivados de hidrolisados de proteínas de leguminosas, enfocando suas atividades antioxidantes, inibitórias da enzima conversora de angiotensina (ECA) e anti-inflamatórias e destacaram os peptídeos obtidos de leguminosas pois apresentam significativa bioatividade, incluindo capacidade antioxidante, potencial anti-hipertensivo por meio da inibição da ECA e efeitos anti-inflamatórios, sugerindo seu uso promissor no desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos.

Para obtenção de peptídeos funcionais várias técnicas podem ser utilizadas, tais como hidrólise enzimática, ácida, alcalina, digestão *in vitro* e processos físicos, como ultrassom e micro-ondas. Esses métodos fragmentam proteínas em peptídeos menores, resultando em produtos de fácil absorção. A Tabela 3 apresenta diversos trabalhos que utilizaram diferentes técnicas para a obtenção de hidrolisados proteicos para a produção de peptídeos bioativos.

Tabela 3. Técnicas para obtenção de peptídeos e suas eficiências, prós e contras.

Matéria-Prima	Técnica utilizada	Bioatividade	Vantagens	Desvantagens	Referências
Millhetos (<i>Eleusine coracana</i>)	Hidrólise enzimática com tripsina e pepsina (hidrólises realizadas separadamente)	Não há dados de rendimento, porém o hidrolisado de tripsina foi escolhido para a purificação devido seu conteúdo peptídico ser maior	Hidrólise enzimática com uma única enzima tem condições ótimas mais conservadas.	A especificidade da enzima restringe a obtenção de frações peptídicas.	Agrawal; Joshi; Gupta, (2016)
Sementes de Feijão (com e sem enriquecimento com grãos de espelta)	Digestão in vitro em condições gastrointestinais simuladas seguindo o método descrito por Minekus et al. (2014).	Hidrolisados de sementes de feijão, com ou sem grãos de espelta, mostraram similaridade estatística em teor de peptídeos.	A digestão in vitro simula as fases oral, gástrica e intestinal, fornecendo dados relevantes para compreender a fisiologia humana.	O método simula fases digestivas, mas desconsidera variações fisiológicas, como microbiota intestinal, comprometendo a precisão.	Grdenj; Jakubczyk, (2023)
Gergelim preto	Fermentação com <i>Lactobacillus plantarum</i> NCU116 + hidrólise enzimática com protease ácida + modelagem RF-PSO + separações cromatográficas + triagem in silico	Oito peptídeos identificados com atividade inibitória da ECA (IC ₅₀ entre 51,69 µM e 3,43 mM); os dois principais (ITAPHW e SLPNYHPSPR) com maior atividade	Melhora da atividade inibitória da ECA; predição eficiente com RF-PSO; descoberta de peptídeos bioativos potentes	Processo complexo com múltiplas etapas; alguns peptídeos com IC ₅₀ relativamente alto (menor atividade)	Du et al., (2024)
Proteínas da semente de laranja	Hidrólise enzimática com pepsina (1–3%, 2–5h, 33 °C), seguida de digestão gastrointestinal simulada, cromatografia por exclusão de tamanho, RP-HPLC, nano-LC-MS	Frações 45–49 e 50–54 apresentaram as maiores atividades biológicas; melhor atividade com 0,03 E/S e 3,5h de hidrólise	Geração de peptídeos com múltiplas atividades biológicas (antioxidante, inibidora da ACE, α-amilase e α-glicosidase); atividade mantida após digestão simulada	Exige múltiplas etapas de separação e análise; dependente de condições específicas de hidrólise para melhor atividade	MazloomI et al., (2021)

Vários fatores podem influenciar a funcionalidade de hidrolisados e peptídeos bioativos, como o tipo e a fonte da proteína, o pré-tratamento da proteína, o tipo de enzima e as condições de proteólise.

Os peptídeos bioativos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) têm ganhado destaque devido ao seu potencial terapêutico na regulação da pressão arterial e no tratamento de doenças cardiovasculares. A ECA é uma enzima-chave no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que controla o volume sanguíneo e a pressão arterial. Peptídeos inibidores da ECA, encontrados em alimentos proteicos, podem reduzir a conversão de angiotensina I em angiotensina II, um potente vasoconstritor, resultando na diminuição da pressão arterial. Além disso, esses peptídeos têm demonstrado efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e cardioprotetores, tornando-os importantes aliados na prevenção e manejo de hipertensão e outras complicações cardiovasculares, promovendo assim uma melhor qualidade de vida (Garbacz et al., 2023).

3.10. Compostos fenólicos em matérias-primas de origem vegetal

Matérias-primas de origem vegetal, como frutas, hortaliças, cereais e resíduos agroindustriais, são fontes ricas de compostos fenólicos. Dentre os alimentos, destacam-se as frutas baga, como uvas, mirtilos e morangos, devido à elevada concentração de antocianinas, flavonoides e taninos condensados. Nessas fontes, os compostos fenólicos podem estar livres ou ligados, tipicamente como b-glicosídeos, mas as análises muitas vezes subestimam seu conteúdo total. O processamento e o armazenamento podem alterar sua composição, resultando na perda ou concentração de certos compostos. A agricultura orgânica pode aumentar seus níveis, embora nem sempre de forma consistente. Além disso, processos como produção de sucos e conservas influenciam a biodisponibilidade e a atividade antioxidante dos fenólicos de maneira variável Balasundram; Sundram; Samman, (2006).

Entre outras metodologias de extração para análises ou purificação, a extração assistida por ultrassom (EUA) é uma técnica vantajosa em comparação com as técnicas tradicionais, como isolamento por solvente e isolamento supercrítico, pois requer menos tempo e energia, além de operar em temperaturas mais baixas, preservando a qualidade dos extratos. A EUA utiliza ondas ultrassônicas para causar a cavitação acústica, que desestabiliza as células vegetais e facilita a liberação dos compostos desejados (Medina-Torres et al., 2017).

3.11. Química da atividade antioxidante por diferentes métodos de determinação

As substâncias antioxidantes combatem radicais livres que possam prejudicar o metabolismo do organismo, apresentam em sua estrutura substituintes doadores de hidrogênio ou elétrons, capacidade de ressonância do radical ou capacidade quelante dos metais (Parcheta et al., 2021). Compostos fenólicos, carotenoides e tocoferóis são exemplos de substâncias naturais que tem capacidade antioxidante. Dentre os diversos métodos para a medição da capacidade antioxidante está o método usando o reagente DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Este método baseia-se na reação do DPPH com a substância antioxidante, tornando-se violeta-claro ou amarelo. A medição é feita por espectrofotometria de UV/visível. A Figura 11 apresenta a reação do reagente DPPH.

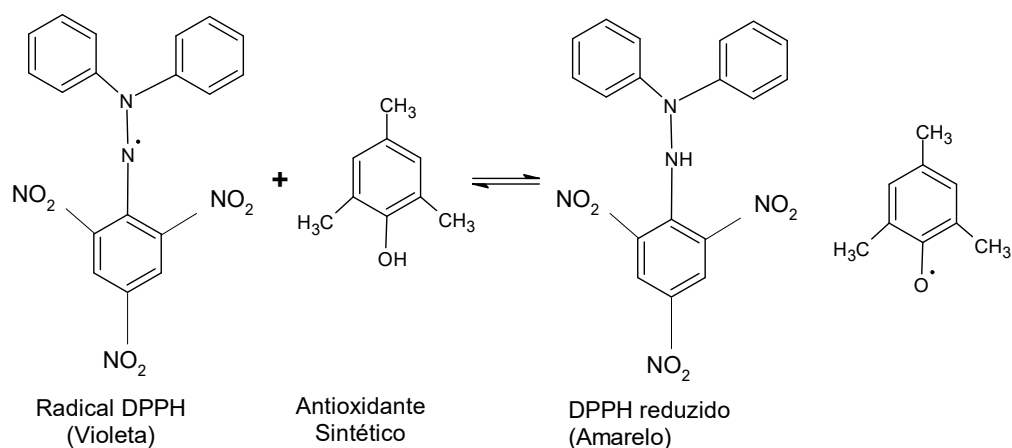


Figura 11. Reação do radical DPPH. (Fonte: A autora, 2025).

Outro método para avaliar a atividade antioxidante é a partir da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS). Esse radical pode ser gerado por meio de uma reação química, eletroquímica ou enzimática, conforme ilustrado na Figura 12. Essa metodologia é eficaz na medição da atividade antioxidante de compostos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos (Rufino et al., 2011). O método ABTS envolve a geração de um radical catiônico estável ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) através da oxidação do ABTS. Este radical é caracterizado por uma coloração verde-azulada intensa, com um máximo de absorção em torno de 734 nm. Quando um antioxidante está presente, ele doa elétrons ou átomos de hidrogênio ao radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, reduzindo-o à sua forma não radical e resultando em uma descoloração da solução. A extensão da descoloração é proporcional à capacidade antioxidante da amostra. A Figura 12 apresenta a reação do radical.

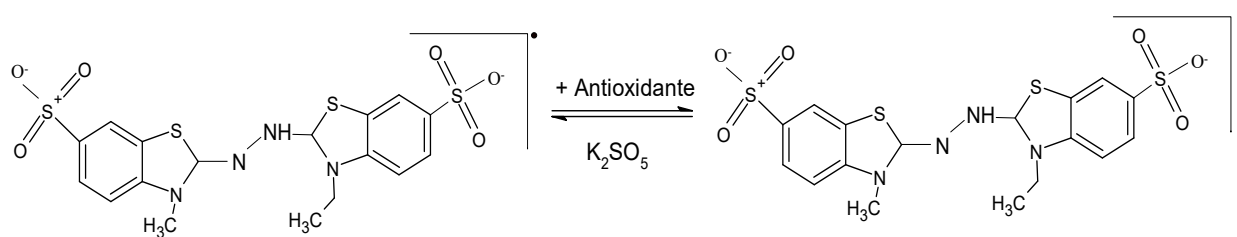


Figura 12. Reação do radical ABTS. (Fonte: A autora, 2025).

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta das amostras

As biomassas (tortas) de andiroba (*Carapa guianensis*), murumuru (*Astrocaryum murumuru*) e tucumã (*Astrocaryum vulgare*) foram obtidas da empresa AmazonOil (Ananindeua-PA) após passarem pelo processo de prensagem para obtenção de óleo. As tortas foram trituradas em moinho martelos com peneira de saída de 1 mm, posteriormente desengorduradas com n-hexano na proporção massa: volume de 1:6 (m:v) em agitação constante por seis horas sob temperatura ambiente. A biomassa desengordurada foi acondicionada em sacos de polietileno e armazenadas sob temperatura de -18 °C até o momento do uso.

4.2. Composição centesimal

A composição centesimal foi realizada com as três biomassas seguindo os métodos da (Aoac, 2000). Esses dados foram importantes nas etapas posteriores, para a obtenção de informações sobre a eficácia do desengorduramento e extração de proteínas. A seguir tem-se as metodologias detalhadas das análises de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas. O teor de carboidratos foi obtido por cálculo de diferença.

4.2.1. Teor de Umidade

A determinação de umidade foi realizada conforme o método da AOAC (n. 925.09), onde foi utilizado 2 gramas da biomassa e deixado por 6 horas na estufa a 105°C. O cálculo do teor de umidade foi realizado de acordo com a equação 11 a seguir.

$$U(\%) = \left(\frac{m_{Ai} - (m_{CAS} - m_{TC})}{m_{Ai}} \right) \times 100 \quad (11)$$

Onde:

U (%) = Teor de umidade em porcentagem

m_{Ai} = Massa de amostra inicial

m_{CAS} = Massa do cadinho com amostra seca.

m_{TC} = Massa da tara do cadinho.

4.2.2. Teor de cinzas

O conteúdo de resíduo mineral fixo foi determinado conforme a metodologia da AOAC (n. 923.03) no qual foram destinados à mufla para incineração a 550 °C por 5 horas. A equação 12 a seguir apresenta como foi realizado o cálculo para teor de cinzas.

$$C(\%) = \left(\frac{m_{cfa} - m_c}{m_{Ai}} \right) \times 100 \quad (12)$$

No qual:

C (%) = Teor de cinzas em porcentagem

m_{Ai} = Massa de amostra inicial

m_{cfa} = Massa final do cadinho mais amostra

m_c = Massa da tara do cadinho

4.2.3. Teor de lipídios

A determinação de lipídeos foi realizada de acordo com a metodologia da AOAC (n. 920.85) baseado na extração de gordura com solvente orgânico em extrator de gordura soxhelet. A equação 13 representa o cálculo realizado para definir o conteúdo de lipídios nas amostras.

$$L(\%) = \left(\frac{m_{cf} - m_{ci}}{m_A} \right) \times 100 \quad (13)$$

Onde:

L (%) = Teor de Lipídios em porcentagem

M_{cf} = Massa do reboiler no final

m_{ci} = Massa da tara do reboiler

m_A = Massa de amostra

4.2.4. Quantificação de proteínas

A determinação de proteína foi realizada pela quantificação do nitrogênio presente nas amostras através do método de Kjeldahl conforme AOAC (n. 920.87). Para a conversão de nitrogênio em proteínas utilizou-se o fator de 6,25. A equação 14 apresenta o cálculo para teor de proteína.

$$P(\%) = \left(\frac{(V_a - V_{br}) \times N \times F_c \times 14,007}{m_A} \right) \times 100 \times 6,25 \quad (14)$$

Onde:

P (%) = Teor de proteína em porcentagem

V_A = Volume de ácido gasto na titulação

V_{br} = Volume de ácido gasto na titulação do branco

N_A = Normalidade do ácido

F_c = Fator de correção do ácido

M_A = Massa de amostra

4.2.5. Análise de proteínas por espectrofotometria

A análise de proteína nos hidrolisados foi determinado de acordo com o método de Lowry (1951b). Para o preparo da solução A, composta por Na₂CO₃ a 2% em NaOH 0,1N, foram pesados 0,1 g de NaOH e 0,5 g de Na₂CO₃ em água destilada, homogeneizados e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL para o ajuste de volume. Para o preparo da solução B, composta por CuSO₄·5H₂O a 0,5% e citrato de sódio a 1%, foram pesados 0,05 g de CuSO₄·5H₂O e 0,1 g de citrato de sódio em água destilada, homogeneizados e transferidos para em um balão volumétrico de 10 mL para o ajuste de volume. No momento do uso, preparou-se a solução C, misturando-se a solução A com a solução B na proporção de 50:1. Posteriormente, a solução D foi preparada na proporção de 1:1 do reagente de Folin-Ciocalteu Folin-Ciocalteu (ACS, Brasil) e água destilada. Essa solução foi preparada na ausência de luz. Uma solução padrão de soroalbumina bovina (BSA) na concentração de 500 µg/mL foi preparada para realizar a curva de calibração.

Na montagem da placa de 96 poços, pipetaram-se 25 µL de cada amostra e/ou padrão, aos quais foram acrescentados 250 µL da solução C. A placa foi levemente agitada para homogeneizar os reagentes e incubada por 10 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Após esse período, acrescentou-se 25 µL da solução D (Folin) e a placa foi incubada a 37 °C por 15 minutos ao abrigo da luz. Após esse período, a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm.

4.3. Análise de compostos fenólicos

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado conforme metodologia de (Singleton et al., 1999), com pequenas modificações para microplaca. Para a análise foram utilizados 25 µL do extrato diluído, 125 µL de Folin-Ciocalteu 2 N (ACS, Brasil) a 10% e 100 µL de solução de carbonato de sódio (99,5 %, ACS, Brasil) a 7,5%. Após 30 min de reação, a absorbância foi medida a 765 nm utilizando um espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific Oy, Multiskan Go-SN-1530-8001397, Finlândia). A quantificação foi realizada utilizando ácido gálico monohidratado (98%, Neon, Brasil) como padrão, nas concentrações de 5 a 200 mg/L, para construção da curva analítica. A partir da equação da reta ($y=ax+b$; R^2) foi realizado o cálculo do conteúdo que foi expresso em miligrama de equivalente ácido gálico por grama cem gramas de extrato (mg GAE.g⁻¹).

4.4. Verificação de condições para extração de proteínas das biomassas

Foram testados a proporção de massa e volume, o tempo de extração e pH usado na extração. Os resultados foram tratados considerando um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) que é amplamente utilizado em experimentos devido à sua simplicidade e eficiência. Segundo (Heru et al., 2023), esse tipo de planejamento, os tratamentos são distribuídos de forma completamente aleatória entre as unidades experimentais, garantindo que cada unidade tenha a mesma probabilidade de receber qualquer tratamento. Essa randomização minimiza vieses e assegura que as diferenças observadas nos resultados sejam atribuídas aos tratamentos e não a fatores externos. A análise dos dados é realizada, geralmente, por meio da análise de variância (ANOVA), que permite identificar se há diferenças significativas entre as médias dos tratamentos. Entre as vantagens desse delineamento estão sua simplicidade de execução e a facilidade de análise dos dados.

4.4.1. Proporção massa de farinha (biomassa) – volume de extrator (água)

As biomassas desengorduradas foram processadas em moinho de facas com peneira de saída de 1mm e classificadas em tamis de 60 mesh. Em seguida, foram estabelecidas diferentes proporções entre massa e volume de 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30 e 1:50, com o pH de extração ajustado em pH 8,5. A dispersão foi mantida em agitação constante, em agitador magnético, durante 60 minutos em temperatura ambiente (25 ± 5 °C). O material foi centrifugado a 10.000

x g por 20 min. sob 4 °C em centrífuga refrigerada e do sobrenadante foram coletadas alíquotas para a determinação do nitrogênio (N₂) solúvel pelo método de Kjeldahl (Aoac 2005).

4.4.2. Variação do tempo na extração da proteína

As biomassas desengorduradas foram dispersas em água na proporção m/v (1:10), nos intervalos de tempo entre; 10, 20, 30, 60 e 120 minutos, o pH de extração foi ajustado em 8,5 com NaOH 1 mol. L⁻¹ e monitorado durante a extração da proteína. A dispersão foi mantida sob agitação mecânica por uma hora, a velocidade constante e temperatura ambiente (25 ± 5°C). O material foi centrifugado a 10.000 x g por 20 min. sob 4°C em centrífuga refrigerada e do sobrenadante foram colhidas alíquotas para a determinação do nitrogênio solúvel pelo método de Kjeldahl (Aoac, 2005).

4.4.3. Efeito do pH na solubilidade da proteína

A solubilidade da proteína da farinha desengordurada da biomassa foi determinada seguindo o método descrito por Wang e Kinsella (1976), com modificações. Amostras de biomassa com teor de proteína conhecido foram utilizadas em soluções de 1g de massa ajustado para o volume e o tempo do melhor resultado obtido nas etapas de relação massa:volume e efeito do tempo na extração da proteína. O pH foi ajustado e monitorado com um pHmetro digital de bancada (marca Quimis e modelo Q400AS) no intervalo de 1 a 12 com HCl 1,0 mol.L⁻¹ e/ou NaOH 1,0 mol.L⁻¹, o material foi homogeneizado em agitador magnético em velocidade constante e temperatura ambiente (25 ± 5 °C). Após esse tempo o material foi centrifugado a 10.000 x g por 20 min., sob 4°C; coletou-se o sobrenadante e anotou-se o volume, posteriormente, alíquotas de 7 mL foram coletadas para determinação de nitrogênio solúvel pelo método de Kjeldahl (Aoac, 2000). Para o efeito do sal, usou-se solução de NaCl 0,2 mol.L⁻¹ e seguiu-se a mesma metodologia para solubilidade em H₂O destilada.

4.5. Hidrólise enzimática

4.5.1. Hidrólise enzimática com tripsina

A hidrólise enzimática com tripsina foi realizada conforme Yin et al. (2008), com modificações. Suspensões de amostras contendo 2% (m/v) de proteína, calculada de acordo com a Equação 15, foram digeridas por 17 horas em solução 50 mM de tampão fosfato de sódio contendo a enzima tripsina (Merck®, atividade 1.000 a 2.000 BAEU units/mg) na razão de enzima/substrato de 1:100 em pH ajustado em 7,0 sob 37 °C em banho maria com agitação vertical da marca Quimis (modelo Q226M2). A hidrólise foi interrompida por aquecimento a 80 °C por 20 minutos seguido de banho de gelo.

$$\text{Massa de amostra (g)} = \frac{\text{massa de proteína desejada na hidrólise} \times 100}{\% \text{ de proteína do IP (g)}}$$

(15)

4.5.2 Hidrólise enzimática com alcalase

A hidrólise enzimática com a enzima alcalase foi realizada conforme Schmidt; Salas-Mellado, (2009) com modificações. Suspensões contendo 2% (m:v) de proteína foram digeridas por 3 horas em tampão 50 mM fosfato de sódio com a enzima alcalase, *Bacillus licheniformis* (Merck®, activity ≥ 0.75 Anson units/mL) na proporção de enzima substrato 1:100 com o pH ajustado em 7,6 e sob temperatura de 50 °C em banho maria com agitação vertical da marca Quimis (modelo Q226M2). A hidrólise foi interrompida por aquecimento a 80 °C por 20 minutos seguido de banho de gelo.

Após a hidrólise ambos hidrolisados foram centrifugados por 10.000 x rpm por 20 min sob 4°C. O sobrenadante foi filtrado, congelado e liofilizado. O conteúdo proteico dos hidrolisados foram determinados por Lowry et al. (1951) usando a albumina de soro bovina (OmniPur BSA, Fraction V, Cold Alcohol Isolation, Sigma Aldrich) como padrão de proteína para construção da curva de calibração.

4.5.3 Caracterização dos hidrolisados

Suspensões contendo 10 mg de hidrolisados proteicos de tripsina e alcalase liofilizados, foram preparadas com 1 mL de Solvente A (0,045% de TFA em água milli Q), homogeneizados, sonificados por 10 min., centrifugados e filtrados em filtro de 0.45 µm Millex®, foram injetados em cromatógrafo líquido (Shimadzu—Japão) com controlador LC20AT, degaseificador DGU-20A5R acoplado a um injetor manual Rheodyne e um fotodetector UV/vis com arranjos de diodos SPD-M20A. O espectro de cobertura do registro foi de 190 – 400 nm e o comprimento de onda de 220 nm foi monitorado. A separação cromatográfica ocorreu em uma coluna Gemini C18 de fase reversa, 110 Angstrom, 250 × 4.6 mm, tamanho de partícula de 5 µm (Phenomenex—USA). As fases móveis foram: solvente A 0,045% de ácido trifluoroacético (TFA) em água ultrapura; solvente B 0,036% de ácido trifluoroacético (TFA) em acetonitrila grau HPLC (Sigma Aldrich). O gradiente utilizado foi de 5 a 95 de B em 30 minutos. O fluxo usado foi de 1 mL min⁻¹. O gradiente foi selecionado com base na polaridade e solubilidade de diferentes peptídeos (SWERGOLD; RUBIN, 1983).

4.6. Análises de atividade biológicas

4.6.1. Atividade antioxidante por ABTS

A capacidade antioxidante do extrato na condição otimizada frente ao radical livre ABTS^{•+} foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por (Rufino et al., 2007). O cátion ABTS^{•+} foi produzido através da reação de 7 mM da solução estoque ABTS (>98%, Sigma-Aldrich, Brasil) com 140 mM de persulfato de potássio (Neon, Brasil), a mistura permaneceu em frasco escuro em temperatura ambiente por 16 horas antes do uso. A solução foi diluída em etanol (99,5%, Neon, Brasil) para uma absorbância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm em espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific Oy, Multiskan Go-SN-1530-8001397, Finlândia). As reações foram realizadas através da transferência de 30 µL de amostra para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS^{•+}, a leitura foi realizada a 734 nm após 6 minutos da mistura, como branco foi utilizado álcool etílico para calibrar o espectrofotômetro. A quantificação foi realizada utilizando Trolox (Ácido (±) -6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, 97%, Sigma, Brasil) nas concentrações de 100 µM a 2000 µM, para construção da curva analítica. A partir da equação da reta será realizado o cálculo que foi expresso em micromol de equivalente Trolox por grama de extrato.

4.6.2. Atividade antioxidante por DPPH

A quantificação de capacidade antioxidante foi realizada pelo método DPPH descrito por (Brand-Williams et al., 1995), com modificações que consistiu em adicionar 50 μL da amostra diluída em metanol em 150 μL de solução metanólica de DPPH. Simultaneamente, foram preenchidos poços com 200 μL de metanol 70% (99,8%, Neon, Brasil) que foram utilizados como branco, poços controle que consistiram em 50 μL de metanol 70% e 150 μL de solução de DPPH ($\leq 100\%$, Sigma-Aldrich, Brasil) e poços com o branco da amostra que continham 50 μL de amostra diluída e 150 μL de metanol 70%. A placa foi incubada por 40 minutos ao abrigo da luz e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific Oy, Multiskan Go-SN-1530-8001397, Finlândia) no comprimento de onda de 520 nm. A quantificação dos resultados foi realizada por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com concentrações padrões de Trolox de 15 a 300 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ e foi expresso em micromol de equivalente Trolox (Ácido ($\pm$)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, 97%, Sigma, Brasil) por grama de extrato.

4.6.3. Análise antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi conduzida conforme o protocolo descrito por Humphries et al. (2018), com algumas adaptações. A análise teve duração de quatro dias. No primeiro dia, foi realizado o preparo do microrganismo, iniciando-se com a preparação do meio Ágar Mueller-Hinton, que foi vertido em placas de Petri e deixado em repouso até a completa solidificação. Em seguida, procedeu-se à semeadura do microrganismo, com o objetivo de obter colônias isoladas. Essa etapa foi realizada com o auxílio de uma alça de platina estéril, manipulada próxima ao bico de Bunsen, a fim de evitar contaminações. As placas inoculadas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas.

No segundo dia, foram pesados 80 mg de cada hidrolisado e transferidos para eppendorfs estéreis. Em ambiente de fluxo laminar, as amostras foram diluídas em 1 mL de solução de DMSO a 10%, preparada com caldo Mueller-Hinton.

O inóculo bacteriano foi obtido a partir das colônias cultivadas no dia anterior. De 3 a 4 colônias foram transferidas para um tubo Falcon contendo 4 mL de caldo Mueller-Hinton. Após homogeneização, 2 mL dessa suspensão foram utilizados para ajustar a turbidez, por meio de leitura em espectrofotômetro a 625 nm, de acordo com o padrão de McFarland 0,5 (absorbância

entre 0,08 e 0,12). Após o ajuste, foram realizadas diluições para atingir uma concentração final de 10^5 UFC.mL⁻¹.

As amostras foram então submetidas à diluição seriada em duas placas de 96 poços. Na primeira, utilizada como controle de branco, cada poço recebeu 150 µL de caldo Mueller-Hinton e, na linha A, 100 µL da amostra, que foi diluída progressivamente até atingir a concentração mínima de 156 mg. mL⁻¹. A segunda placa recebeu o mesmo procedimento, porém com 100 µL adicionais de caldo e os controles: meio (200 µL), controle positivo (100 µL de cloranfenicol) e controle negativo (100 µL de DMSO a 10%). Por fim, adicionou-se 100 µL do inóculo bacteriano em todos os poços da segunda placa. As placas foram incubadas a 36,5 °C por 24 horas.

No terceiro dia, após a incubação, as placas foram lidas em espectrofotômetro a 625 nm, e os percentuais de inibição foram calculados com base na Equação 16.

$$I(\%) = 100 - \frac{[(ABSa - ABSbr)]}{ABSi}$$

(16)

Onde:

I% = Percentual de inibição

ABSa = Absorbância da amostra com inóculo (após 24h de incubação)

ABSbr = Absorbância do branco da amostra

ABSi = Absorbância do inóculo

Em seguida, foi adicionado o corante resazurina a todos os poços. Após um período de incubação de 3 horas, observou-se a mudança de coloração: a presença da cor azul indicava inibição do crescimento bacteriano, enquanto a cor rosa indicava atividade metabólica. Os poços que permaneceram azuis foram considerados positivos para atividade antimicrobiana. As amostras correspondentes foram então semeadas em placas de Petri previamente preparadas com meio Ágar Mueller-Hinton e incubadas por mais 24 horas, com o objetivo de avaliar a atividade bactericida.

4.7 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* para verificar a adequação à aplicação de testes paramétricos. As variáveis quantitativas — teor de proteínas, compostos fenólicos totais (CFT) e atividades antioxidantes (DPPH e ABTS) — foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguida dos testes de Tukey e t de Student para comparação de médias, considerando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

As correlações entre o pH e as proteínas solubilizadas (PS), bem como entre os teores de CFT e as atividades antioxidantes (DPPH e ABTS), foram analisadas pelo teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$), tanto para as biomassas quanto para os isolados (IP) e hidrolisados proteicos (HP). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Statistica® versão 7.0 (StatSoft Inc., EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição centesimal das tortas residuais

As biomassas foram processadas e submetidas à análise de composição centesimal. A **Tabela 4** apresenta os resultados obtidos para a composição das tortas residuais de andiroba, murumuru e tucumã.

Tabela 4. Composição centesimal (%) das tortas residuais em base seca.

Componentes	Andiroba	Murumuru	Tucumã
Umidade	4,21 ± 0,10	6,46 ± 0,60	6,35 ± 0,60
Proteínas ⁺	10,10 ± 0,37	7,32 ± 0,17	6,80 ± 5,31
Lipídios	16,70 ± 1,55	19,05 ± 5,64	13,63 ± 0,17
Cinzas	3,92 ± 0,05	2,08 ± 2,38	2,28 ± 0,04
Carboidratos ⁺⁺	69,25	64,14	77,28

⁺ Fator de correção = 6,25; ⁺⁺ Determinado por diferença.

A análise da composição centesimal das biomassas oleaginosas andiroba, murumuru e tucumã revela diferenças nos teores de umidade, cinzas, lipídios e proteínas, aspectos fundamentais para determinar suas aplicações industriais e valor nutricional. A umidade é um fator crucial que influencia a estabilidade e o armazenamento das biomassas. Observa-se que a biomassa andiroba possui o menor teor de umidade (4,21 ± 0,10%), enquanto murumuru e tucumã apresentam valores mais elevados (6,46 ± 0,60% e 6,35 ± 0,60%, respectivamente). Teores de umidade mais baixos, como o de andiroba, são desejáveis para prolongar a vida útil e reduzir riscos de deterioração microbiana.

Em relação às cinzas, que indicam o conteúdo mineral, a biomassa andiroba apresenta o maior teor (3,92 ± 0,05%), seguida por tucumã (2,28 ± 0,04%) e murumuru (2,08 ± 2,38%). Esses valores são comparáveis aos encontrados em outras oleaginosas, como a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*), que possui teor de cinzas de aproximadamente 3,5% (Vasquez-

Rojas et al., 2021). O conteúdo mineral é relevante para avaliar o valor nutricional e possíveis aplicações industriais das biomassas.

Em relação aos lipídeos, as biomassas murumuru e andiroba destacam-se com teores de $19,05 \pm 5,64\%$ e $16,70 \pm 1,55\%$, respectivamente, enquanto tucumã apresenta $13,63 \pm 0,17\%$. Esses valores são semelhantes aos encontrados na polpa de buriti (*Mauritia flexuosa*), que possui teor lipídico significativo (Marcelino et al., 2022). Altos teores de lipídios reforçam a necessidade da etapa de desengorduramento para a realização da extração de proteínas. O alto conteúdo de lipídeos encontrados em ambas as biomassas se justifica pelo fato de serem resíduos de extração de óleo por prensagem, a quantidade de óleos presentes no tucumã, por exemplo, pode chegar até 37% (Bora et al., 2001).

Por fim, os teores de proteínas variam entre as biomassas, com andiroba apresentando o maior valor ($10,10 \pm 0,37\%$), seguida por murumuru ($7,32 \pm 0,17\%$) e tucumã ($6,80 \pm 5,31\%$). Esses valores são semelhantes ao relatado para a *Oenocarpus bacaba* (Abadio Finco et al., 2012), outra oleaginosa encontrada na Amazônia. Já para o tucumã, Bora et al. (2001), encontraram teores de 12% nas cascas e 8% na polpa, revelando que o valor encontrado na biomassa é abaixo do relatado para a cascas.

Considerando se tratar de resíduos da cadeia da extração de óleo, as biomassas apresentam frações significativas de proteínas com potencial de exploração.

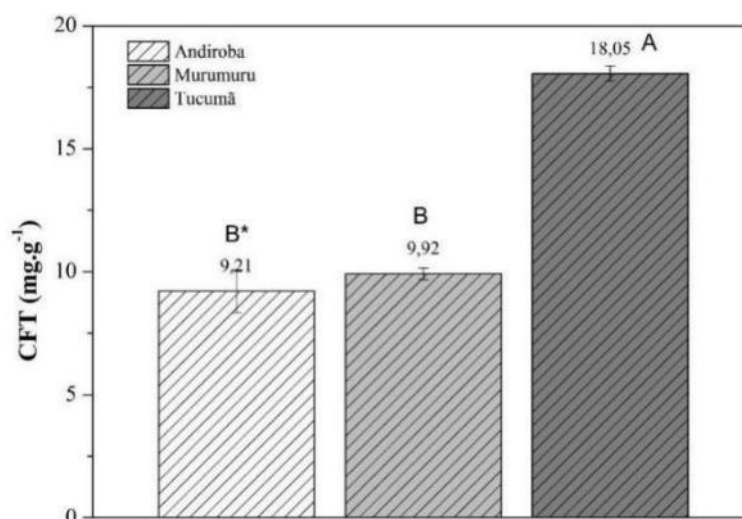
5.2. Análise de compostos fenólicos totais

Um dos focos do trabalho foi a determinação de compostos fenólicos para avaliar seu efeito nas atividades antioxidantes. Ambas as biomassas tiveram seus compostos extraídos e os resultados estão apresentados na Figura 13.

Analisando a Figura 13 é possível constatar que a biomassa de tucumã foi a que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos, diferenciando significativamente do conteúdo de fenólicos das biomassas de murumuru e andiroba, que não apresentaram diferença significativa entre si.

A diferença no teor de compostos fenólicos entre as biomassas pode estar relacionada à composição química específica de cada uma, incluindo o conteúdo de lignina e outros polifenóis estruturalmente ligados, dessa maneira, os resíduos agroindustriais apresentam variações

significativas nos teores de compostos fenólicos e na atividade antioxidante. O estudo de Melo et al (2011) avaliou o teor de compostos fenólicos totais, a atividade antioxidante e a composição fenólica de três resíduos agroindustriais brasileiros: bagaço de uva Isabel (*Vitis labrusca*), bagaço de uva verdejo (*Vitis vinifera*) e bagaço de goiaba (*Psidium guajava*). Os resultados mostraram diferenças significativas de teores fenólicos e atividade antioxidantes.



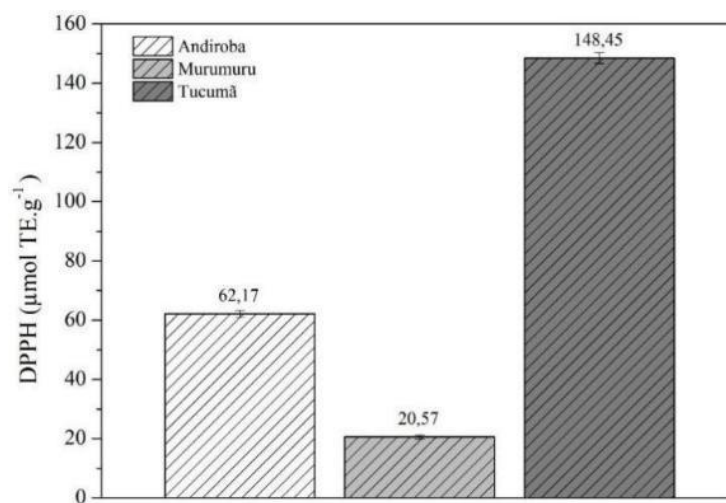
Medias com letras diferentes em uma mesma coluna indica que houve diferença significativa pelo teste *Tukey* ($p > 0,05$).

Figura 13. Análise de compostos fenólicos (CFT) para biomassas. (Fonte: A autora, 2025).

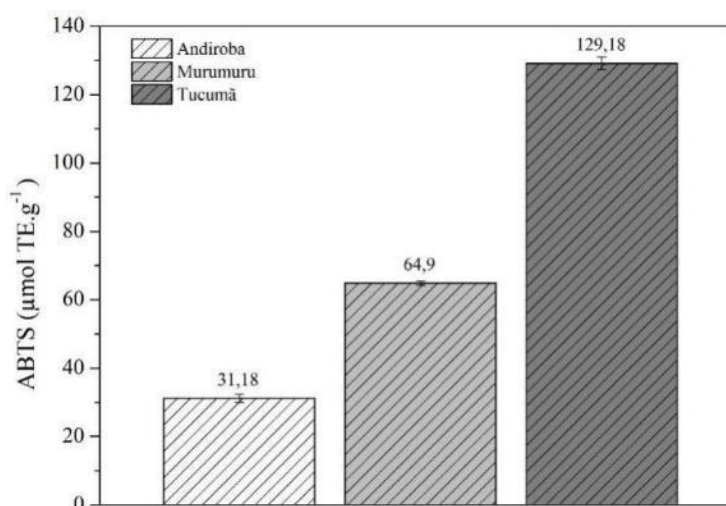
Embora não haja dados específicos disponíveis para a biomassa de tucumã, pesquisas com a realizada por VESPA et al (2018) com tucum-do-Pantanal (*Bactris setosa* Mart) indicam a presença de compostos fenólicos com potencial antioxidante. Já a biomassa de andiroba, com menor teor de compostos fenólicos, pode ter uma composição que favoreça sua degradação ao longo do processamento ou pré-tratamento da torta residual.

5.3. Análise antioxidante

Dos extratos obtidos realizou-se a prospecção ante a capacidade antioxidante por métodos *in vitro*. A Figura 14 mostra os resultados da atividade antioxidante das biomassas, avaliadas pelos métodos DPPH (Figura 14a) e ABTS (Figura 14b). Em ambos os métodos a maior atividade antioxidante foi observada para a biomassa de tucumã. A maior atividade antioxidante para a biomassa de tucumã corrobora os resultados da Figura 13, que aponta maior quantidade de compostos fenólicos para essa biomassa em relação as demais biomassas estudadas.



(a)



(b)

Figura 14. Resultados das análises de antioxidantes para biomassas. a) DPPH b) ABTS. (Fonte: A autora, 2025).

A biomassa de murumuru apresentou a menor capacidade antioxidante pelo método do DPPH, enquanto a biomassa de andiroba apresentou a menor capacidade antioxidante no método do ABTS.

Segundo Thaipong et al. (2006), a discrepância observada entre os resultados dos métodos ABTS e DPPH pode ser atribuída às diferentes sensibilidades desses ensaios a compostos específicos. O método ABTS é capaz de detectar compostos fenólicos mais polares, enquanto o DPPH apresenta maior afinidade por compostos menos polares. Estudos anteriores corroboram essas observações. Por exemplo, MELOI Et Al (2011) avaliaram a atividade antioxidante de resíduos agroindustriais e encontraram variações na eficácia dos métodos

DPPH e ABTS, sugerindo que os compostos fenólicos presentes exercem atividades antioxidantes por mecanismos distintos, dependendo da polaridade do meio reacional.

5.4. Efeito da variação das condições de extração de proteína

5.4.1. Proporção de massa da farinha e volume do extrator

Processos de extração são empregados utilizando solventes em diferentes proporções a fim de se avaliar qual o melhor volume em que o soluto apresenta a maior solubilidade, no caso específico, qual o melhor volume que a proteína apresenta maior solubilidade. A Tabela 5 apresenta os resultados da otimização da extração de proteínas das três biomassas em diferentes proporções de massa de amostra e volume de extrator (m:v).

De acordo com os resultados na Tabela 5 é possível verificar que a maior solubilidade da proteína ocorreu nas proporções m:v de 1:20, 1:25 e 1:30 apresentando de 11 a 12,91% sem diferença estatística entre elas. Para a biomassa de murumuru, a maior solubilidade foi encontrada nas proporções de 1:15, 1:30, 1:50 e 1:100, apresentando de 10,1 a 13,8% sem diferença estatística entre eles. A biomassa de tucumã apresentou maior solubilidade de proteína quando se usou as proporções m:v de 1:20, 1:50 e 1:100, variando de 20 a 21,7% de proteína solubilizada sem diferença estatística entre elas.

Considerando que foram encontradas mais de uma condição de proporção massa: volume para cada biomassa e que não havia diferença estatística entre elas, se torna vável optar pela escolha daquela proporção em que se utiliza o menor volume de extrator para que se otimize tempo e nas etapas de centrifugação.

Tabela 5. Proteína solubilizada variando a proporção de massa da farinha e volume do extrator

Proporção	Proteína solubilizada (%)		
	Andiroba	Murumuru	Tucumã
1:10	8,68 ± 0,23 ^b	6,92 ± 0,00 ^b	7,2 ± 0,50 ^c
1:15	10,50 ± 0,38 ^b	10,17 ± 0,86 ^{a,b}	9,36 ± 0,51 ^c
1:20	11 ± 0,52 ^a	8,05 ± 0,61 ^b	21,69 ± 0,89 ^a
1:25	11,83 ± 0,69 ^a	8,65 ± 0,79 ^b	20,92 ± 1,29 ^a
1:30	12,91 ± 0,81 ^a	10,30 ± 0,00 ^{a,b}	15,72 ± 0,00 ^b

1:50	$10,13 \pm 1,53^b$	$11,70 \pm 2,17^{a,b}$	$20,02 \pm 2,39^a$
1:100	$7,81 \pm 5,21^c$	$13,81 \pm 3,42^a$	$21,35 \pm 0,00^a$

Solvente utilizado: Água destilada; tempo de extração: 60 min; letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

5.4.2. Variação do tempo na extração da proteína

Os resultados da otimização da extração em função do tempo estão apresentados na Tabela 6. Assim como a proporção de volume mantém influência sobre a solubilidade da proteína a ser extraída, o tempo de contato entre o soluto e solvente é um indicativo de otimização para se obter performance no processo de extração.

A partir da Tabela 6 se observa que foram necessários 20 até 120 minutos de tempo de extração para a andiroba alcançando ~ 20% até ~ 22% de solubilidade, não apresentando diferença estatística nesse intervalo de tempo estudado.

Já para a biomassa de murumuru não foi observado diferenças significativas entre os valores de solubilidade, apresentando variação mínima de ~ 14% e máxima de ~16%.

Para o tucumã é possível observar que nos dois primeiros tempos de extração a solubilidade de proteína é mínima e que maiores valores de solubilidade são alcançados a partir de 30 minutos de extração (~ 26%), com ligeira variação para ~ 27% no tempo de 120 minutos, mas sem apresentar diferenças significativas entre eles.

Tabela 6. Resultados de conteúdo proteico conforme a variação do tempo

Andiroba		
Tempo (min)	pH	% de proteína solubilizada
10	10	$18,79 \pm 0,51b$
20	10	$19,99 \pm 0,00a$
30	10	$21,02 \pm 0,96a$
60	10	$19,32 \pm 1,67a$
120	10	$21,95 \pm 0,57a$
Murumuru		
Tempo (min)	pH	% de proteína solubilizada
10	10	$15,71 \pm 0,00 a$

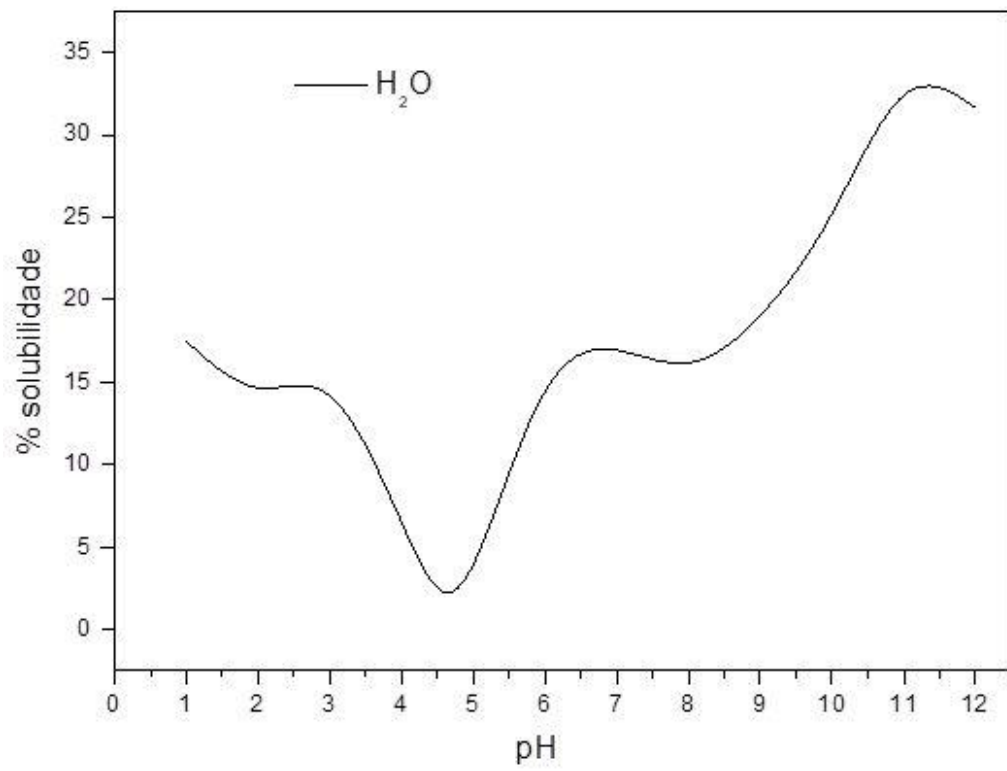
20	10	14,39 ± 0,62 a
30	10	13,70 ± 1,83 a
60	10	14,74 ± 0,62 a
120	10	14,45 ± 0,00 a
Tucumã		
Tempo (min)	pH	% de proteína solubilizada
10	8,5	15,51 ± 0,87b
20	8,5	19,95 ± 2,23b
30	8,5	25,58 ± 0,00a
60	8,5	25,54 ± 0,00a
120	8,5	26,65 ± 1,48a

Solvente utilizado: H₂O Destilada; letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

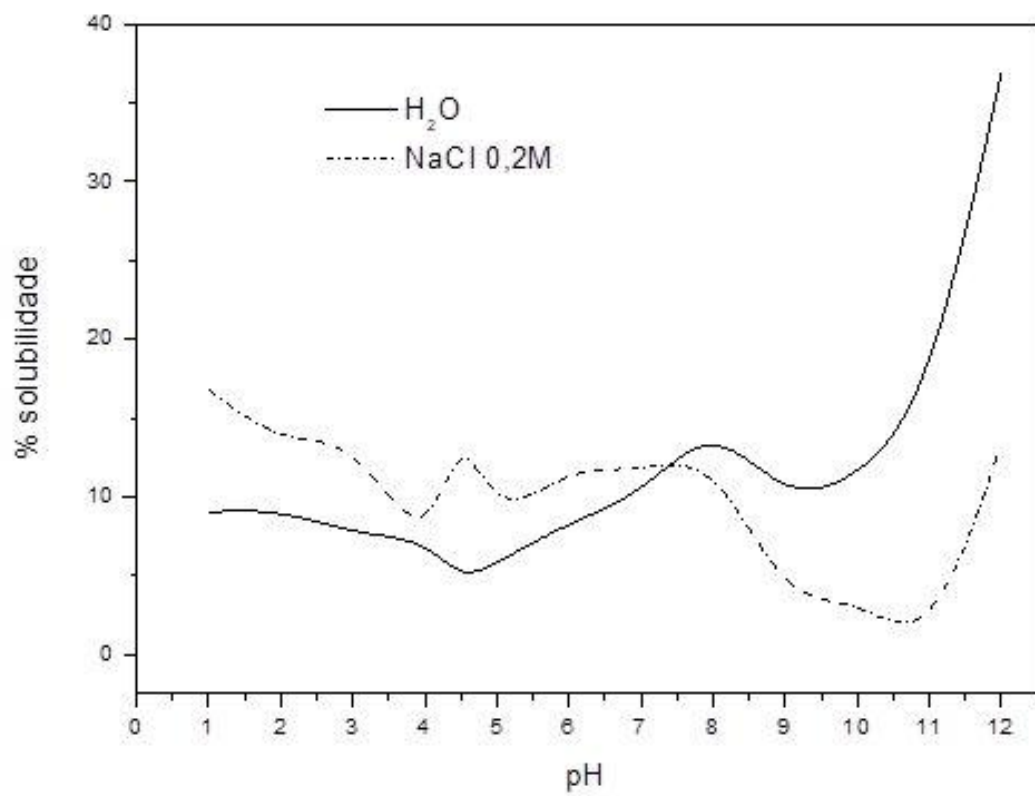
Por uma questão de padronização no laboratório, adotou-se o tempo de 60 minutos para a extração de proteína de todas as biomassas.

5.4.3. Efeito do pH na solubilidade da proteína

De posse dos valores de otimização de extração das biomassas a próxima etapa estuda o comportamento da proteína em diferentes pHs. A Figura 15 a, b e c, apresentam as curvas de solubilidade das proteínas das biomassas e andiroba (a), murumuru (b) e tucumã (c) na faixa de pH de 1 a 12.



(a)



(b)

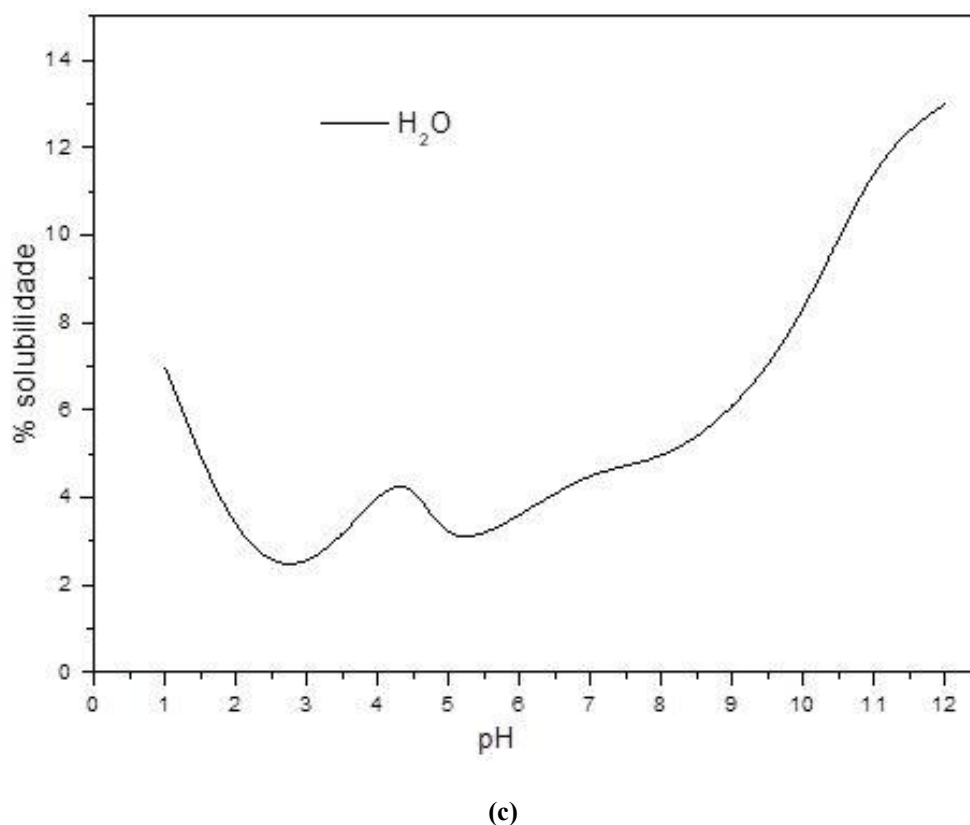


Figura 15. Curvas de solubilidade em relação ao pH, andiroba (a), murumuru (b) e (c) tucumã. (Fonte: A autora, 2025).

A curva de solubilidade para a andiroba revela um aumento de solubilidade na região alcalina (pH 11) com mais de 30% de proteína solubilizada. Esse comportamento é esperado em decorrência da presença dos grupos amino ($-\text{NH}_3^+$) e carboxílicos ($-\text{COO}^-$) nas proteínas. Tais grupos quando em meio extremamente ácidos ou básicos são ionizáveis e apresentam carga líquida positiva, no caso de pH ácidos, e carga líquida negativa, no caso de pH alcalino, causando uma repulsão eletrostática entre as moléculas proteicas e consequentemente aumentando sua solubilidade (Damodaran; Paraf, 1997; ZAYAS, 1997).

A **Figura 15 (a)** ainda mostra que em pH 4,5 ocorre a menor solubilidade da proteína, sendo esse seu ponto isoelétrico (pI), onde as cargas são nulas, com tendência de agregação e precipitação das proteínas nesse pH (Lourenço, 2000).

A curva de solubilidade para a proteína da biomassa de murumuru (Fig. 15b) acompanha um tratamento adicional, uma curva extra preparada em solução salina (NaCl 0,2 mol. L^{-1}). Observa-se que a presença do sal foi efetiva na região de menor solubilidade em água. Aumentos de solubilidade ocasionados por baixas concentrações de sal ocorrem devido a solvatação dos íons Na^+ e Cl^- com as cargas de superfície da proteína favorecendo sua

solubilidade nessas condições, esse efeito é conhecido como *salting in* (Damodaran; Paraf, 1997; Zayas, 1997). Ainda na curva de solubilidade do murumuru é possível observar que seu ponto isoeletrico ocorre em pH 4,5, sendo esse o ponto de precipitação da proteína para posteriores etapas de obtenção de concentrados proteicos.

A curva de solubilidade para a proteína da biomassa de tucumã (Fig. 15c) revela elevada solubilidade em extremos alcalino e diferentemente das demais biomassas estudadas, seu ponto isoeletrico está situado em pH 3,0.

5.4.4. Extração de proteínas

Para a obtenção da proteína concentrada a partir das biomassas de andiroba, murumuru e tucumã, variou-se as condições da extração, sendo selecionadas de acordo com os melhores resultados encontradas nas etapas de otimização de massa: volume, tempo de extração e curva de solubilidade. Os resultados de rendimento de extração e conteúdo proteico das proteínas extraídas estão apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Resultado de extração de proteína das biomassas

pH de extração	Proporção (massa: volume)	Rendimento de proteína (%)	Conteúdo proteico (%)
Andiroba			
10	1:10	4,35	21,38
11	1:10	3,29	13,47
Murumuru			
10	1:10	4,35	47,54
10	1:20	4,90	51,03
11	1:10	8,85	40,79
11	1:20	5,92	50,39
Tucumã			
10	1:10	3,73	26,13
10	1:20	3,87	26,3

11	1:10	0,94	14,20
----	------	------	-------

Um ponto importante a ser considerado no aproveitamento da fração de proteína das biomassas é sua efetividade no processo de obtenção, ou seja, adequar as condições para que se obtenha um bom rendimento de material (concentrados ou isolados proteicos) com elevada pureza (teor de proteínas) em condições que não comprometam a estrutura da proteína. Para isso, alternou-se o pH de extração e a proporção massa: volume.

A proteína da andiroba foi a que apresentou o menor teor de pureza (~ 21% de proteína), entretanto, esse valor é 2,2 vezes maior que o conteúdo de proteínas encontrado na biomassa bruta (Tabela 4). Também se observa que no pH 10 o conteúdo proteico do material obtido foi quase o dobro quando comparado ao pH de extração ajustado em 11. Isso se deve ao fato de que extremos de pH ocasionam degradação de aminoácidos por hidrólise química, degradação de cadeias laterais que contenham aminoácidos com grupamento amino, desprotonando suas cadeias, afetando sua interação com outras frações da proteína e ocasionando, inclusive, sua perda de função (Damodaran; Paraf, 1997).

Esse mesmo comportamento foi observado para as demais biomassas, quando se elevou o pH de extração para 11, o conteúdo proteico foi reduzido quando comparado com o pH 10.

A extração de proteína da biomassa do murumuru foi a que apresentou maior pureza (51% de conteúdo proteico) quando obtida em pH 10, na proporção massa: volume 1:20, resultando em uma concentração de quase 7,5 vezes em relação ao seu conteúdo de proteína presente na biomassa bruta (Tabela 4).

O processo de extração de proteínas por solubilização alcalina e precipitação isoelétrica também concentrou a proteína presente na biomassa de tucumã, que apresentou ~ 26% de proteína, número 4,2 vezes maior que o teor inicial de proteína encontrado na biomassa bruta.

A eficiência da extração proteica de biomassas oleaginosas é significativamente influenciada pelo pH do meio de extração. Estudos demonstram que a elevação do pH alcalino pode aumentar o rendimento da extração de proteínas. Por exemplo, na extração de proteínas de grãos de cervejaria, observou-se que a elevação do pH de 8 para 12 resultou em um aumento do rendimento de 20,8% para 46,2%, respectivamente. Esse incremento é atribuído à maior solubilização das proteínas em condições mais alcalinas, devido à ionização dos grupos funcionais das moléculas proteicas, facilitando sua extração (Hadinoto et al., 2024).

No entanto é importante considerar que pHs excessivamente elevados podem induzir modificações estruturais nas proteínas que podem afetar suas propriedades funcionais. Além disso, na extração de proteínas de ervilha amarela realizada por Gao et al., (2020) verificou-se que o aumento do pH de extração de 8,5 para 9,5 elevou o rendimento de 49,20% para 57,56%. Entretanto, pHs mais altos também promoveram a formação de agregados proteicos, reduzindo a solubilidade das proteínas extraídas.

Dessa forma, a seleção do pH de extração deve equilibrar o aumento do rendimento com a manutenção das propriedades funcionais desejadas das proteínas, considerando a manutenção da estrutura da proteína e a disponibilidade de equipamentos no laboratório, se padronizou para a obtenção das proteínas concentradas, pH de extração ajustado em 10 e proporção massa: volume de 1:10 em 60 minutos de agitação com precipitação isoelétrica ajustada em pH 3,0 para a biomassa de tucumã e em pH 4,5 para as demais biomassas (andiroba e murumuru), seguido de filtração e liofilização.

A partir das proteínas concentradas foram realizadas hidrólises com as enzimas alcalase e tripsina, conforme descritos no item 4.5.1 e 4.5.2 respectivamente.

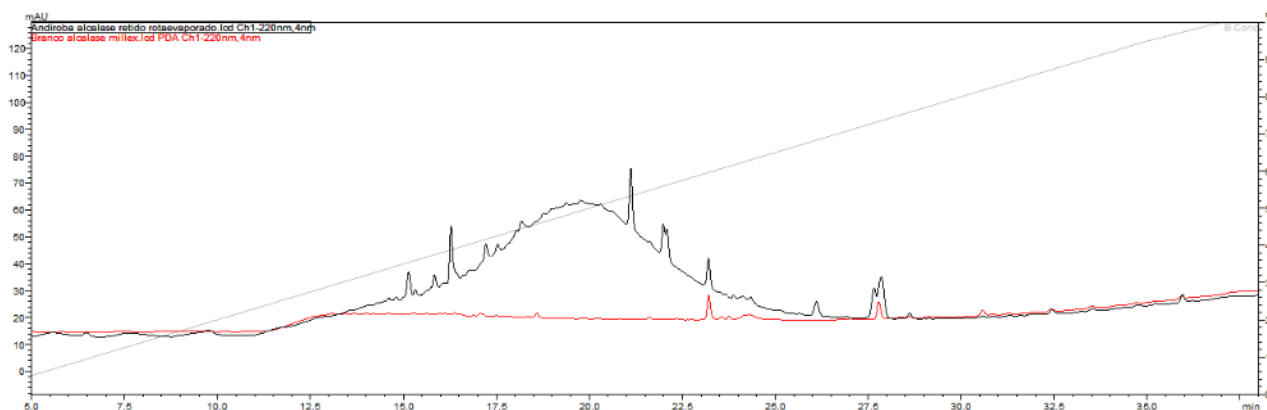
5.5. Caracterização dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As condições de corrida ocorreram conforme descritas no item 4.5.3. A Figura 16 apresenta a cromatografia dos hidrolisados proteicos digeridos com a enzima alcalase. É possível observar que para cada biomassa houve um perfil característico de liberação de peptídeos. O hidrolisado de andiroba apresentou um perfil de picos saindo do morro característico principal. É possível se observar a presença de 3 picos nos tempos de retenção (TR) de 15 a 16,5 minutos, seguidos por picos de baixo sinal na região ascendente do morro. Na região descendente do morro se observa a presença de dois picos bem definidos, um no TR de 21 minutos e outro no TR de 22 minutos. Um outro pico foi observado em região mais apolar, com aproximadamente 70% de fase B, no TR de 26 a 26,5 minutos.

O hidrolisado proteico de murumuru, assim como o de tucumã, também apresentou um morro característico na primeira metade do gradiente, demonstrando se tratar de moléculas orgânicas de baixa polaridade. Quando comparado com o branco observa-se que na parte

ascendente do morro aparecem 4 conglomerados de picos, um conglomerado aparece no TR de 14,5 a 15,5 minutos, o segundo aparece no TR de 15,5 a 17 minutos, o terceiro e mais intenso conglomerado aparece no TR de 17 a 17,5 minutos, no cume do morro se tem um quarto conglomerado com 4 picos, nos TR de 18 a 19,5 minutos. Ainda é possível observar a presença de 3 picos de baixa intensidade já na parte descendente do morro, nos TR de 20,5 minutos, 21 a 21,5 minutos e 22 minutos. Já em uma região mais apolar é possível observar picos nos TR de 26,5 minutos e no TR de 28-28,5 minutos.

O hidrolisado proteico de tucumã foi o que apresentou mais picos na fase apolar do gradiente. Também se observa a presença de um morro característico de uma molécula orgânica com a presença de picos na parte ascendente do morro (mais polar) e picos na parte descendente do morro (mais apolar). Diferente das outras oleaginosas, o tucumã apresenta um pico logo no início do gradiente, no TR de 9,5 minutos, na parte ascendente do morro o primeiro pico é observado no TR de 15 minutos seguido de picos menores nos TRs de 15,5; 16,5; 17,5 e 18 minutos. Na parte descendente do morro o único pico observado corresponde a uma fração presente na enzima e não na amostra. Entretanto, é possível observar a presença de picos na região mais apolar, especificamente nos TR de 32; 32,5; 33-34; 35 e 36 minutos.



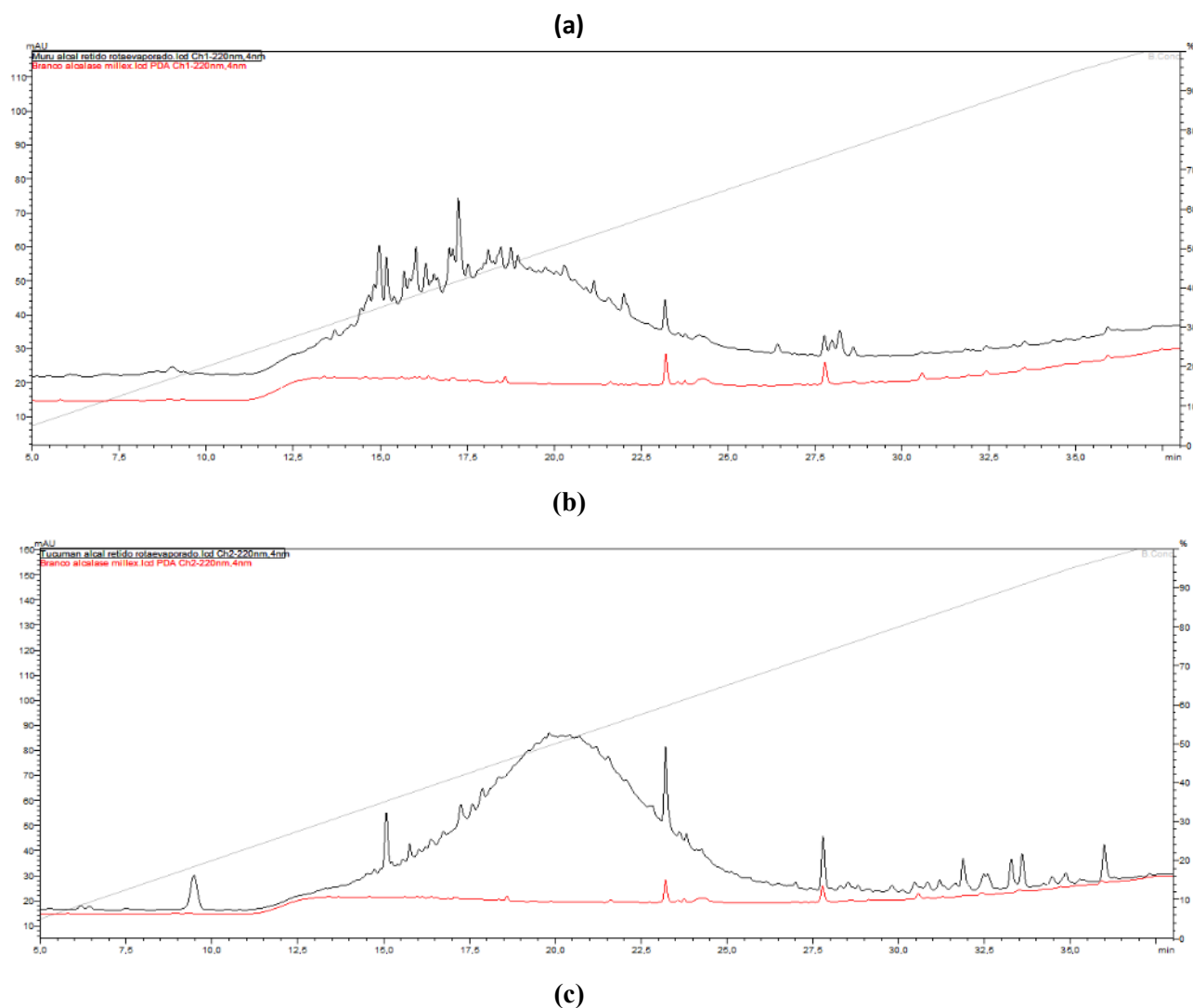


Figura 16. Cromatogramas dos hidrolisados com Alcalase em comparação com o branco da enzima (a) andiroba alkalase (b) murumuru alkalase (c) tucumã alkalase. A linha vermelha corresponde ao branco de enzima. (Fonte: A autora, 2025).

Na Figura 17 se encontram os cromatogramas dos hidrolisados proteicos digeridos com tripsina. Assim como observado para os hidrolisados digeridos com a enzima alcalase, nos cromatogramas digeridos com tripsina também há um morro característico da molécula orgânica que sai no TR de 15-24 minutos. Para a andiroba é possível notar a presença de picos na parte ascendente do morro nos TR de 15, 16, 17 e 17,5 minutos, na parte descendente do

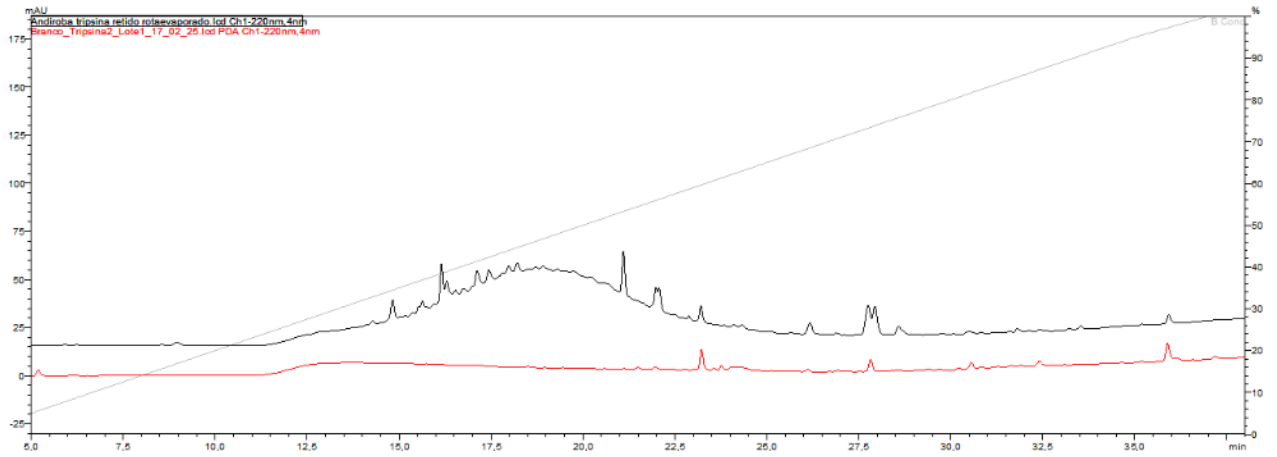
morro (mais apolar) há a presença de 2 picos nos TR de 21 e 22 minutos, seguido de um último pico de baixa intensidade no TR de 32,5.

Para o hidrolisado proteico digerido com a enzima tripsina (Fig. 17b), é possível se observar a presença de picos na região mais apolar do gradiente, um pico no TR de 29 minutos e no TR de 33 a 33,5.

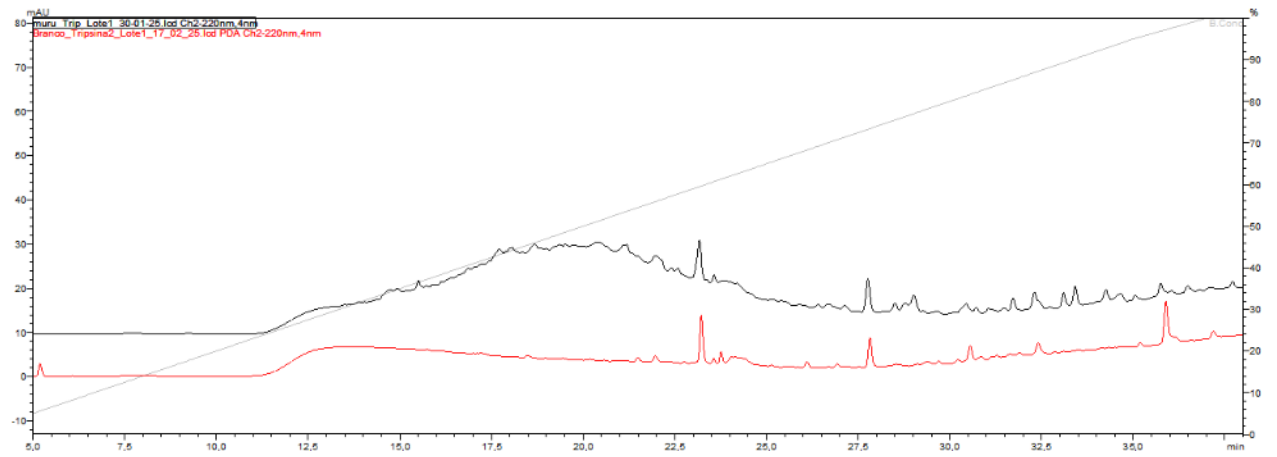
Já para o hidrolisado de tucumã digerido com tripsina (Fig. 17c), é possível encontrar picos na região mais apolar do gradiente, nos TR de 28,5 minutos, 33,5 e 34,5 minutos, sendo esse perfil e de menor presença de picos de todos os hidrolisados obtidos no estudo.

Os hidrolisados apresentaram diferenças de picos em relação as enzimas utilizadas para hidrólise, isso se deve a diferentes frações peptídicas produzidas pelas enzimas. No estudo conduzido por Girgih; Udenigwe; Aluko, (2013), foram produzidos hidrolisados de proteína de semente de cânhamo (HPH) por meio de digestão simulada do trato gastrointestinal e separação hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa em oito frações peptídicas utilizando. As frações peptídicas obtidas apresentaram tempos de retenção crescentes, indicando uma correlação com o aumento do conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos, especialmente prolina, leucina e isoleucina. As frações com tempos de retenção mais longos exibiram maior capacidade antioxidante, sugerindo que a atividade antioxidante está relacionada à composição de aminoácidos hidrofóbicos nas frações peptídicas.

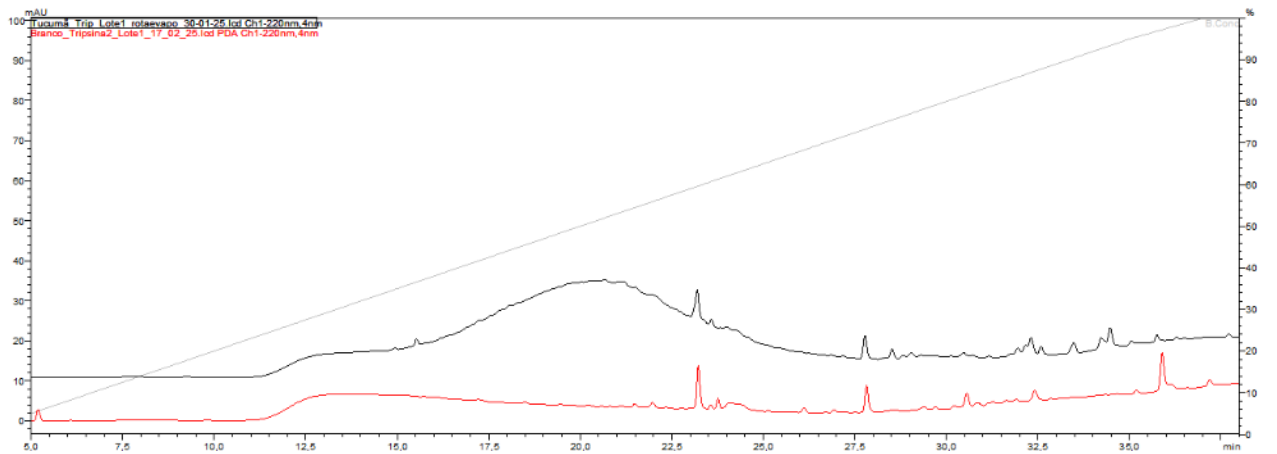
Zhou et al., (2017) desenvolveram uma estratégia para purificar e quantificar o inibidor de tripsina de Kunitz (KTI) em soja utilizando cromatografia líquida bidimensional. Embora o estudo não forneça detalhes específicos sobre os tempos de retenção das frações peptídicas, a metodologia empregada permitiu a obtenção do inibidor com massa molecular de 20 kDa e pureza de aproximadamente 98%, demonstrando a eficácia do método de separação.



(a)



(b)



(c)

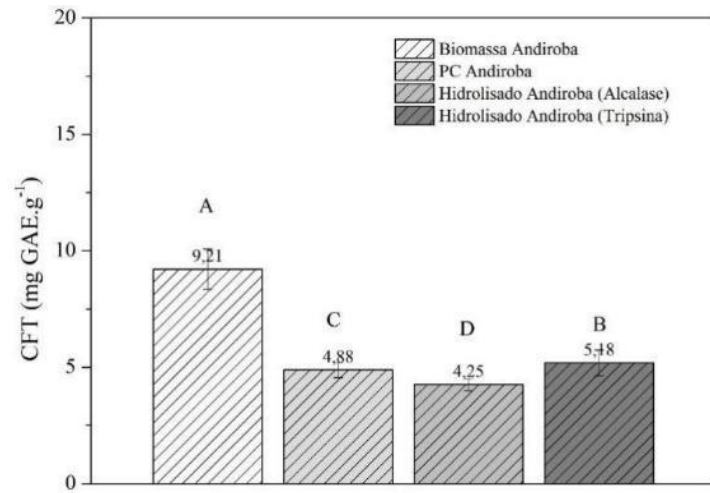
Figura 17. Cromatogramas dos hidrolisados de tripsina. (a) Andiroba Tripsina (b)Muru Tripsina (c)Tucumã Tripsina. A linha vermelha corresponde ao branco de enzima. (Fonte: A autora, 2025).

Já Darmawan; Bringe; De Mejia, (2010), realizaram um estudo com objetivo foi comparar a capacidade antioxidante de hidrolisados de proteína de soja produzidos com alcalase a partir de nove cultivares de soja, incluindo dois convencionais e sete com baixo teor de glicinina. Embora o estudo não detalhe os tempos de retenção específicos das frações peptídicas, os hidrolisados das cultivares ricas em β -conglucina apresentaram maior capacidade antioxidante. Isso sugere que a composição proteica das cultivares influencia a atividade antioxidante dos hidrolisados.

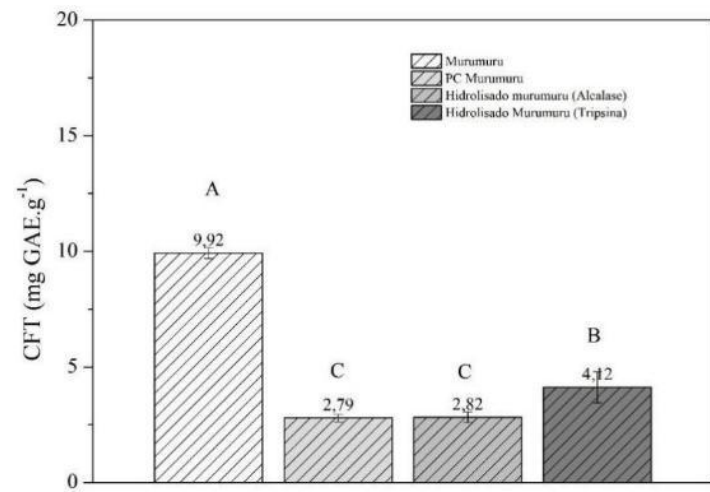
5.6. Funcionalidades das proteínas concentradas (PC) extraídas das biomassas, dos hidrolisados proteicos e das biomassas

5.6.1. Análise de compostos fenólicos totais

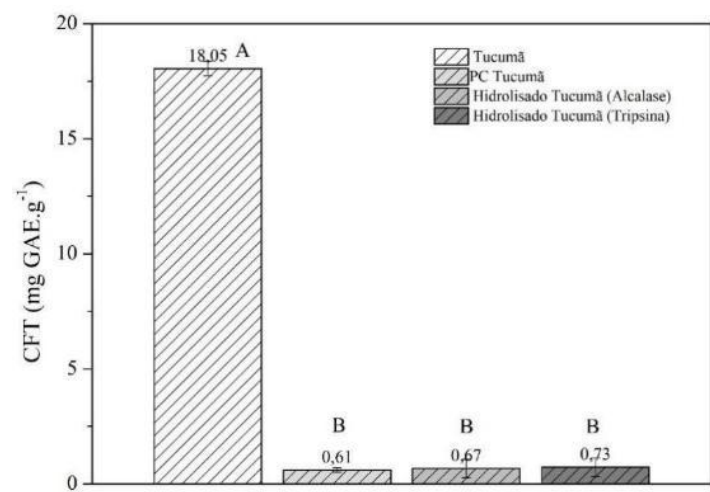
Na Figura 18 é apresentado os resultados da análise de compostos fenólicos das biomassas, proteínas concentradas e hidrolisados proteicos. A análise dos teores de compostos fenólicos revelou que a biomassa *in natura* apresenta a maior concentração desses compostos quando comparada às frações proteicas concentradas e aos hidrolisados, isso porque muitos compostos fenólicos estão ligados à matriz lignocelulósica da biomassa e podem ser perdidos durante as etapas de extração e precipitação de proteínas. A lignina, um componente importante da biomassa, contém macromoléculas fenólicas de alto peso molecular, que contribuem significativamente para o conteúdo fenólico na biomassa natural (Okonkwo et al., 2023). Além disso, a hidrólise enzimática pode resultar na degradação de alguns compostos fenólicos ou na sua solubilização diferencial, alterando sua biodisponibilidade e concentração final nas amostras.



(a)



(b)



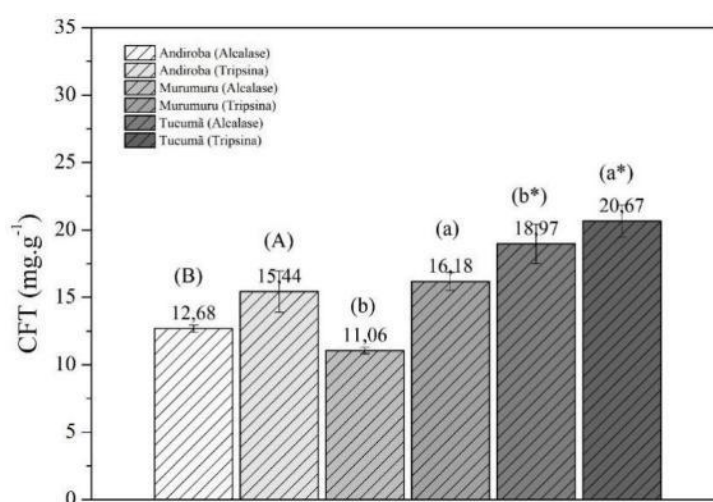
(c)

Figura 18. Compostos fenólicos para Biomassas, Proteínas concentradas e hidrolisados (a) Andiroba (b) Murumuru e (c) Tucumã. (Fonte: A autora, 2025).

A perda de fenólicos nos hidrolisados também está relacionada à especificidade da enzima utilizada. A hidrólise com alcalase levou a menores teores de fenólicos nos hidrolisados de Andiroba e Muru, indicando que a especificidade da Alcalase na clivagem de peptídeos contribui para a geração de peptídeos de baixo peso molecular, que geralmente estão associados a maior retenção fenólica. Por exemplo, em hidrolisados de proteína de lentilha, a hidrólise sequencial com Alcalase e Flavourzyme resultou em aumento de compostos fenólicos e aumento da atividade antioxidante (Rezvankhah et al., 2021).

5.6.2. Análise estatística dos compostos fenólicos presentes nos hidrolisados comparados estatisticamente por seus pares pelo teste *t-student*

A análise de compostos fenólicos também foi estatisticamente interpretada nas diferentes condições de hidrólise da mesma biomassa. Na Figura 19, na qual estão os resultados dessa análise, é possível verificar que entre os dois tipos de hidrolisados de cada amostra tiveram diferenças significativas dos teores de compostos fenólicos totais. As diferenças no teor de compostos fenólicos em hidrolisados obtidos com alcalase e tripsina podem ser atribuídas a vários fatores, incluindo a especificidade enzimática, a composição do substrato e as condições de hidrólise.



Medias com letras diferentes em uma mesma coluna indica que houve diferença significativa pelo teste *t-student* ($p > 0,05$).

Figura 19. Compostos fenólicos totais presentes nos hidrolisados proteicos de andiroba, murumuru e tucumã.
(Fonte: A autora, 2025).

Além da enzima utilizada na hidrólise, a composição do substrato influencia diretamente o teor de fenólicos nos hidrolisados. A estrutura e a composição das proteínas e outros componentes presentes no material de partida determinam como as enzimas interagem e liberam compostos fenólicos, como exemplo tem-se a hidrólise enzimática de farelo de arroz com uma combinação de fermentação e hidrólise enzimática complexa aumentou significativamente o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante (Liu et al., 2017).

5.6.3. Atividade antioxidante

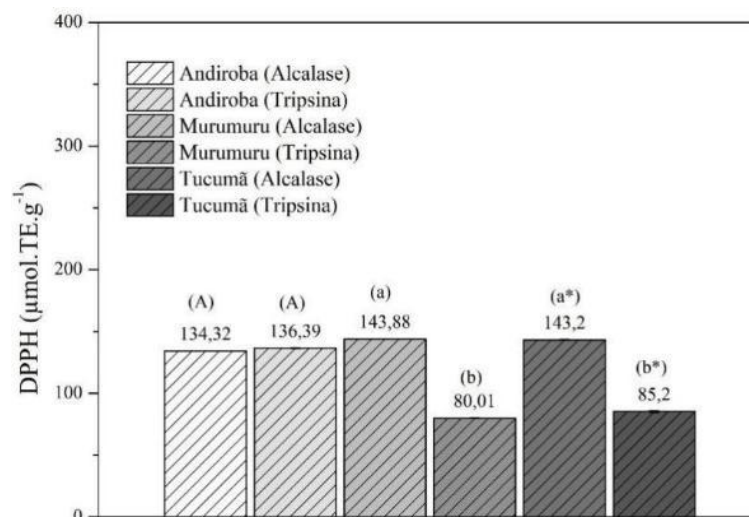
A Figura 20 ilustra o resultado da análise antioxidante dos hidrolisados proteicos das biomassas de Andiroba, Murumuru e Tucumã, utilizando os métodos ABTS e DPPH. o resultado do teste *T-Student*, evidenciando diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos utilizando as enzimas alcalase e tripsina nos diferentes hidrolisados.

O teste revelou que as médias dos tratamentos variaram de forma significativa entre essas duas enzimas, indicando que o efeito das enzimas sobre o parâmetro estudado (a atividade antioxidante) não é uniforme. Nas duas análises, os hidrolisados de tucumã foram os que tiveram maiores valores de atividade antioxidante. Além disso, tanto para DPPH quanto para ABTS, os hidrolisados de Alcalase tiveram maiores valores na maioria das amostras.

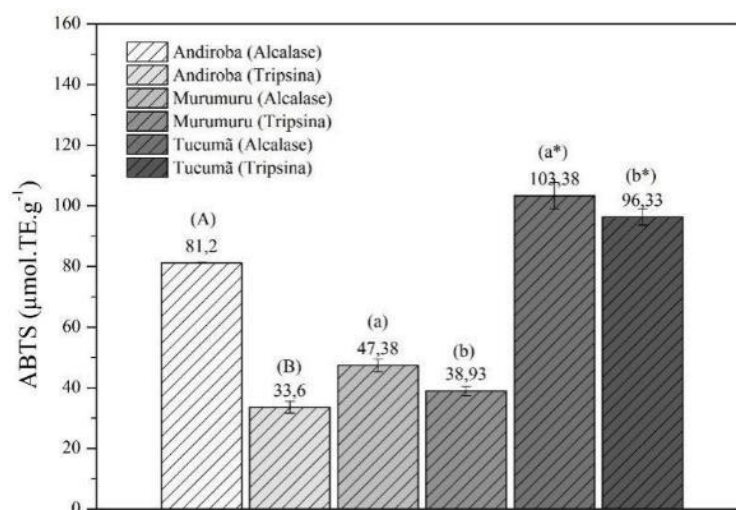
A análise estatística confirma que as diferenças observadas nas médias dos grupos não são devidas ao acaso, sugerindo que a escolha da enzima tem um impacto considerável nos resultados do tratamento, porém, para os peptídeos obtidos da andiroba, não houve diferença significativa. Esses resultados destacam a importância de considerar a enzima utilizada como um fator crítico na otimização dos processos.

A influência das enzimas na hidrólise dos isolados proteicos das biomassas de Andiroba, murumuru e Tucumã se deve às diferenças na especificidade e mecanismos de ação das enzimas utilizadas. Cada enzima tem uma preferência particular por certos sítios de clivagem nas cadeias polipeptídicas, o que resulta em variações na eficiência de hidrólise e na liberação de peptídeos bioativos com propriedades antioxidantes (López-Salas et al., 2024). A composição de aminoácidos das proteínas de cada biomassa também desempenha um papel crucial, pois determina quais peptídeos serão liberados durante a hidrólise e sua atividade antioxidante subsequente.

A análise dos hidrolisados proteicos das biomassas de Andiroba, Murumuru e Tucumã, utilizando os métodos ABTS e DPPH, revela o potencial de geração de frações com elevada capacidade antioxidante. Para explorar completamente esse potencial, houve foco na separação dos picos obtidos na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e realização testes antioxidantes dos hidrolisados obtidos nas condições otimizadas.



(a)



(b)

Medias com letras iguais em uma mesma coluna indica que não houve diferença significativa

Figura 20. Comparação de médias para a atividade antioxidante dos hidrolisados por DPPH (a) e ABTS (b).

(Fonte: A autora, 2025).

Os resultados obtidos neste estudo reforçam o potencial antioxidante de hidrolisados proteicos de sementes oleaginosas amazônicas, como observado nas amostras obtidas no

tucumã com Alcalase, que apresentaram significativa atividade antioxidante nos ensaios com DPPH e ABTS. Esses achados estão em consonância com os resultados reportados por (Mazloomi et al., 2019), como no estudo conduzido com hidrolisados de sementes medicinais de abóbora (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*), em que peptídeos obtidos por hidrólise com pepsina alcançaram capacidade de eliminação de radicais DPPH de 82,07%, atribuída à elevada presença de aminoácidos hidrofóbicos (39,85% do total).

5.6.4. Análise de atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio de leituras de absorbância e pelo teste com resazurina, utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). A Figura 21 mostra as amostras que apresentaram inibição do crescimento bacteriano. Observa-se que os poços correspondentes à concentração de 2,5 mg. mL⁻¹ exibem coloração azul, indicando ausência de metabolismo bacteriano e, portanto, efeito inibitório nessa concentração.

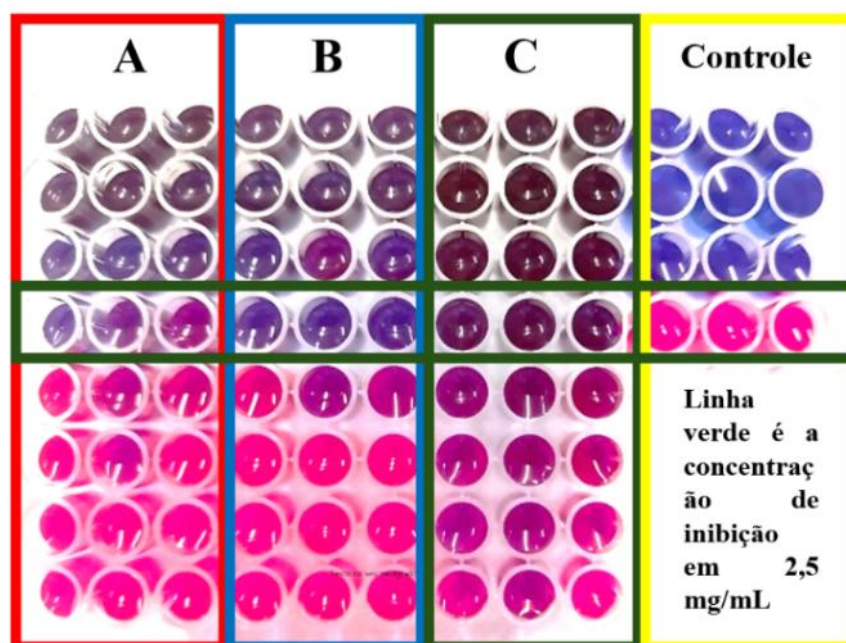


Figura 21. Resultados de teste de inibição de crescimento bacteriano com corante resazurina. A) Hidrolisado de Murumuru com Alcalase. B) Hidrolisado de Murumuru com Tripsina. C) Hidrolisado de Tucumã com Alcalase. (Fonte: A autora, 2025).

As amostras também foram testadas para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, porém não obtiveram resultados positivos em nenhuma das duas metodologias empregadas.

Pode-se explicar a resistência das bactérias Gram-negativas a alguns compostos naturais devido à sua complexa composição de sua membrana celular, que possui um alto nível de lipídios e lipopolissacarídeos em sua membrana externa, criando assim uma camada adicional que impede a passagem de agentes antimicrobianos, tal característica é responsável pelo mecanismo de resistência da *E. coli*, tornando-a menos suscetível a certos compostos bioativos (Vargas et al., 2004).

Os resultados do teste de atividade bactericida assim como o resultado da leitura do espectrofotômetro dos testes realizados para a *Staphylococcus aureus* estão na Tabela 8.

A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo. A classificação da eficácia antimicrobiana em categorias como fraca, moderada ou forte está diretamente relacionada à CIM: concentrações mais baixas indicam maior potência do fármaco. Nesse caso, os resultados dos hidrolisados de Andiroba Alcalase e Tucumã Tripsina apresentaram inibição moderada pois tiveram a CIM na concentração de 0,16 mg. mL⁻¹, com 85,5% e 73,75% de inibição, respectivamente. Os outros hidrolisados não são considerados como tendo atividade antimicrobiana pois apresentaram inibição somente a partir de uma concentração de 2,5 mg. mL⁻¹.

Tabela 8. Resultados de atividade inibitória e bactericida para *Staphylococcus aureus*.

Hidrolisado	concentração inibitória mínima (mg/ mL)	Inibição (%) **	Atividade bactericida
Andiroba Alcalase	0,16	85,5	Não
Andiroba Tripsina	2,5	71,35	Não
Muru Alcalase	2,5	92,78	Não
Muru Tripsina	2,5	92,68	Não
Tucumã Alcalase	2,5	87,29	Não
Tucumã Tripsina	0,16	73,75	Não

**Resultado da análise por espectrofotometria na concentração inibitória mínima

Zhao et al., (2022), realizaram um estudo que investigou um peptídeo antimicrobiano, MOp2, isolado de hidrolisados proteicos das sementes de *Moringa oleifera*. O peptídeo apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 2,204 mM, sem efeitos hemolíticos significativos. Além disso, demonstrou estabilidade térmica e resistência a altas concentrações de sal, embora tenha sido degradado por proteases. Testes indicaram que o MOp2 danifica irreversivelmente a membrana bacteriana, aumentando sua permeabilidade e promovendo a liberação de nucleotídeos intracelulares. O estudo destacou potencial do MOp2 como agente antimicrobiano natural para controle de *S. aureus* em alimentos.

5.7. Correlação de *Pearson* entre os compostos bioativos e a ação inibitória da bactéria

A correlação de *Pearson*, ou coeficiente de correlação de *Pearson* (r), é uma medida estatística amplamente utilizada para quantificar a força e a direção da relação linear entre duas variáveis quantitativas. Seu valor varia de -1 a 1, onde valores próximos a -1 indicam uma correlação negativa forte, valores próximos a 1 indicam uma correlação positiva forte e valores próximos a 0 sugerem ausência de correlação linear (Schober; Boer; Schwarte, 2018). Na Figura 22, tem-se os gráficos de resultados de correlação entre os resultados de antioxidantes e atividade antimicrobiana e teor de fenólicos com o resultado de inibição.

A análise de correlação de *Pearson* entre o teor de compostos fenólicos totais (CFT) e a inibição microbiana (Figura 22a) resultou em um coeficiente de correlação $r = -0,4613$, indicando uma relação negativa baixa. Esse valor sugere que, à medida que o teor de CFT aumenta, a atividade antimicrobiana tende a diminuir, embora essa relação não seja considerada forte. Por outro lado, as correlações entre a atividade antioxidante, medidas pelos métodos DPPH e ABTS (Figuras 22b e 21c), e a inibição microbiana foram praticamente inexistentes, com coeficientes $r = 0,00117$ e $r = 0,0064$, respectivamente. Tais resultados indicam que a capacidade antioxidante dos hidrolisados, isoladamente, não está relacionada de forma significativa com sua ação antimicrobiana.

A correlação entre o teor de proteína total e a porcentagem de inibição (Figura 22d) apresentou um coeficiente de $r = 0,59$, refletindo uma relação positiva de intensidade moderada.

Isso sugere que a atividade antimicrobiana está mais associada à presença de proteínas e, especialmente, aos peptídeos gerados durante o processo de hidrólise. Esses peptídeos bioativos, liberados pelas enzimas durante a quebra das proteínas, podem atuar diretamente sobre a membrana das bactérias ou interferir em seus processos metabólicos, conferindo-lhes ação antimicrobiana.

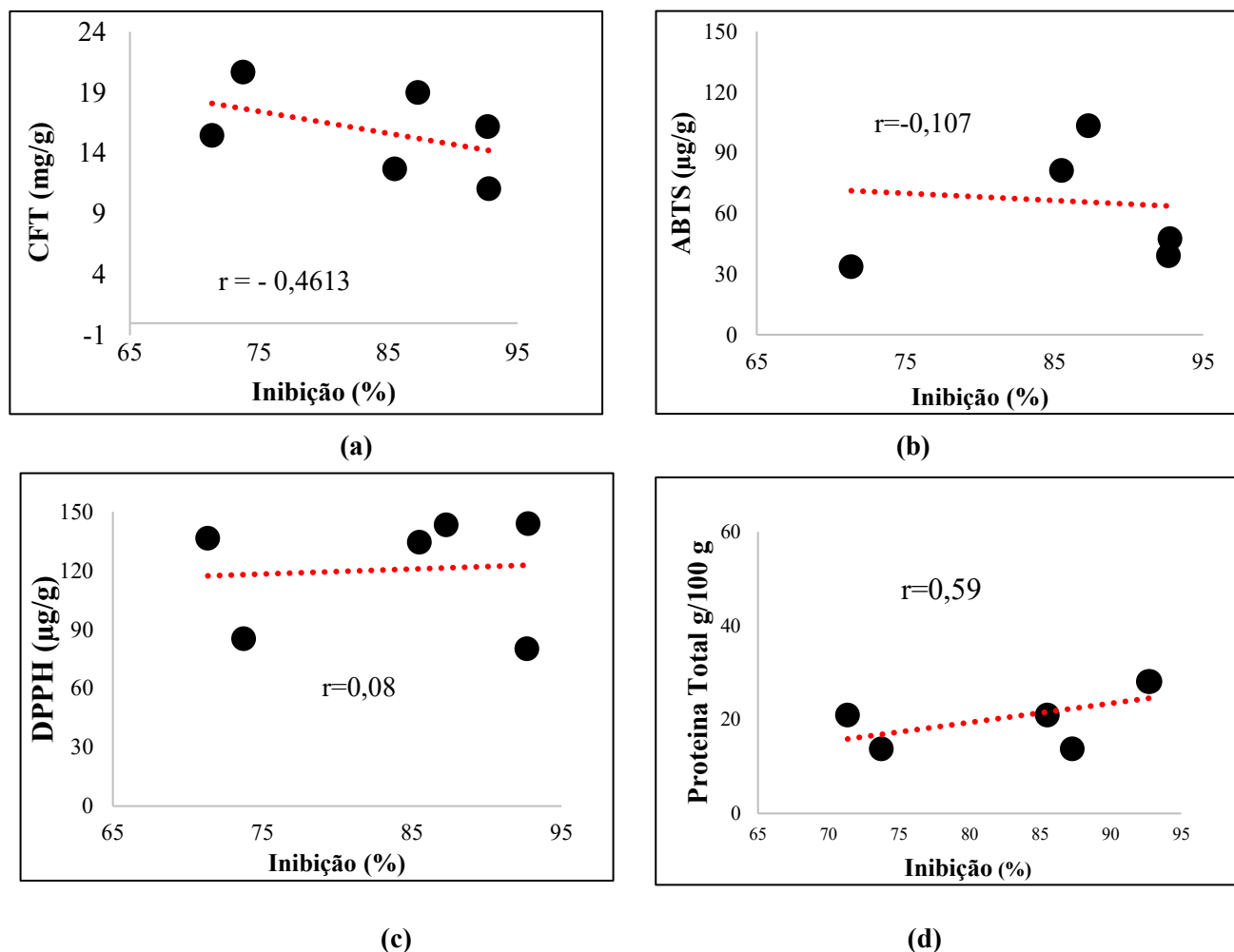


Figura 22. Correlação de Pearson entre teor de compostos fenólicos totais e inibição microbiana. (Fonte: A autora, 2025).

Assim, os dados apontam que o efeito antimicrobiano observado está mais relacionado à composição peptídica dos hidrolisados do que ao conteúdo fenólico ou à atividade antioxidante em si. Com esse resultado é possível verificar, estatisticamente, que a atividade

antimicrobiana dos hidrolisados tem maior tendência a ser relacionado com os peptídeos liberados pelos processos de hidrólise.

6. CONCLUSÃO

A valorização de resíduos tem se estabelecido como uma abordagem crucial para promover a sustentabilidade e aumentar o valor das cadeias produtivas locais, especialmente na Amazônia. Nesse cenário, as biomassas resultantes da extração de óleos vegetais de sementes como murumuru, andiroba e tucumã oferecem um grande potencial para a obtenção de biomoléculas de valor biotecnológico, em particular os peptídeos bioativos.

Foi possível obter hidrolisados proteicos usando enzimas utilizadas na biotecnologia para obtenção de peptídeos, sendo o hidrolisado proteico digerido com alcalase o que apresentou maior atividade antioxidante em ambos os métodos.

A extração de compostos fenólicos por química verde encontrou elevadas quantidades na biomassa de tucumã apresentando, inclusive, maior atividade antioxidante em ambos os métodos estudados. Hidrolisados proteicos de andiroba digeridos com enzima alcalase foram os mais eficazes na inibição de *S. aureus* usando a menor concentração estudada.

Portanto, conclui-se que a utilização das tortas residuais de oleaginosas da Amazônia para a extração de peptídeos bioativos e compostos fenólicos é uma estratégia viável, sustentável e com um alto valor científico e tecnológico. Além disso, recomenda-se um aprofundamento em técnicas analíticas como espectrometria de massas e a separação de frações peptídicas por cromatografia líquida de alta eficiência, assim como a realização de testes *in vitro* e *in vivo* para esclarecer os mecanismos de ação dos peptídeos obtidos e elucidar o mecanismo de ação de sua bioatividade.

7. REFERÊNCIAS

- ABADIO FINCO, F. D. B. et al. Antioxidant Activity and Characterization of Phenolic Compounds from Bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) Fruit by HPLC-DAD-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 31, p. 7665–7673, 8 ago. 2012.
- ABEDINI, A. et al. Oilseed Cakes in the Food Industry; A Review on Applications, Challenges, and Future Perspectives. **Current Nutrition & Food Science**, v. 18, n. 4, p. 345–362, maio 2022.
- ADLER-NISSEN, J. Enzymatic Hydrolysis of Proteins for Increased Solubility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, p. 1090–1093, 1976.
- AGRAWAL, H.; JOSHI, R.; GUPTA, M. Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 204, p. 365–372, ago. 2016.
- AJAYI, F. F. et al. Novel Plant-Protein (Quinoa) Derived Bioactive Peptides with Potential Anti-Hypercholesterolemic Activities: Identification, Characterization and Molecular Docking of Bioactive Peptides. **Foods**, v. 12, n. 6, p. 1327, 20 mar. 2023.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 6. ed. [s.l.] Artmed Editora, 2017.
- ALUKO, R. E. Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. Em: **Proteins in Food Processing**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 389–412.
- ALVES, K. L. DA M. **Desenvolvimento e avaliação de estabilidade preliminar de emulsões cosméticas utilizando nanopartículas lipídicas sólidas de muru muru (*Astrocaryum murumuru*) e ucuúba (*Virola surinamensis*)**. Trabalho de conclusão de Curso—[s.l.] Universidade de Brasília, 2018.
- AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17. ed. Gaithersburg, Maryland: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2000. v. 2
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Em: **Van Nostrand's Encyclopedia of Chemistry**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2005.

- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, jan. 2006.
- BARBOSA, B. S. et al. Aproveitamento do Óleo das Amêndoas de Tucumã do Amazonas na Produção de Biodiesel. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 371–376, 2009.
- BARBOSA, M. DE O. et al. Bioeconomia: Um novo caminho para a sustentabilidade na Amazônia? **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e41101018545, 5 ago. 2021.
- BÁRTA, J. et al. Oilseed Cake Flour Composition, Functional Properties and Antioxidant Potential as Effects of Sieving and Species Differences. **Foods**, v. 10, n. 11, p. 2766, 11 nov. 2021.
- BAYRAM, T. et al. Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment. **Talanta**, v. 75, n. 3, p. 705–709, 15 maio 2008.
- BERG, J. M. et al. **Bioquímica**. 1. ed. [s.l: s.n.]. v. 1
- BESSEN, G. R.; GRANDISOLI, E. **Temas atuais em Mudanças Climáticas**. 1. ed. [s.l: s.n.]. v. 1
- BETORET, E. et al. Functional foods development: Trends and technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 9, p. 498–508, set. 2011.
- BEZERRA, V. S. Considerações Sobre a Palmeira Murumuruzeiro (*Astrocaryum murumuru* Mart.). **Comunicado Técnico Embrapa**, 2012.
- BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, ago. 1999.
- BILDANOVA, L. L.; SALINA, E. A.; SHUMNY, V. K. Main properties and evolutionary features of antifreeze proteins. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, v. 3, n. 1, p. 66–82, 17 jan. 2013.
- BORA, P. S. Et Al. Characterisation Of The Oil And Protein Fractions Of Tucuma (*Astrocaryum Vulgare* Mart.) Fruit Pulp And Seed Kernel Caracterización De Las Fracciones Protéicas Y Lipídicas De Pulpa Y Semillas De Tucuma (*Astrocaryum Vulgare* Mart.) Caracterización Das Fracções Protéicas E Lipídicas Da Pulpa E Semillas De

Tucuma (*Astrocaryum Vulgare* Mart.). **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, v. 3, n. 2, p. 111–116, jul. 2001.

BOSSA, G. V. **Determinação do grau de ionização de aminoácidos polares carregados**. Dissertação de mestrado— São José do Rio Preto, SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2013.

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, 1 jan. 1995.

CASTRO, A. C. C. M. et al. Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. **Food Chemistry**, v. 246, p. 48–57, abr. 2018.

CASTRO, L. DE A. et al. **Functional potential of amazonian biomass: protein extraction, flavonoids, phenolic compounds and antioxidant activity of murumuru cake (astrocaryum muru-muru)**. Anais do 15º SLACAN - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição. **Anais...**Campinas-SP: 2023.

CAVAZOS, A.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Identification of Bioactive Peptides from Cereal Storage Proteins and Their Potential Role in Prevention of Chronic Diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 4, p. 364–380, 12 jul. 2013.

COELHO, M. S. et al. Peptides from Chia Present Antibacterial Activity and Inhibit Cholesterol Synthesis. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 101–107, 20 jun. 2018.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 369–374, dez. 1985.

COSTA, T.; JORGE, N. Compostos Bioativos Benéficos Presentes em Castanhas e Nozes. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 13, n. 3, p. 195–203, 2011.

CRUZ-CASAS, D. E. et al. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 3, p. 100047, dez. 2021.

CUNHA, A. L. et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 2, p. 175, 1 maio 2016.

DAMODARAN, S.; PARAFA, A. **Food Proteins and their Applications**. 1. ed. [s.l: s.n.].

- DARMAWAN, R.; BRINGE, N. A.; DE MEJIA, E. G. Antioxidant Capacity of Alcalase Hydrolysates and Protein Profiles of Two Conventional and Seven Low Glycinin Soybean Cultivars. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 3, p. 233–240, 1 set. 2010.
- DAS GRAÇAS HENRIQUES, M.; PENIDO, C. Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net The Therapeutic Properties of *Carapa guianensis* Current Pharmaceutical Design. [s.l: s.n.].
- DAWSON, J. M.; HEATLIE, P. L. Lowry method of protein quantification: Evidence for photosensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 140, n. 2, p. 391–393, ago. 1984.
- DE MENEZES, A. J. E. A. **O histórico do sistema extrativo e a extração de óleo de andiroba cultivado no município de Tomé-Açu, estado do Pará**. XLIII CONGRESSO DA SOBER “Instituições, Eficiência, Gestão e Contratos no Sistema Agroindustrial. **Anais...**Ribeirão Preto - SP: 2005.
- DE QUEIROZ, J. A. L.; BEZERRA, V. S.; MOCHIUTTI, S. **A palmeira murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) no estuário do rio Amazonas no Estado do Amapá**. Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel. Clínica Tecnológica em Biodiesel. **Anais...**Lavras - MG: 2008.
- DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5062–5072, 1 jun. 2007.
- DOS SANTOS, C. C. L. et al. Desenvolvimento de sabonete em barra com manteigas de murumuru (*Astrocaryum murumuru*) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 6, p. 19646–19661, 13 jun. 2023.
- DOS SANTOS, K. I. P. et al. Metabolomics techniques applied in the investigation of phenolic acids from the agro-industrial by-product of *Carapa guianensis* Aubl. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 103421, nov. 2021.
- DU, T. et al. ACE inhibitory peptides from enzymatic hydrolysate of fermented black sesame seed: Random forest-based optimization, screening, and molecular docking analysis. **Food Chemistry**, v. 437, p. 137921, mar. 2024.
- FALCÃO, A. DE O. **Influência da interesterificação enzimática nas propriedades biológicas de óleos da Amazônia**. Tese de doutorado—[s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2015.

- FAN, H. et al. Review on plant-derived bioactive peptides: biological activities, mechanism of action and utilizations in food development. **Journal of Future Foods**, v. 2, n. 2, p. 143–159, jun. 2022.
- FERREIRA, E. DE S. et al. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). **Alim. Nutr., Araraquara**, v. v.19, n. 4, p. 427–433, 2008.
- FONSECA, I. S. DA et al. The effect of Amazonian andiroba oil on antioxidant activity, mechanical, rheological and skin permeation properties of environmentally responsive emulgers. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 101, p. 106273, nov. 2024.
- FONTANARI, G. G. et al. DSC studies on protein isolate of guava seeds *Psidium guajava*. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 93, n. 2, p. 397–402, 22 ago. 2008.
- FOUNTOULAKIS, M.; LAHM, H.-W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 826, n. 2, p. 109–134, nov. 1998.
- FRANCA, F. V. C. **Compostos bioativos de frutas amazônicas e suas utilizações: Revisão integrativa**. Cuité-PB: [s.n.].
- GAO, Z. et al. Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. **Food Research International**, v. 131, p. 109045, maio 2020.
- GARBA, U.; KAUR, S. Protein Isolates: Production, Functional Properties And Application. **International Journal of Current Research and Review**, v. 6, p. 34–45, 2014.
- GARBACZ, K. et al. Recent Trends in the Application of Oilseed-Derived Protein Hydrolysates as Functional Foods. **Foods**, v. 12, n. 20, p. 3861, 21 out. 2023.
- GHEYASUDDIN, S.; CATER, C. M.; MATTIL, K. F. Effect of several variables on the extractability of sunflower seed proteins. **Journal of Food Science**, v. 35, n. 4, p. 453–456, jul. 1970.
- GIRGIH, A. T.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Reverse-phase HPLC Separation of Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Protein Hydrolysate Produced Peptide Fractions with Enhanced Antioxidant Capacity. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 1, p. 39–46, 16 mar. 2013.

- GOMES, H. S. R. **Estrutura populacional e produção de andiroba em terra firme e várzea no sul do Amapá**. Dissertação de mestrado—Macapá, AP : Universidade Federal do Amapá/EMBRAPA/Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, 2010.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, S.; ARELLANO, J. B. Vegetable protein isolates. Em: **Handbook of Hydrocolloids**. [s.l.] Elsevier, 2009. p. 383–419.
- GRANDE, S. C.; CREN, É. C. Demanda de proteínas vegetais: potencialidades e o diferencial dos farelos de macaúba (Revisão). **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 2, n. 3, p. 190–214, 26 out. 2016.
- GRDEN, P.; JAKUBCZYK, A. Bean Spread Enriched with Spelt as a Novel Source of Bioactive Peptides with Potential Anti-Metabolic Syndrome Properties. **Sustainability**, v. 15, n. 13, p. 10173, 27 jun. 2023.
- GUALBERTO, L. DA S. **Obtenção e caracterização dos óleos obtidos dos frutos Tucumã (*Astrocaryum vulgare*), Pupunha (*Bactris gasipaes*) e Bacupari (*Garcinia gardneriana*)**. Palmas - TO: Universidade Federal do Tocantins , 2022.
- GUIMARÃES, M. C. D. F. et al. Composição das tortas oleaginosas comercializadas no Pará. **Boletim técnico do Instituto de Pesquisas e experimentações Agropecuárias do norte. Embrapa-CPPA, Manaus**, v. 1, n. 1, 1970.
- GUNATHILAKE, K. G. T. **The comparative compositional analysis and the evaluation of functional properties of protein isolates of selected locally available low fat legume varieties (mung bean and cowpea)**. Degree of Bachelor of Science (Special) in Food Science and Technology —[s.l.] University of Sri Jayewardenepura , 2015.
- HADINOTO, K. et al. Effects of Alkaline Extraction pH on Amino Acid Compositions, Protein Secondary Structures, Thermal Stability, and Functionalities of Brewer's Spent Grain Proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 12, p. 6369, 8 jun. 2024.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, maio 2012.
- HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H. G. **Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies**. **Nature Biotechnology**, dez. 2006.
- HARRISON, ROGER. G. et al. **Bioseparations Science and Engineering**. 1. ed. USA: Oxford University Press, 2015. v. 1

- HERU KARTIKA CANDRA et al. Application of The Completely Random Design Statistics Method For Analysis of Different Filter Types In Fresh Water Fish Pool Water Recirculation System. **International Journal of Science, Technology & Management**, v. 4, n. 5, p. 1197–1205, 26 set. 2023.
- HUMPHRIES, R. M. et al. CLSI Methods Development and Standardization Working Group Best Practices for Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 4, abr. 2018.
- ILLINGWORTH, K. A.; LEE, Y. Y.; SIOW, L. F. The effect of isolation techniques on the physicochemical properties of *Moringa oleifera* protein isolates. **Food Chemistry Advances**, v. 1, p. 100029, out. 2022.
- KANEDA, T. et al. Cyclolinopeptides, cyclic peptides from flaxseed with osteoclast differentiation inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 7, p. 1760–1761, abr. 2016.
- KAUR, J.; SINGH, P. K. Trypsin Detection Strategies: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 949–967, 4 jul. 2022.
- KIKUCHI, T. et al. Carapanins A–C: new limonoids from andiroba (*Carapa guianensis*) fruit oil. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 18, n. 45, p. 9268–9274, 2020.
- KJELDAHL, J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. **Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie**, v. 22, n. 1, p. 366–382, 1 dez. 1883.
- KNOP, H. G. DA C. F. et al. TRATAMENTO DE QUEIMADURA COM EMULSÃO COM ÓLEO DE ANDIROBA: CUIDADOS DE ENFERMAGEM COM A PELE. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 4, p. 04, 23 nov. 2021a.
- KNOP, H. G. DA C. F. et al. **Eficácia da utilização da emulsão com óleo de andiroba em queimadura de segundo grau: relato de caso.** Revista Multidisciplinar em Saude, 22 dez. 2021b.
- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43–81, jan. 2000.
- LEAL, A. DE B. et al. Andiroba oil (*Carapa guianensis*): Descriptive analysis and applicability. **Industrial Crops and Products**, v. 202, p. 117004, out. 2023.

- LIMA, F. E. L. DE et al. Fatty acids and cardiovascular diseases: a review. **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 2, p. 73–80, ago. 2000.
- LIMA, L. C. C. **Digestibilidade da torta de Andiroba (*Carapa guianensis*) e Ucuuba (*Virola surinamensis*) para frangos de corte**. Trabalho de conclusão de curso—Belém: Universidade Federal Rural da Amazônia, 2024.
- LIRA, G. B. et al. Extraction processes and industrial uses of andiroba and açai oils: a review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e229101220227–e229101220227, 18 set. 2021.
- LIST, G. R. Oilseed Composition and Modification for Health and Nutrition. Em: **Functional Dietary Lipids**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 23–46.
- LIU, L. et al. Fermentation and complex enzyme hydrolysis enhance total phenolics and antioxidant activity of aqueous solution from rice bran pretreated by steaming with α -amylase. **Food Chemistry**, v. 221, p. 636–643, abr. 2017.
- LÓPEZ-GARCÍA, G. et al. Antioxidant and Antimicrobial Peptides Derived from Food Proteins. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1343, 1 fev. 2022.
- LÓPEZ-SALAS, L. et al. Design of experiments for green and GRAS solvent extraction of phenolic compounds from food industry by-products - A systematic review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 171, p. 117536, fev. 2024.
- LORENZI, H. S. et al. **Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas**. [s.l.: s.n.].
- LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal - SP: Funep, , 2000.
- LOURENÇO, E. J.; FAPESP, F. **Tópicos de Proteínas de Alimentos**. [s.l.: s.n.].
- LOWRY, O. H. et al. **Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent**. **J Biol Chem**. [s.l.: s.n.].
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951b.
- MACHADO, A. P. DA F. et al. Brazilian tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare*) fruits: bioactive composition, health benefits, and technological potential. **Food Research International**, v. 151, p. 110902, jan. 2022.

- MARCELINO, G. et al. Characterization of Buriti (*Mauritia flexuosa*) Pulp Oil and the Effect of Its Supplementation in an In Vivo Experimental Model. **Nutrients**, v. 14, n. 12, p. 2547, 19 jun. 2022.
- MARQUES, M. R. et al. Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity. **Food Research International**, v. 77, p. 43–48, nov. 2015.
- MAZLOOMI, S. N. et al. Production of antioxidant peptides through hydrolysis of paper skin pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. **ARYA Atherosclerosis**, v. 15, n. 5, p. 218–227, 2019.
- MAZLOOMI, S. N. et al. Pepsin Hydrolysis of Orange By-Products for the Production of Bioactive Peptides with Gastrointestinal Resistant Properties. **Foods**, v. 10, n. 3, p. 679, 23 mar. 2021.
- MEDINA-TORRES, N. et al. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. **Agronomy**, v. 7, n. 3, p. 47, 7 jul. 2017.
- MELINI, F. et al. Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1189, 27 maio 2019.
- MELOI, P. S. et al. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1088–1093, jun. 2011.
- MENDONÇA, A. P. **Secagem e extração do óleo das sementes de andiroba (*carapa surinamensis* miq. e *carapa guianensis* aubl.)**. Doutorado em Ciências de Florestas Tropicais—Manaus, AM: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA/ Pós-graduação em Ciências de Florestas Tropicais - CFT, 2015.
- MENDONÇA, A. P. et al. Determinação das curvas de secagem das sementes de andiroba em secador solar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 4, p. 382–387, abr. 2015.
- MENEZES, B. P. DE et al. Consumo, digestibilidade e balanço de nitrogênio de rações contendo diferentes teores de torta de murumuru em dietas para ovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 1, p. 415, 29 fev. 2016.
- MENEZES, H. C. C. DE et al. Inseticida natural à base de óleo de andiroba: uma alternativa para o controle de insetos-praga em açaizais do Baixo Tocantins. **Terra & Cult**, 2023.

- MIYAKE, T. et al. Carapanolides T–X from Carapa guianensis (Andiroba) Seeds. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 20955–20966, 24 nov. 2015.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. [s.l.] Artmed Editora, 2022. v. 8
- NINOMIYA, K. et al. Hepatoprotective Limonoids from Andiroba (Carapa guianensis). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 591, 19 abr. 2016.
- NOVELLO, Z. et al. Extraction, chemical characterization and antioxidant activity of andiroba seeds oil obtained from pressurized n-butane. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 697–701, dez. 2015.
- NTATSI, G. et al. The quality of leguminous vegetables as influenced by preharvest factors. **Scientia Horticulturae**, v. 232, p. 191–205, fev. 2018.
- NUNES, Â. A. et al. Preparation and characterization of baru Dipteryx alatanut protein isolate and comparison of its physico-chemical properties with commercial animal and plant protein isolates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 1, p. 151–157, 13 jan. 2017.
- OKONKWO, C. E. et al. Lignin polyphenol: From biomass to innovative food applications, and influence on gut microflora. **Industrial Crops and Products**, v. 206, p. 117696, 15 dez. 2023.
- OLIVEIRA et al. **Caracterização físico-Química da Amêndoa de tucumã (Astrocaryum vulgare Mart.)**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.quimica.com>>.
- OLIVEIRA, A. C. DE et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.
- OLIVEIRA, M. DO S. P. et al. **Área de coleta de sementes de tucumã-do-pará com potencial para produção de óleo**. [s.l: s.n.].
- OLIVEIRA, M.; LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Caracterização físico-química de manteigas de frutos amazônicos. **ForScience**, v. 9, n. 2, p. e00979, 19 out. 2021.
- PARCHETA, M. et al. Recent Developments in Effective Antioxidants: The Structure and Antioxidant Properties. **Materials**, v. 14, n. 8, p. 1984, 15 abr. 2021.

- PEREIRA, E. et al. Physical properties of Amazonian fats and oils and their blends. **Food Chemistry**, v. 278, p. 208–215, abr. 2019.
- PEREIRA LIMA, R. et al. Murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) butter and oils of buriti (*Mauritia flexuosa* Mart.) and pracaxi (*Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze) can be used for biodiesel production: Physico-chemical properties and thermal and kinetic studies. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 536–544, mar. 2017a.
- PEREIRA LIMA, R. et al. Murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) butter and oils of buriti (*Mauritia flexuosa* Mart.) and pracaxi (*Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze) can be used for biodiesel production: Physico-chemical properties and thermal and kinetic studies. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 536–544, mar. 2017b.
- PEREIRA, S. S. C. et al. **Avaliações físico-químicas do fruto do urumuruzeiro [i.e. murumuruzeiro] (*Astrocaryum murumuru* Mart.)**. Biodiesel: evolução tecnológica e qualidade In: Congresso Brasileiro de plantas oleaginosas, óleos, gorduras e biodiesel. **Anais...**Lavras: 2006.
- PESCE, C. **Oleaginosas da amazônia**. . 2. ed. [s.l.] Museu Paraense Emílio Goeldi, Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural, Pará., 2009. v. 1
- POMORY, C. M. Color development time of the Lowry protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 378, n. 2, p. 216–217, jul. 2008.
- REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 6, p. 536–547, dez. 2004.
- REISNER, A. H.; NEMES, P.; BUCHOLTZ, C. The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 509–516, abr. 1975.
- RIBEIRO, C. D. B. et al. O uso medicinal de *Carapa guianensis* Abul. (Andiroba). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e391101522815, 28 nov. 2021.
- RIZZELLO, C. G. et al. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 549–569, dez. 2016.

RUFINO, M. S. M. et al. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2072–2075, ago. 2011.

RUFINO, MDS; ALVES, RÉ; BRITO, ESD; MORAIS, SMD et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+ 2007.** - Pesquisa Google. Disponível em: <https://www.google.com/search?q=RUFINO%2C+M.+D.+S.%3B+ALVES%2C+R.+E.%3B+BRITO%2C+E.+S.+D.%3B+MORAIS%2C+S.+M.+D.+et+al.+Metodologia+Cient%3%ADf%ica%3ADetermina%3%A7%C3%A3odaAtividadeAntioxidanteTotal emFrutaspela+Captura+do+Radical+LivreABTS%2B+2007.&oq=RUFINO%2C+M.+D.+S.%3B+ALVES%2C+R.+E.%3B+BRITO%2C+E.+S.+D.%3B+MORAIS%2C+S.+M.+D.+et+al.+Metodologia+Cient%3%ADf%ica%3ADetermina%3%A7%C3%A3odaAtividadeAntioxidanteTotal emFrutaspela+Captura+do+Radical+LivreABTS%2B+2007.&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOdIBCDEwNzBqMG05qAIAAsAIB&sourceid=chrome&ie=UTF-8>. Acesso em: 24 mar. 2025.

SANTOS, J. P. DOS et al. Avaliação das Características físico-químicas de sementes de andiroba (*Carapa Guianensis* - Meliaceae) e Açaí (*Euterpe Oleracea*). Em: **Tópicos Multidisciplinares em Ciências Biológicas**. [s.l.] Atena Editora, 2020. p. 9–15.

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1144–1150, 2009.

SCHOBER, P.; BOER, C.; SCHWARTE, L. A. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. **Anesthesia & Analgesia**, v. 126, n. 5, p. 1763–1768, maio 2018.

SILVA, L. R. Propriedades físico-químicas e perfil dos ácidos graxos do óleo da andiroba. **Nativa**, v. 6, n. 2, p. 147–152, 26 mar. 2018.

SILVA, M. K. C.; DOS SANTOS, G. B.; SILVA, M. K. C. **Desenvolvimento e estudo de estabilidade de biocosméticos capilares baseados em óleo de carapa guianensis aubl. e manteiga de astrocaryum murumuru Mart.** [s.l.: s.n.].

SILVA, R. J. The impacts of human activity on non-timber forest product of murumuru (*Astrocaryum ulei*) in riverine communities in the Western Amazon. **Trees, Forests and People**, v. 15, p. 100517, mar. 2024.

SILVA, R. N.; CAVALCANTE, H. L. Produção de sabonete líquido utilizando extratos de andiroba e mulateiro por meio da aplicação de planejamento experimental. Em: **Ciência das Plantas: desafios e potencialidades em pesquisa**. [s.l.] Editora Científica Digital, 2023. p. 121–137.

- SILVA, R. S. et al. Physicochemical properties of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) powders with different carbohydrate biopolymers. **LWT**, v. 94, p. 79–86, ago. 2018.
- SINGH, R. et al. Protein for Human Consumption From Oilseed Cakes: A Review. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, 18 mar. 2022.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1 jan. 1999.
- SOUZA, F. R. A. DE et al. Biopolímeros na indústria de alimentos: do aproveitamento de resíduos agroindustriais a produção de biopolímeros. Em: **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 4**. [s.l.] Editora Científica Digital, 2021. p. 370–388.
- SWERGOLD, G. D.; RUBIN, C. S. High-performance gel-permeation chromatography of polypeptides in a volatile solvent: Rapid resolution and molecular weight estimations of proteins and peptides on a column of TSK-G3000-PW. **Analytical Biochemistry**, v. 131, n. 2, p. 295–300, 1 jun. 1983.
- TAWALBEH, D. et al. Recent Advances in In Vitro and In Vivo Studies of Antioxidant, ACE-Inhibitory and Anti-Inflammatory Peptides from Legume Protein Hydrolysates. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2423, 7 mar. 2023.
- THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 669–675, 1 set. 2006.
- TSUGITA, A.; SCHEFFLER, J. A Rapid Method for Acid Hydrolysis of Protein with a Mixture of Trifluoroacetic Acid and Hydrochloric Acid. **European Journal of Biochemistry**, v. 124, n. 3, p. 585–588, 3 jun. 1982.
- VARGAS, A. C. DE et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159–163, fev. 2004.
- VASQUEZ-ROJAS, W. V. et al. Composition of Brazil Nut (*Bertholletia excels* HBK), Its Beverage and By-Products: A Healthy Food and Potential Source of Ingredients. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 3007, 4 dez. 2021.
- VESPA, C. E. et al. Teor de fenólicos totais e potencial antioxidante in vitro do extrato por fluido supercrítico do tucum-do-pantanal (*Bactris setosa* Mart). **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP**, n. 26, 12 dez. 2018.

- VILENA OLIVEIRA, E. et al. Uso do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) em cosmético: caracterização química e elaboração de sabonetes artesanais. **Pesquisa e Ensino em Ciências Exatas e da Natureza**, v. 7, n. 1, p. 177–191, 31 maio 2023.
- WANG, J. C.; KINSELLA, J. E. FUNCTIONAL PROPERTIES OF NOVEL PROTEINS: ALFALFA LEAF PROTEIN. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 2, p. 286–292, 1 mar. 1976.
- WANG, X. et al. Characterization, Preparation, and Purification of Marine Bioactive Peptides. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–16, 2017.
- WU, H. A New Colorimetric Method For The Determination Of Plasma Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 33–39, mar. 1922.
- ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, nov. 1998.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, jan. 2002.
- ZAYAS, J. F. **Functionality of proteins in food**. [s.l.] Springer, 1997.
- ZHAO, Q. et al. Characterization of a Novel Antimicrobial Peptide Isolated from *Moringa oleifera* Seed Protein Hydrolysates and Its Membrane Damaging Effects on *Staphylococcus aureus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 6123–6133, 25 maio 2022.
- ZHOU, T. et al. Purification and Quantification of Kunitz Trypsin Inhibitor in Soybean Using Two-Dimensional Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 10, p. 3350–3360, 22 out. 2017.
- ZHU, Z. et al. The generation and application of antioxidant peptides derived from meat protein: a review. **Food Science of Animal Products**, v. 1, n. 1, p. 9240005, mar. 2023.