

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**BRUNO MOREIRA SIQUEIRA**

**PROTEÍNAS E FENÓLICOS TOTAIS HIDROSSOLÚVEIS DE  
DIFERENTES GRÃOS DE BICO (*Cicer arietinum* L.) CULTIVADOS  
NO BRASIL.**

**ALFENAS/MG**

**2022**

**BRUNO MOREIRA SIQUEIRA**

**PROTEÍNAS E FENÓLICOS TOTAIS HIDROSSOLÚVEIS DE DIFERENTES  
GRÃOS DE BICO (*Cicer arietinum* L.) CULTIVADOS NO BRASIL.**

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

Orientador: Olga Luisa Tavano.

Coorientador: Sinézio Inácio da Silva Junior

**ALFENAS/MG**

**2022**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Siqueira, Bruno Moreira .  
Proteínas e fenólicos totais hidrossolúveis de diferentes  
Grãos de bico (*Cicer arietinum* L.) cultivados no Brasil. / Bruno Moreira  
Siqueira. - Alfenas, MG, 2022.  
58 f. : il. -

Orientador(a): Olga Luisa Tavano.  
Dissertação (Mestrado em Nutrição e Longevidade) - Universidade  
Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.  
Bibliografia.

1. Extrato aquoso. 2. Compostos hidrossolúveis. 3. Antioxidantes. 4.  
Peptídeos. I. Tavano, Olga Luisa, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

**BRUNO MOREIRA SIQUEIRA**

**PROTEÍNAS E FENÓLICOS TOTAIS HIDROSSOLÚVEIS DE DIFERENTES  
GRÃOS DE BICO (*Cicer arietinum* L.) CULTIVADOS NO BRASIL.**

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

Aprovada em: 28 de novembro de 2022

Prof<sup>a</sup>. Dra. Olga Luisa Tavano

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL - MG

Prof<sup>a</sup>. Dra. Gislene Regina Fernandes

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Prof<sup>a</sup>. Dra. Veymar Guadalupe Tacias-Pascacio

Instituição: Universidade de Ciências e Artes de Chiapas - UNICACH - Mx



Documento assinado eletronicamente por **Olga Luisa Tavano, Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2022, às 08:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gislene Regina Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2022, às 09:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Veymar Guadalupe Tacias Pascacio, Usuário Externo**, em 29/11/2022, às 16:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0868995** e o código CRC **81D4F77E**.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho é fruto da colaboração de várias pessoas. Agradeço a minha orientadora Prof. Olga Luisa Tavano pelas contribuições fornecidas desde a concepção do projeto de pesquisa até o desfecho da dissertação, pela paciência, e disponibilidade durante todo o período da orientação, sempre solicita às demandas relativas à produção do trabalho. Agradeço ao meu coorientador Prof. Sinézio Inácio da Silva Junior pela disponibilidade e paciência nos momentos de orientação o qual me possibilitaram o desenvolvimento de etapas fundamentais no trabalho.

Agradeço as professoras Tássia Batista Pessato, Veymar Guadalupe Tacias-Pascacio, Gislene Regina Fernandes e Alice Helena de Souza Paulino pelo interesse na tarefa de avaliação da dissertação. As sugestões fornecidas na fase de qualificação do desenvolvimento da pesquisa foram cruciais ao meu esforço de refinamento do texto que aqui apresento.

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

A colaboração dos discentes de iniciação científica relacionados ao grupo ProtHea (Research Group on Protein for Health Promotion) e a Juliana Alves Diniz pelo apoio e auxílio em determinadas etapas de produção do trabalho realizado.

A minha esposa Aitana de Andrade Pires pelo enorme cuidado para comigo diante das minhas dificuldades e frustrações, apoio e suporte durante todo o período de curso do programa de pós-graduação.

A minha mãe e irmãos pelo suporte e compreensão a todos os momentos vividos durante o curso do trabalho realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES - Código de Financiamento 001 e bolsa de estudos, e da FAPEMIG (APQ - 01240-21).

## RESUMO

As leguminosas como grão de bico, soja e feijões, são associadas à promoção da longevidade humana, e parte dessa associação atribui-se a composição proteica destes grãos, além da presença de outros componentes bioativos. Dentre as várias leguminosas incorporadas na dieta humana, o grão de bico ganha destaque. Seu teor de proteínas é considerado alto e com destacado perfil de aminoácidos e potencial de liberação de peptídeos bioativos. No Brasil alguns cultivares já são adaptados ao cultivo e novas linhagens em estudo vem se mostrando promissoras, com destaque para grãos do tipo desi, com coloração marrom na casca. As formas de consumo de leguminosas incluem grãos cozidos, pães e bebidas, entre outras. Extratos aquosos à base de vegetais tem se mostrado uma alternativa crescente de mercado, e podem apresentar alto teor proteico a depender da fonte vegetal, como caso das leguminosas, e sua composição será dependente da composição dos grãos, em especial do material solúvel em água. Além de proteínas, peptídeos e aminoácidos, outros compostos podem compor o conjunto de componentes solúveis presentes no produto final e que podem potencialmente impactar na saúde humana. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os compostos solúveis em água de 10 diferentes amostras de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) cultivadas no Brasil, sendo 4 do tipo kabuli, com coloração creme, e 6 do tipo desi com casca de coloração marrom, especialmente observando-se aqueles com potencial bioatividade. Foram realizadas as determinações de cor dos grãos, composição centesimal, de solubilidade de proteínas, inibidores de proteínas, fenólicos e flavonóides totais, além de atividade antioxidante dos extratos aquosos. Também foram determinados os perfis eletroforéticos e concentração de alfa-amino grupos livres totais dos extratos. Os grãos apresentaram entre 16,08 e 23,70% de proteínas totais, das quais o total solúvel se mostrou entre 48,23 e 73,68%, com a presença de atividade de protease e atividade de inibidores de tripsina. Os extratos produzidos a partir dos grãos marrons apresentaram maior atividade antioxidante, em especial para ensaios com DPPH, em comparação aos ensaios com ABTS. Esta atividade pode ser reflexo do maior teor de fenólicos e flavonóides solúveis vindos das cascas, que apresentaram teores até 10 vezes superiores aos das cascas dos grãos de coloração creme. Estes dados sugerem que bebidas à base destes grãos devem considerar seus preparos na presença das cascas, que apresentam compostos

solúveis em água potencialmente promotores da saúde humana. Além disso, as proteínas dos grãos *in natura* se mostraram de fácil extração em água, com solubilizações acima do esperado, indicando alto potencial de aplicação na produção de bebidas proteicas.

Palavras-chave: extrato aquoso; compostos hidrossolúveis; antioxidantes; peptídeos

## ABSTRACT

Legumes such as chickpeas, soybeans, and beans are associated with promoting human longevity, and part of this association is attributed to the protein composition of these legumes, as well as the presence of other bioactive components. Among the various legumes incorporated into the human diet, chickpeas stand out. Their protein content is considered high, with a notable profile of amino acids and potential for the release of bioactive peptides. In Brazil, some cultivars are already adapted to cultivation, and new strains under study are proving promising, especially brown-colored desi-type beans with colored husks. Forms of legume consumption include cooked grains, bread, and beverages, among others. Aqueous vegetable-based extracts have shown a growing market alternative and may have a high protein content depending on the plant source, such as legumes. Their composition will depend on the composition of the grains, especially the water-soluble material. In addition to proteins, peptides, and amino acids, other compounds may make up the set of soluble components present in the final product, potentially impacting human health. Thus, the objective of this work was to evaluate the water-soluble compounds of 10 different samples of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) cultivated in Brazil, including 4 kabuli-type samples with cream coloration and 6 desi-type samples with brown-colored husks, especially focusing on those with potential bioactivity. Determinations were made for grain color, proximate composition, protein solubility, protein inhibitors, total phenolics, total flavonoids, and antioxidant activity of aqueous extracts. Electrophoretic profiles and total free alpha-amino group concentrations of the extracts were also determined. The grains showed total protein contents between 16.08% and 23.70%, of which the soluble fraction ranged from 48.23% and 73.68%, with the presence of protease activity and trypsin inhibitor activity. Extracts produced from brown grains exhibited higher antioxidant activity, particularly in assays with DPPH, compared to assays with ABTS. This activity may be a reflection of the higher content of soluble phenolics and flavonoids from the husks, which had levels up to 10 times higher than those of the cream-colored husks. These data suggest that beverages based on these grains should consider their preparation with the presence of the husks, which contain water-soluble compounds potentially promoting human health. Furthermore, the proteins from fresh grains were found to be easily extracted

in water, with solubilities higher than expected, indicating a high potential for application in protein beverage production.

Key words: aqueous extract; water-soluble compounds; antioxidants; peptides

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
3.1	RELAÇÃO ENTRE LONGEVIDADE E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS .....	14
3.2	ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS .....	15
3.3	CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS, BIOATIVAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO GRÃO DE BICO .....	16
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
4.1	MATERIAL .....	22
4.2	MÉTODOS .....	22
4.2.1	<b>Preparo das amostras</b> .....	<b>22</b>
4.2.2	<b>Determinação de cor das amostras</b> .....	<b>23</b>
4.2.3	<b>Composição centesimal dos grãos</b> .....	<b>23</b>
4.2.4	<b>Extração do material hidrossolúvel das amostras</b> .....	<b>23</b>
4.2.5	<b>Determinação de proteínas dos extratos aquosos</b> .....	<b>24</b>
4.2.6	<b>Determinação da concentração de <math>\alpha</math>-amino grupos dos extratos aquosos</b> .....	<b>24</b>
4.2.7	<b>Perfil eletroforético dos extratos aquosos</b> .....	<b>24</b>
4.2.8	<b>Determinação da atividade de protease dos extratos aquosos</b> .....	<b>24</b>
4.2.9	<b>Determinação da atividade de inibição de tripsina</b> .....	<b>25</b>
4.2.10	<b>Determinação da concentração de fenólicos totais dos extratos aquosos</b> .....	<b>25</b>
4.2.11	<b>Determinação da concentração de flavonoides totais dos extratos aquosos</b> .....	<b>25</b>
4.2.12	<b>Determinação da atividade antioxidante dos extratos aquosos</b> .....	<b>25</b>
4.2.13	<b>Análises estatísticas dos dados</b> .....	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GRÃOS .....	27

5.2	HIDROSOLUBILIDADE DE COMPONENTES DOS GRÃOS .....	30
5.2.1	<b>Solubilidade de proteínas e caracterização</b> .....	<b>30</b>
5.2.2	<b>Solubilização de componentes fenólicos</b> .....	<b>39</b>
5.3	POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS COMPONENTES SOLÚVEIS DOS DIFERENTES GRÃOS .....	44
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o aumento da oferta de produtos à base de vegetais (*plant-based food*) vem crescendo consideravelmente devido a procura por uma alimentação saudável e por questões como intolerâncias alimentares e alergia ao leite de vaca, além da preocupação com a proteção ambiental e sustentabilidade. Neste contexto, os extratos aquosos a base de vegetais ("*plant-based milk*") tem se mostrado uma alternativa, especialmente os de alto teor proteico, geralmente produzidos utilizando leguminosas, cereais ou sementes de plantas comestíveis (Zhang *et al.*, 2021; Sethi *et al.*, 2016; Cortes *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2012). Desta forma, o consumo destes alimentos vem sendo associado à promoção de uma dieta mais saudável (Zhang *et al.*, 2021).

Dentre os vegetais, as leguminosas como grão de bico, soja e feijões, ganham destaque como promotoras da longevidade humana, sendo associadas a culturas alimentares de longa duração, como o consumo de derivados de soja pelos japoneses (tofu, natto e missô), o consumo de feijão marrom e ervilha pelos suecos e o consumo de lentilhas, grão de bico e feijão branco por populações do mediterrâneo (Darmadi-blackberry *et al.*, 2004). São importantes fontes de bioativos e nutrientes, em especial de proteínas que, além de apresentarem alta qualidade nutricional, vêm se mostrando capazes de liberação de peptídeos com características bioativas como a capacidade de redução de níveis de colesterol, controle da pressão arterial, inibição da enzima conversora de angiotensina, controle da glicemia e capacidade antioxidante (Matemu *et al.*, 2021; Mune *et al.*, 2018).

Além das proteínas e peptídeos, outros compostos bioativos das leguminosas vêm ganhando destaque como promotores da saúde humana, em particular os compostos fenólicos. Dentre tais compostos, destacam-se: os flavonoides, taninos, estilbenos e ácidos fenólicos, sintetizados no tegumento da semente e nas folhas, que apresentam propriedades benéficas e essenciais para a prevenção de condições de estresse oxidativo e doenças crônicas não transmissíveis (Heleno *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2014).

Para que extratos aquosos possam carrear componentes promotores da saúde humana, duas características se destacam: sua concentração e solubilidade, facilitando a transferência para o produto final.

Dentre as proteínas e outros componentes presentes no grão de bico, parte apresenta solubilidade em meio aquoso, permitindo a elaboração de extratos aquosos promotores da saúde e oferta de novos produtos e preparações.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento tem registradas várias cultivares adaptada ao cultivo no país. Na última década, novas linhagens foram adaptadas, propiciando maior acesso quantitativo e qualitativo a esses grãos aos produtores.

Assim, a partir de diferentes cultivares e linhagens de grãos de bico cultivadas no país, este trabalho analisa o potencial de liberação de componentes solúveis em meio aquoso, particularmente alguns de maior interesse nutricional e nutracêutico como proteínas, fenólicos e flavonoides.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar a solubilização aquosa de proteína, fenólicos e flavonoides de diferentes amostras de grãos de bico (*Cicer arietinum* L.) cultivadas no Brasil.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) avaliar a solubilização aquosa de proteína das amostras;
- b) avaliar a solubilização aquosa de fenólicos totais e flavonoides totais das amostras;
- c) analisar características do material proteico solúvel através da determinação de alfa-amino grupos livres, perfil eletroforético e presença de inibidores de tripsina;
- d) avaliar a atividade antioxidante dos extratos aquosos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 RELAÇÃO ENTRE LONGEVIDADE E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS

A evolução do conhecimento científico tem inspirado melhorias no estilo de vida da população, o que, aliado a avanços nas ciências médicas, tem proporcionado aumento na expectativa de vida e contribuindo para uma população mais longeva (Ekmekcioglu, 2019).

O termo longevidade é utilizado para denominar o maior tempo de vida atingido por um indivíduo ou, em média, o número de anos que viverão as pessoas de uma mesma geração (Arantes *et al.*, 2008). Uma vida longeva é dependente de fatores genéticos e ambientais, como o estilo de vida, que são determinantes do estado de saúde da população (Ordovas; Berciano, 2020).

Estima-se que a influência genética para longevidade antes dos 60 anos seja entre 20% e 25%, aumentando moderadamente após os 60 anos e tendo papel acentuado após os 90 anos (Ekmekcioglu, 2019). Porém, a genética não é fator exclusivo e a longevidade de um indivíduo ou de uma população está relacionado com fatores externos, sendo um deles a alimentação e o comportamento alimentar que o indivíduo praticou durante a vida (Ordovas; Berciano, 2020).

Alvarenga *et al.* (2019) descrevem que o termo comportamento alimentar é usado para expressar todo tipo de construto no âmbito da alimentação como o consumo, modo de comer e questões relacionadas, do tipo como e onde comer e, assim, definem comportamento alimentar como ações em relação ao ato de se alimentar, como, quando e de que forma comer. Sendo assim, o comportamento alimentar de um indivíduo ou de uma população está relacionado com o estilo de vida, ambiente em que vive e disponibilidade de alimentos da população, estando o estado nutricional relacionado à longevidade e diretamente ligado ao comportamento alimentar.

O termo estado nutricional é o grau em que as necessidades fisiológicas por nutrientes são supridas e, havendo desequilíbrio, podem ocorrer distúrbios nutricionais, tanto pela falta ou por excesso (Lopes *et al.*, 2008). O estado nutricional saudável é alcançado quando há equilíbrio entre a oferta alimentar e as necessidades nutricionais dos indivíduos, sendo essas, o gasto basal para funções

orgânicas, o gasto para realização de atividades físicas e as necessidades específicas, tais como o crescimento, gestação e envelhecimento (Rossi *et al.* 2015). Assim, o estado nutricional é de suma importância para a qualidade de vida e saúde de uma população (Pereira *et al.* 2016).

Com o aumento da expectativa de vida e envelhecimento populacional, há uma mudança no perfil epidemiológico populacional, aumentando doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como doenças cardiovasculares, câncer e diabetes não apenas em faixas etárias mais idosas, mas, a exemplo da obesidade, tendo incidência precoce, ameaçando os avanços na longevidade (Campolina *et al.*, 2013; Cortez *et al.*, 2019).

A obesidade está associada a um aumento da síntese de adipocinas (citocinas) pró-inflamatórias e aumento de produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Trist *et al.*, 2019; Simioni *et al.*, 2018; Liguori *et al.*, 2018; Hajam *et al.*, 2022). A obesidade ocasiona hiperglicemia, hiperlipidemia, deficiências de vitaminas e minerais, inflamação crônica e enfraquecimento do sistema antioxidante (*idem*).

### 3.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS

No organismo humano a produção de energia a partir da adenosina trifosfato (ATP) é realizada por diferentes reações bioquímicas que levam à redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ). Vias metabólicas como as do ciclo do ácido tricarbóxico (*tricarboxylic acid*) e a cadeia respiratória são relacionadas à produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*) e produção de radicais livres (Phaniendra *et al.*, 2015).

Uma das funções das espécies reativas de oxigênio (ROS) no organismo humano é a proteção contra microrganismos patogênicos, atuando como defesa imunológica e na formação de estruturas celulares como as proteínas (Zhang *et al.*, 2016; Sies, 2015).

Sendo assim, as células produzem ROS, usadas na sinalização intracelular, sendo uma das atividades relacionadas à produção de proteínas reguladoras e citoprotetoras. Hajam *et al.* (2022) descrevem em seu trabalho que as ROS controlam a sinalização pró-inflamatória, pró-fibrótica, proliferação celular, morte celular, além de outros processos biológicos sem necessidade de dano

macromolecular (idem). Por outro lado, o aumento nos níveis de ROS intracelular leva à oxidação de proteínas intermembranares, como quinases e fosfatases que afetam fatores de crescimento, citocinas e hormônios, podendo induzir o efeito de regulação negativa em vias de sinalização em cascatas, como as vias PKa, proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*) e fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K) (idem ibidem).

Desta forma, o desequilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS leva ao estresse oxidativo no corpo humano, indicando que os níveis de oxidantes superaram o sistema antioxidante, podendo provocar danos a várias estruturas celulares, incluindo membranas, proteínas, lipídeos e o DNA (Schieber; Chandel, 2014; Simioni *et al.*, 2018).

Esses processos envolvidos com o aumento de ROS geram um estresse oxidativo produzido pelo aumento na geração de radicais livres ou diminuição do nível de antioxidantes intracelular e tecidual, causando alterações orgânicas, associadas a doenças crônicas não transmissíveis, incluindo Parkinson, doença renal, doenças cardiovasculares, alzheimer e diabetes (Blesa *et al.*, 2015; Paredes *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016; Asmat *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2020).

Alguns autores relacionam a produção aumentada de ROS na obesidade pela sobrecarga metabólica relacionada ao consumo aumentado de oxigênio pelo miocárdio, sobrecarga mitocondrial, liberação de citocinas pelo tecido adiposo e dieta rica em gordura (França *et al.*, 2013; Poprac *et al.*, 2017; Sies *et al.*, 2017; Porsch *et al.*, 2019).

### 3.3 CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS, BIOATIVAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO GRÃO DE BICO

Os principais tipos de grão de bico cultivados no mundo são Kabuli (geralmente maior e de coloração creme) e Desi (geralmente menor e de coloração escura) (Thushan *et al.*, 2011). Diferenças em características tecno-funcionais entre os dois tipos de grão de bico são relatadas na literatura, como as apresentadas por Kaur & Singh (2006), que constataram que proteínas isoladas do cultivar Kabuli (cultivar L-550) e Desi (cultivares PBG-1, PDG-4, PDG-3, GL-769 e GPF-2) possuem significativa diferença na capacidade de gelificação, formação de espuma, capacidade de absorção de água e óleo, e temperaturas de desnaturação. Porém as

diferenças no conteúdo proteico e nas características bioativas entre os genótipos Kabuli e Desi ainda não estão devidamente esclarecidas na literatura, com variações observadas com base em genótipos específicos (Hernandez; Mejia, 2019).

As características do grão de bico o tornam uma leguminosa com alto valor nutricional por conter em sua composição uma variedade e quantidade de macro e micronutrientes altamente digeríveis como proteínas, carboidratos, vitaminas, fibras, minerais e aminoácidos essenciais, além de compostos bioativos que apresentam alta capacidade antioxidante, propriedades antidiabéticas e anti-inflamatórias (Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015; Garzón-Tiznado *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2017; Cid-Gallegos *et al.*, 2020; Faridy *et al.*, 2020; Ramadhani *et al.*, 2020; Mahbub *et al.*, 2021).

O grão de bico (*Cicer arietinum* L.) apresenta em sua composição entre 41% e 50% de carboidrato com predominância o amido, entre 12,4% e 31,5% de proteína bruta e aproximadamente 6% de lipídios compostos por ácidos graxos insaturados, além de micronutrientes como vitaminas do complexo B, vitamina A, cálcio, magnésio, fósforo, potássio, fitoesteróis  $\beta$ -sitosterol, campesterol, stigmasterol e fitoquímicos (flavonoides, ácidos fenólicos, lignina e carotenoides) (Hirdyani, 2014; Arooj *et al.*, 2021; Torres-Fuentes *et al.*, 2015; Hernandez; Mejia, 2019).

Dentre os macro nutrientes, as proteínas do grão de bico apresentam níveis adequados de aminoácidos essenciais de acordo com a recomendação proposta pela FAO/WHO/UNU (2013) para crianças pré-escolares e adultos, com exceção dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína). Menor conteúdo em metionina, entretanto, pode contribuir para menor consumo desse aminoácido, o que resulta diretamente em menores níveis de glutathione, melhor resistência ao estresse oxidativo, diminuição dos níveis séricos de insulina e IGF-1, como já observado em ensaios biológicos com animais (Tavano *et al.*, 2008; Laming; Green, 2018; Swaminathan *et al.*, 2021).

Ainda em seu perfil de aminoácidos, o grão de bico contém concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA's) superior à recomendação pela FAO/WHO/UNU (2013) para adultos, característica importante quem vem sendo relacionada na literatura na promoção da síntese muscular pela ativação da *mammalian target of rapamycin* (mTOR), estimulação da secreção de insulina pelas células beta do pâncreas e influência na liberação de hormônios reguladores de apetite produzidos pelo hipotálamo e intestinos (Sener; Malaisse, 1980; Yang *et al.*,

2010, Yang *et al.*, 2012; Neinast *et al.*, 2019; Mu *et al.*, 2018; Solon-Biet *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2019; Tavano *et al.*, 2008).

As frações proteicas do grão de bico são compostas principalmente de globulinas (cerca de 48%), seguidas de albuminas (cerca de 19%), glutelinas (cerca de 10%) e prolaminas (cerca de 0,2%), com diferentes solubilidades. Fator determinante na aplicação de fontes proteicas na produção de alimentos, principalmente em bebidas à base de vegetais, onde as albuminas por serem solúveis em meio aquoso ganham destaque (Tavano *et al.*, 2008; Yust *et al.*, 2010). Por outro lado, a extração proteica assistida por proteases pode aumentar o rendimento de extração e gerar produtos diferenciados com presença de peptídeos bioativos, além da qualidade nutricional das proteínas do grão de bico. A exemplo do obtido por Yust *et al.* (2010), em seu trabalho usando alcalase, em que conseguiram um aumento da solubilidade proteica em água, apontando para uma importante inclusão de etapa no processo na produção de alimentos de alto teor proteico.

A liberação de peptídeos pela hidrólise de proteínas de grão de bico é encontrada na literatura com o uso, por exemplo, de alcalase,  $\alpha$ -quimiotripsina, flavorzima, papaína, bromelina, pepsina e tripsina usadas isoladamente ou em combinações (Hernandez; Mejia, 2019). Tais peptídeos biofuncionais estão presentes nas estruturas de proteínas e podem ser liberados não só pelo uso de proteases comerciais, mas por enzimas digestivas gastrointestinais e por fermentação (Matemu *et al.*, 2021). É crescente na literatura a presença de trabalhos que evidenciam os potenciais de bioatividade dos peptídeos extraídos das proteínas de grão de bico, associados a efeitos benéficos à saúde como atividade antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antifúngica, hipoglicemiante, antiobesogênica e hipocolesterolêmica (Hernandez; Mejia, 2019; Barbana; Boye, 2010; del Mar Yust *et al.*, 2012; Milan-Noris *et al.*, 2018; Torres-Fuentes *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2015).

Sobre a atividade antioxidante relacionada a esses peptídeos, a estrutura dos aminoácidos e conseqüentemente dos peptídeos formados pela junção deles apresenta importância estratégica. Peptídeos contendo o aminoácido histidina têm a capacidade de quelar íons metálicos e doadores de hidrogênio/elétrons por meio de interações com radicais livres, atuando como peptídeos antioxidantes (Soto *et al.*, 2021; Torres-Fuentes *et al.*, 2015). Matsui *et al.* (2018) em seu trabalho de análise da estrutura química de peptídeos, em particular das cadeias laterais de

aminoácidos, e propriedades antioxidantes, descrevem que a presença de grupos aromáticos (Treonina, Tirosina e Fenilalanina), imidazol (Histidina) e os sulfurados (Cisteína e Metionina) em peptídeos apresentam capacidade antioxidante e que vários aminoácidos isolados como Tirosina, Metionina, Histidina, Lisina, Prolamina e Triptofano influenciam na atividade antioxidante ou são aceitos como antioxidantes.

Estudos relacionam a extração de peptídeos de diferentes frações proteicas das presentes no grão de bico com diferentes atividades bioativas. Com relação à albumina de grão de bico como fonte de peptídeos com bioatividade, Kou *et al.* (2013), após extração de peptídeos desta fração proteica, destacaram o peptídeo RQSHFANAQP que apresentou inibição da proliferação de células cancerígenas da mama e redução dos níveis de colesterol total e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. Chandrasekaran *et al.* (2020) constataram a inibição da enzima  $\alpha$ -amilase e DPP4 pela proteína do grão de bico hidrolisada com as enzimas pepsina e bromelina. Fator atribuído pelos autores aos peptídeos PHPATSGGGL, YVDGSGTPLT, SPQSPPFATPLW, KMTAGSGVT, GKAAPGSGGGTKA e GLTQGASLAGSGAPSPLF.

Outra característica presente entre as proteínas do grão de bico são os inibidores de proteases, sintetizados naturalmente pelas plantas, que atuam no processo digestivo principalmente pelo bloqueio da ação da tripsina e quimotripsina, além de outras proteases, afetando a absorção proteica (Idate *et al.*, 2021).

Dentre os inibidores de proteases estão os do tipo Bowman-Birk que apesar de estarem relacionados ao fator antinutricional por dificultar a hidrólise de proteínas ingeridas, tem apresentado um potencial de proteção contra processos inflamatórios e desenvolvimento de câncer no trato gastrointestinal de mamíferos pela habilidade de inibição das serino-proteases (Kennedy *et al.*, 2002; Clemente; Domoney, 2006; Clemente; Domoney, 2007; Chen *et al.*, 1992; Ramasarma *et al.*, 1995; Trivedi *et al.*, 2009).

Sobre a composição lipídica do grão de bico, ele contém baixa concentração sendo de 4,5 a 6,6%, essa composta de ácidos graxos palmítico (10,8%), oleico (33,5%), linoleico (49,7%) e linolênico (2,4%) além de substâncias antioxidantes como tocoferóis e carotenoides (Jukanti *et al.*, 2012; Ryan *et al.*, 2007).

Além dos peptídeos, tocoferóis e carotenoides outras substâncias de destaque na atividade antioxidante presentes no grão de bico são os fenólicos totais (Savic *et al.*, 2018). Hussein Hend *et al.* (2020) em sua análise da farinha de grão de

bico destaca relevância entre a atividade antioxidante e a concentração de total de fenólicos, observando que a quantidade de 3,44 mg equivalente de ácido gálico por grama de amostra apresentou potencial de inibição da atividade oxidante do reagente DPPH de 80,64%.

Fator observado também em estudos de suplementação de iogurtes de leite de vaca com farinha de grão de bico, onde o potencial antioxidante mensurado pelos métodos DPPH e método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) do iogurte obteve aumento, relacionando a concentração de fenólicos atribuídos aos flavonoides presentes no grão de bico (Trigueros *et al.*, 2014; Fernandez-Orozco *et al.*, 2009).

Quintero-Soto *et al.* (2018) em sua análise do perfil de fenólicos totais e atividade antioxidante de grão de bico detectou a presença de ácidos hidroxibenzoicos e flavan-3-óis, ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides e após análise de atividade antioxidante pelo métodos ABTS, DPPH e FRAPS concluíram que a atividade antioxidante encontrada apresenta estar relacionada ao conteúdo de fenólicos totais (sinapic acid hexoside e ácido gálico) e flavonoides totais (miricetina, quercetina, catequina e Isorhamnetina).

Existe diferenças nas concentrações desses fitoquímicos presentes no grão de bico, havendo estudos comparando e quantificando essa atividade antioxidante entre genótipos diferentes (Desi e Kabuli), apresentando as Desi concentrações maiores de fenólicos totais e flavonoides totais, conseqüentemente atividade antioxidante maior (Heiras-Palazuelos *et al.*, 2013; Segev *et al.*, 2010; Quintero-Soto *et al.*, 2018).

Jameel *et al.* (2021), observou essa diferença entre genótipos Desi e Kabuli, ao concluírem em sua pesquisa que ambas apresentam atividade antioxidante e potencial terapêutico, porém os genótipos Desi são mais promissores que os Kabuli e que o consumo de genótipos com alta atividade antioxidante pode ser utilizado como fontes naturais de substâncias antioxidantes para melhoria do sistema imunológico, auxílio no tratamento da diabetes e redução de diferentes tipos de processos inflamatórios corporais.

Desta forma a depender da forma de preparo e do cultivar do grão escolhido para preparação de alimentos que contenham como ingrediente o grão de bico, em particular a bebida produzida a base dessa leguminosa ("*chickpea milk*"), pode apresentar alto valor nutricional e características nutracêuticas, tornando-se uma

alternativa também a bebida à base de soja (“*soy milk*”), podendo ser usada para desenvolvimento de fórmulas infantis como uma outra opção as fórmulas compostas de proteína de soja para crianças que necessitam de fórmulas isentas de lactose (Kishor *et al.*, 2017).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

Foram utilizados diferentes tipos de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) cedidos pela AgroGarbanzo Produção Agrícola LTDA. (Cristalina, GO), sendo quatro cultivares do tipo Kabuli (BRS Cristalino, BRS Toro, BRS Aleppo e BRS Cicero) e seis linhagens do tipo Desi (Gb 19-084 UPL 4, Gb 20-031 D, Gb 20-031, Gb 20-056 A, Gb 20-072 e Gb 20-074) (Figura 1).

Figura 1 - Cultivares e linhagens de grãos de bico (*Cicer arietinum* L.) utilizadas neste trabalho.



Fonte: Autor (2022).

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Preparo das amostras

Os grãos recebidos foram selecionados manualmente para retirada de grãos imperfeitos ou sujidades. Os grãos foram pulverizados em moinho de facas do tipo “Pulverizette” ajustado para granulometria de 0,5 mm. A farinha integral produzida foi utilizada para os ensaios de solubilidade. Para análise das cascas, foram removidas dos grãos íntegros de forma manual e igualmente trituradas.

#### **4.2.2 Determinação de cor das amostras**

A colorimetria das amostras foi realizada com os grãos íntegros, em triplicata, através das medidas de CIEL\*a\*b\* conforme descrito por Minolta (1998), utilizando-se colorímetro Konica Minolta colorimeter (CR400, Minolta Co., Japan).

#### **4.2.3 Composição centesimal dos grãos**

Para composição centesimal foram realizadas análises em triplicata de cada amostra conforme descrito *Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995)*, a saber: o teor de umidade foi realizado com base na determinação gravimétrica de voláteis a 105 °C, em estufa com circulação forçada de ar até peso constante; o teor de cinzas foi determinado como resíduo mineral fixo, por gravimetria, utilizando-se mufla a 550 °C até peso constante; o teor de lipídeos foi determinado pelo método de Soxhlet por extração contínua com solvente éter de petróleo; o teor de proteínas foi determinado através da quantificação de nitrogênio total, conforme item 4.2.5. Os carboidratos totais foram calculados por diferença, a partir da fração NIFEXT, diminuindo-se a soma dos demais componentes de 100 g de amostra.

#### **4.2.4 Extração do material hidrossolúvel das amostras**

Um primeiro ensaio de extratibilidade proteica foi realizado conforme descrito por Tavano *et al.* (2008) considerando-se extrações sucessivas para verificação das condições de processo e esgotamento do material solúvel das amostras. A partir das amostras de farinhas íntegras produzidas, foram realizadas extrações utilizando-se água destilada na proporção de 1:40 (m/v), com agitação em mesa (Multifuncional Mixer MRII) por 30 min. Após centrifugação por 20 min a 7000 RPM (6519g)/4°C, o sobrenadante foi reservado e o resíduo reextraído utilizando-se a proporção de 1:20

m/v. Após nova centrifugação, o processo de reextração foi repetido novamente com a proporção 1:20 m/v e o sobrenadante das três extrações foram reservados para análises isoladas da concentração de proteínas solubilizadas em cada extração, posteriormente, os sobrenadantes das três extrações foram reunidos para os restantes das análises. Para extração de substâncias hidrossolúveis das cascas foi realizado o mesmo processo descrito para as farinhas íntegros, porém, testes preliminares indicaram a baixa concentração de compostos solúveis das cascas (dados não apresentados), portanto, foram realizadas extrações das amostras utilizando-se água destilada na proporção de 1:60 (m/v), sem reextrações.

#### **4.2.5 Determinação de proteínas dos extratos aquosos**

A determinação de proteínas dos extratos aquosos foi realizada pelo método de Kjeldahl conforme descrito *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995), e conversão à proteína por utilização do fator 6,25.

#### **4.2.6 Determinação da concentração de $\alpha$ -amino grupos dos extratos aquosos**

A determinação da concentração de  $\alpha$ -amino grupos livres nos extratos aquosos foi realizada com uso do reagente OPA (orto-Phthaldialdehyde) conforme descrito por Church *et al.* (1983), leituras pelo espectrofotômetro a 340nm e curva analítica de leucina como referência.

#### **4.2.7 Perfil eletroforético dos extratos aquosos**

O perfil eletroforético das frações proteicas dos extratos aquosos foram determinados por SDS-PAGE, realizado conforme descrito por Laemmli (1970), gel de 12% de acrilamida, sem tratamento com mercaptoetanol.

#### **4.2.8 Determinação da atividade de protease dos extratos aquosos**

A determinação da atividade de protease dos extratos aquosos foi realizada com uso do reagente BAPNA (Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) conforme descrito

por Kakade *et al.* (1974). Uma curva de p-nitroanilina foi utilizada como padrão e os resultados apresentados em  $\mu\text{mol}$  de p-nitroanilina liberados/minuto.

#### **4.2.9 Determinação da atividade de inibição de tripsina**

A determinação da atividade de inibição de tripsina das amostras foi realizada como descrito por Kakade *et al.* (1974), utilizando-se BAPNA (Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) como substrato e tripsina de pâncreas bovino (Type I, 10.000 BAEE unidades/mg proteína, Sigma). Uma Unidade de Inibição de Tripsina (UIT) foi definida como o aumento de 0,01 de absorvância, nas condições do ensaio.

#### **4.2.10 Determinação da concentração de fenólicos totais dos extratos aquosos**

A concentração de fenólicos totais foi determinada com uso do reagente Folin-Ciocalteu como descrito por Singleton e Rossi (1965), e algumas modificações como descrito por Boateng *et al.* (2008), uma curva de ácido gálico foi utilizada como padrão e os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

#### **4.2.11 Determinação da concentração de flavonoides totais dos extratos aquosos**

A determinação de flavonoides totais dos extratos aquosos foi realizada com uso do reagente  $\text{AlCl}_3$  (cloreto de alumínio), conforme descrito por Boateng *et al.* (2008). Foi utilizada uma curva padrão de catequinas como referência e os resultados expressos em mg equivalente de catequinas por grama de amostra.

#### **4.2.12 Determinação da atividade antioxidante dos extratos aquosos**

A determinação do potencial antioxidante dos extratos foi estimada pelos métodos de captura de elétrons com uso de reagente ABTS+ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) como descrito por Ahn *et al.* (2014), utilizando-se leituras a 734 nm e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) como descrito por Shimada *et al.* (1992), com leituras a 517 nm modificado por Pereira & Tavano

(2014). Uma curva de TROLOX foi utilizada como padrão e os resultados expressos em nmol de equivalente de TROLOX.

#### **4.2.13 Análises estatísticas dos dados**

Foi utilizada análise de variância com teste de Tukey, adotando-se nível de significância de  $p < 0,05$ . Para investigar correlação entre os resultados, foi utilizado teste de correlação de Pearson e os resultados obtidos foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Foi utilizado o software RStudio workbench versão 2022.07.2 build 576.prol12 para análise de variância e testes de Tukey e o software Past versão 4.03 para testes de correlação de Pearson.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GRÃOS

Os grãos estudados compreendem amostras que podem ser visualmente diferenciadas pelas colorações de seus tegumentos. Conforme imagem apresentada anteriormente (Figura 1), as amostras do tipo Kabuli são de coloração mais clara, creme, e as do tipo Desi de coloração mais escura, marrom. Os dados de colorimetria obtidos foram reunidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Colorimetria das diferentes amostras de grão de bico (*Cicer arietinum* L.).

Amostras			L	a	b	Tom (h)	Croma (C)
Cultivares	Tipo	Cor do tegumento					
BRS Cristalino	Kabuli	Creme	59,70 <sup>a</sup>	+13,27 <sup>c,d</sup>	+27,57 <sup>a,b</sup>	64,33 <sup>a</sup>	30,63 <sup>b,c</sup>
BRS Toro	Kabuli	Creme	61,77 <sup>a</sup>	+12,33 <sup>c,d</sup>	+28,83 <sup>a</sup>	66,77 <sup>a</sup>	31,33 <sup>a,b,c</sup>
BRS Aleppo	Kabuli	Creme	58,23 <sup>a</sup>	+11,93 <sup>d</sup>	+24,40 <sup>a,b,c</sup>	63,97 <sup>a</sup>	27,13 <sup>c,d,e</sup>
BRS Cícero	Kabuli	Creme	57,37 <sup>a</sup>	+10,13 <sup>d</sup>	+22,53 <sup>d,c,d</sup>	65,77 <sup>a</sup>	24,70 <sup>e</sup>
Linhagens		Tipos					
Gb 19-084 UPL 4	Desi	Marrom	31,67 <sup>b</sup>	+13,47 <sup>c,d</sup>	+18,13 <sup>d</sup>	53,63 <sup>b</sup>	22,60 <sup>e</sup>
Gb 20-031 D	Desi	Marrom	40,57 <sup>b</sup>	+22,37 <sup>a</sup>	+27,60 <sup>a,b</sup>	51,03 <sup>b</sup>	35,60 <sup>a</sup>
Gb 20-031	Desi	Marrom	39,10 <sup>b</sup>	+20,00 <sup>a,b</sup>	+26,33 <sup>a,b</sup>	52,67 <sup>b</sup>	33,47 <sup>a,b</sup>
Gb 20-056 A	Desi	Marrom	38,67 <sup>b</sup>	+18,90 <sup>a,b</sup>	+25,80 <sup>a,b</sup>	53,77 <sup>b</sup>	32,03 <sup>a,b</sup>
Gb 20-072	Desi	Marrom	29,13 <sup>b</sup>	+16,53 <sup>b,c</sup>	+19,90 <sup>c,d</sup>	49,87 <sup>b</sup>	25,97 <sup>d,e</sup>
Gb 20-074	Desi	Marrom	33,53 <sup>b</sup>	+19,13 <sup>a,b</sup>	+23,80 <sup>a,b,c</sup>	51,07 <sup>b</sup>	30,53 <sup>b,c,d</sup>

Fonte: Autor (2022).

Nota: Resultados apresentam médias  $\pm$  desvio padrão de três leituras. Valores em mesma coluna contendo letras iguais sobrescritas não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey's ( $p < 0,05$ ).

Quando se considera os resultados entre os grupos de grãos do tipo Kabuli, creme, e Desi, marrons, observa-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no que se refere aos valores de luminosidade (L). Considerando-se que os valores de luminosidade são medidas que variam de 0 (preto) a 100 (branco), há um esperado conjunto de valores mais altos para as amostras de cor creme (Kabuli),

que variam entre 57,37 e 61,77, em comparação às linhagens marrons, que apresentam médias entre 29,13 e 40,57.

As linhagens tipo Desi, além dos tons mais escuros, apresentam os maiores valores para a medida do eixo “a”, cujo indica tons entre verde (leituras mais baixas) e vermelho (leituras mais altas), alcançando medidas como 22,37 para a linhagem Gb 20-031 D, enquanto as cultivares tipo Kabuli apresentaram os valores mais baixos, com semelhança estatística entre elas.

Para os valores do eixo “b” não houve destacada diferença entre os tipos, o que indica que as amostras apresentarão maior tendência para a coloração amarela, já que este eixo representa a variação de cores entre azul (valores mais baixos) e amarelo (valores mais altos do eixo). Já para os valores de tom (hue) as amostras de Kabuli obtiveram valores mais altos, entre 63,97 e 66,77, e os tipos Desi resultados entre 51,03 e 53,77 com diferença entre ambas.

Na Tabela 2 foram reunidos os valores de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos totais das amostras em base úmida, sendo os valores de umidade entre 8,48 e 8,94% para as amostras do genótipo Kabuli e entre 8,16 e 9,05% para os genótipos Desi. Quanto ao teor de cinzas, as amostras apresentaram valores entre 2,42 e 3,1% (Kabuli) e 2,16 e 2,44% (Desi), lipídeos valores entre 5,15 e 6,2% (Kabuli) e entre 4,52 e 6,47% (Desi).

A amostra BRS Cícero apresentou entre os outros cultivares a menor concentração de proteínas totais com valor de  $16,69 \pm 0,37\%$ , já o cultivar BRS Aleppo apresentou a maior concentração de proteínas entre os cultivares analisados com valor de  $24,25 \pm 0,23\%$ . Estudos recentes apresentaram ótimos resultados na produção comercial do cultivar BRS Aleppo obtido pelo cruzamento entre as linhagens X99TH104/FLIP84-11 e S95082, em solo brasileiro, sendo mais uma alternativa de plantio e qualidade nutricional para a população devido as suas características (Giordano; Nascimento, 2005; Nascimento *et al.*, 2014).

Tabela 2 – Composição centesimal das amostras de grãos de bico (*Cicer arietinum* L.) de diferentes genótipos.

Amostras		Componentes (%)				
		Umidade	Cinzas	Lípídeos	Proteínas	Carboidratos*
Cultivares	Tipos					
BRS Cristalino	Kabuli	8,78 ± 0,04	2,50 ± 0,04	5,68 ± 0,28	23,73 ± 0,15	59,31
BRS Toro	Kabuli	8,41 ± 0,02	2,42 ± 0,20	6,20 ± 0,17	22,14 ± 0,17	60,83
BRS Aleppo	Kabuli	8,94 ± 0,03	2,83 ± 0,04	5,71 ± 0,02	24,25 ± 0,23	58,27
BRS Cícero	Kabuli	8,48 ± 0,07	3,10 ± 0,05	5,15 ± 0,06	16,69 ± 0,37	66,58
Linhagens	Tipos					
Gb 19-084 UPL 4	Desi	9,05 ± 0,10	2,23 ± 0,06	6,00 ± 0,08	19,24 ± 0,73	63,48
Gb 20-031 D	Desi	8,99 ± 0,01	2,40 ± 0,05	4,52 ± 0,17	21,70 ± 0,32	62,39
Gb 20-031	Desi	8,25 ± 0,11	2,16 ± 0,04	5,38 ± 0,06	21,83 ± 0,23	62,38
Gb 20-056 A	Desi	8,32 ± 0,07	2,44 ± 0,08	5,35 ± 0,03	21,89 ± 0,51	62,00
Gb 20-072	Desi	8,18 ± 0,11	2,21 ± 0,04	6,47 ± 0,01	22,42 ± 0,38	60,72
Gb 20-074	Desi	8,16 ± 0,09	2,35 ± 0,08	5,32 ± 0,10	22,68 ± 0,13	61,49

Fonte: Autor (2022).

Nota: Resultados apresentam médias ± desvio padrão de três determinações em base úmida.

\*Carboidratos totais estimados por diferença dos demais componentes.

Ainda no contexto de proteínas, observou-se que as amostras apresentam valores dentro do observado na literatura, como apresentou Tavano *et al.* (2004) em seu trabalho de avaliação nutricional de proteínas de grão de bico, analisando a variedade IAC-Marrocos, onde foi observado que a farinha descorticada e desengordurada dessa variedade contém 25,01% de proteína, e que desse total de proteína 47,85% pertence a fração de globulinas, 18,63% de albumina, 10,02% glutelina e 0,17% de prolamina. Outros autores apresentam o percentual proteico do grão de bico em base seca entre 12,4% e 31,5%, sendo assim as amostras apresentaram valores próximos aos encontrados por outros autores (Torres-Fuentes *et al.*, 2015; Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015). Hernandez e Mejia (2019) destacam em seu trabalho que as diferenças no teor proteico entre os genótipos Kabuli e Desi ainda não estão esclarecidos e que diferentes variações são observadas na literatura.

## 5.2 HIDROSOLUBILIDADE DE COMPONENTES DOS GRÃOS

### 5.2.1 Solubilidade de proteínas e caracterização

Sobre a solubilização das proteínas presentes nas amostras, considerando o total extraído nos três ciclos de extração e o total de proteínas presente na farinha de cada amostra, foram expressos os rendimentos de extração total apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Solubilidade aquosa de proteínas de diferentes cultivares e linhagens de grão de bico (*Cicer arietinum* L.).

Amostras		Proteínas extraídas a partir de 1 g de amostra (mg)	Total de proteínas em 1 grama de farinha (mg)	% de extração
Cultivares	Tipo			
BRS Cristalino	Kabuli	123,96 ± 1,11 <sup>b,c</sup>	237,30	51,97 ± 0,47 <sup>e</sup>
BRS Toro	Kabuli	144,16 ± 0,00 <sup>a</sup>	221,40	65,11 ± 0,00 <sup>b</sup>
BRS Aleppo	Kabuli	126,52 ± 3,83 <sup>b,c</sup>	242,50	51,66 ± 1,58 <sup>e</sup>
BRS Cícero	Kabuli	122,96 ± 1,81 <sup>c</sup>	166,90	73,68 ± 1,08 <sup>a</sup>
Linhagens	Tipo			
Gb 19-084 UPL 4	Desi	101,24 ± 1,81 <sup>e</sup>	192,40	52,62 ± 0,94 <sup>e</sup>
Gb 20-031 D	Desi	114,57 ± 2,12 <sup>d</sup>	217,00	53,36 ± 0,98 <sup>d,e</sup>
Gb 20-031	Desi	106,55 ± 2,21 <sup>e</sup>	218,30	48,23 ± 1,01 <sup>f</sup>
Gb 20-056 A	Desi	125,23 ± 1,84 <sup>b,c</sup>	218,90	57,21 ± 0,84 <sup>c</sup>
Gb 20-072	Desi	130,07 ± 2,81 <sup>b,c</sup>	224,20	58,29 ± 1,25 <sup>c</sup>
Gb 20-074	Desi	126,78 ± 3,78 <sup>b,c</sup>	226,80	55,90 ± 1,67 <sup>c,d</sup>

Fonte: Autor (2022).

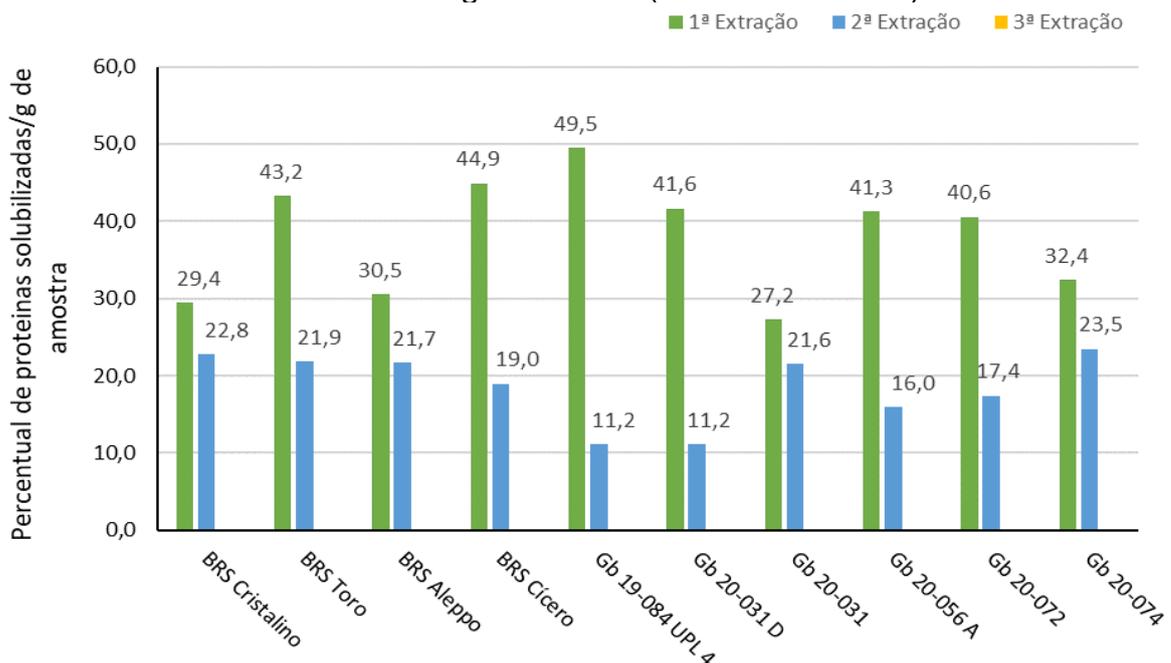
Nota: Resultados apresentam médias ± desvio padrão de três determinações. Valores em mesma coluna contendo letras iguais sobrescritas não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey's ( $p < 0,05$ ).

Os cultivares do genótipo Kabuli apresentaram valores de extração entre 51,66% e 73,68%. As linhagens do genótipo Desi apresentaram valores entre 48,23% e 58,29%. O cultivar BRS Cícero obteve melhor aproveitamento na extração de proteínas em água, com valor de extração de 73,68% ± 1,08 apresentando

diferença das demais amostras. Desta forma, apesar de ser o cultivar com menor teor proteico total, seu extrato aquoso apresentou teor de proteínas próximo ao dos extratos das outras amostras, sendo similar estatisticamente às cultivares BRS Cristalino, BRS Aleppo, Gb 20-056 A, Gb 20-072 e Gb 20-074. Desta forma, os extratos apresentaram rendimento de extração proteica semelhante, com menores quantidade os extratos das amostras BRS Cristalino, BRS Aleppo, Gb 20-031 e Gb 19-084 UPL 4.

Uma maior extração proteica pode permitir que se empregue estes grãos de maneira mais eficiente na elaboração de produtos, como bebidas vegetais, com teor proteico maior. Neste sentido, para efeito de processo de obtenção de extratos aquosos para formulação de bebidas proteicas, é importante destacar-se os dados da Tabela 3 foram obtidos após três ciclos de extração consecutivos, assim, a observação adicional foi sobre o percentual de proteínas obtido em cada um dos ciclos, permitindo estimar-se o potencial de solubilização destas proteínas em processos que empreguem apenas um ciclo de extração. Os resultados da solubilização de proteínas em água para os diferentes grãos estão representados na Figura 2, considerando-se o percentual de proteínas extraídas em cada ciclo de extração.

Figura 2 - Percentual de proteínas solubilizadas em água, por ciclo de extração, para diferentes amostras de grão de bico (*Cicer arietinum* L.).



Fonte: Autor (2022).

Nota: 3ª Extração rendimento não detectado.

Na primeira extração os extratos aquosos dos genótipos Kabuli (BRS) obtiveram valores entre 29,4 e 44,9% de rendimento de extração proteica e as amostras do genótipo Desi (Gb) entre 27,2 e 49,5% (Figura 2). Na segunda extração os extratos aquosos das amostras do genótipo Kabuli apresentaram valores entre 19 e 22,8% de rendimento de extração proteica e as amostras do genótipo Desi entre 11,2 e 23,5%. As amostras BRS Toro, BRS Cícero, Gb 19-084 UPL 4, Gb 20-031 D, Gb 20-056 A e Gb 20-072 apresentaram na primeira extração aproximadamente o dobro do rendimento comparado à segunda extração, demonstrando-se melhores para procedimentos de apenas uma extração, já as amostras BRS Cristalino, BRS Aleppo, Gb 20-031 e Gb 20-074 obtiveram valores próximos entre a primeira e segunda extração.

Já na terceira extração não houve detecção de proteínas nos extratos, indicando que os dois primeiros ciclos foram suficientes para a extração da fração de proteínas solúveis em água (Figura 2). Ou seja, para futuras análises a adoção de apenas duas extrações podem ser consideradas suficientes, nas condições adotadas neste trabalho.

De maneira geral, estes percentuais de solubilidade estão acima do esperado se apenas a fração solúvel em água (albumina) for a considerada, visto que leguminosas apresentam concentrações de albuminas entre suas frações proteicas que se aproximam de 20% (Yust *et al.*, 2010; Kou *et al.*, 2013; Tavano *et al.*, 2008). Isso deve, provavelmente, à solubilização de globulinas das amostras. As globulinas são a fração proteica majoritária nos grãos e o método de extração aqui utilizado pode ter colaborado para a solubilização de parte dessa fração. Uma possível hipótese para a captação de globulinas nos extratos aquosos pode ser a solubilização de outras substâncias solúveis em água e presentes nas farinhas das amostras, como minerais, e que, possivelmente, alteraram a força iônica do meio e facilitaram a solubilidade dessa fração.

Liu *et al.* (2008) observaram a mesma característica em sua análise de métodos de extração das frações proteicas albuminas e globulinas de variedades de grão de bico por soluções contendo  $K_2SO_4$ , NaCl e extração com água destilada. Esses autores obtiveram rendimentos de extração em água destilada da ordem de 5,2% a 21% das globulinas totais do grão, dependendo da variedade de grão de bico analisada. Eles concluíram que a possível composição e conteúdo mineral de

diferentes cultivares podem contribuir para diferentes extrações de proteínas em água, o que explicaria porque não apenas albumina, mas também globulinas foram extraídas.

A composição dos extratos proteicos é de importante conhecimento, pois diferenças na estrutura primária das frações poderão oferecer diferentes quantidades e proporções de aminoácidos. A fração proteica albumina do grão de bico, por exemplo, contém uma maior concentração de aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) em comparação com a fração proteica globulina (Tavano *et al.*, 2008). Liu *et al.* (2008), em extratos aquosos de grão de bico, também encontraram o dobro de aminoácidos sulfurados na fração albumina em comparação com a fração globulina.

Desta forma, uma composição proteica com maior concentração de globulinas no material pode contribuir para um produto com menor teor de sulfurados. Esta característica pode ser positiva ou negativa, a depender do objetivo do consumo proteico e em que faixa etária. Estudos sobre a restrição de metionina, por exemplo, vêm sendo relacionados à promoção da longevidade humana. Uma explicação seria dada pela associação da supressão do eixo somatotrófico GH/IGF-1, modulação da atividade mitocondrial e aumento dos níveis de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) (Miller, *et al.*, 2005; Orgeron *et al.*, 2014; Hine *et al.*, 2015). Barcena *et al.* (2018) em sua pesquisa com ratos expostos a dietas com restrição de metionina, observaram melhora no perfil lipídico, melhoras nos mecanismos de reparação de DNA e de processos inflamatórios, características promotoras de longevidade.

Outra característica a se observar, quando se trata da proporção das frações proteicas na proteína extraída, refere-se ao potencial de liberação de peptídeos bioativos. Quintero-Soto *et al.* (2021) analisando a atividade antioxidante e antidiabética de frações albumina e globulina de grão de bico hidrolisadas, ambas com uso de alcalase, observaram maior atividade antioxidante e inibidora das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase pelo hidrolisado de albuminas do que pelo hidrolisado de globulinas, associando esse resultado ao maior número de peptídeos e aminoácidos antioxidantes (fenilalanina, histidina, triptofano e prolina) encontrados no hidrolisado de albuminas, onde os peptídeos FEI, FEL, FIE, FKN, FGKG e MEE obtidos da fração de albuminas de grão de bico do genótipo ICC3761 apresentaram destaque na atividade antioxidante e inibição de enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos ( $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase) e diabetes tipo 2 (DPP4).

Torres-Fuentes *et al.* (2015) em seu estudo de identificação e caracterização de peptídeos antioxidantes obtidos de proteínas de grão de bico, observaram em peptídeos da globulina de grão de bico atividade antioxidante e de proteção das células Caco-2 expostas a agentes oxidantes, destacando os peptídeos ALEPDHR, TETWNPNHPEL, FVPH e SAEHGSLH com maior atividade. Embora muitos estudos abordem peptídeos liberados após hidrólise controlada com uso de proteases, o próprio grão, naturalmente, pode conter peptídeos de interesse. Exemplo disso é a concentração de  $\alpha$ -amino grupos nos extratos aquosos (Tabela 4), indicador da presença não só de proteínas, mas de peptídeos e aminoácidos livres liberados da proteína total do grão.

Tabela 4 –  $\alpha$ -amino grupos livres nos extratos aquosos a partir de diferentes amostras de grão de bico (*Cicer arietinum* L.).

Amostras		$\mu\text{mol}$ de $\alpha$ -amino grupos/g de amostra	$\mu\text{mol}$ de $\alpha$ -amino grupos/g de proteína solubilizada
Cultivar	Tipo		
BRS Cristalino	Kabuli	186,99 $\pm$ 4,41 <sup>a</sup>	1508,29 $\pm$ 25,80 <sup>a,b</sup>
BRS Toro	Kabuli	161,16 $\pm$ 2,41 <sup>b,c</sup>	1117,88 $\pm$ 16,75 <sup>f</sup>
BRS Aleppo	Kabuli	133,65 $\pm$ 5,31 <sup>d,e</sup>	1057,85 $\pm$ 72,72 <sup>f</sup>
BRS Cícero	Kabuli	139,71 $\pm$ 12,32 <sup>d</sup>	1135,50 $\pm$ 42,80 <sup>e,f</sup>
Linhagens	Tipo		
Gb 19-084 UPL 4	Desi	120,86 $\pm$ 2,19 <sup>e</sup>	1194,34 $\pm$ 86,12 <sup>d,e,f</sup>
Gb 20-031 D	Desi	146,43 $\pm$ 5,69 <sup>c,d</sup>	1277,90 $\pm$ 36,37 <sup>c,d,e</sup>
Gb 20-031	Desi	161,99 $\pm$ 0,70 <sup>b,c</sup>	1520,63 $\pm$ 25,11 <sup>a</sup>
Gb 20-056 A	Desi	166,61 $\pm$ 4,01 <sup>b</sup>	1330,58 $\pm$ 30,56 <sup>c,d</sup>
Gb 20-072	Desi	177,44 $\pm$ 1,99 <sup>a,b</sup>	1364,43 $\pm$ 23,48 <sup>b,c</sup>
Gb 20-074	Desi	169,69 $\pm$ 10,91 <sup>a,b</sup>	1339,07 $\pm$ 91,53 <sup>c,d</sup>

Fonte: Autor (2022).

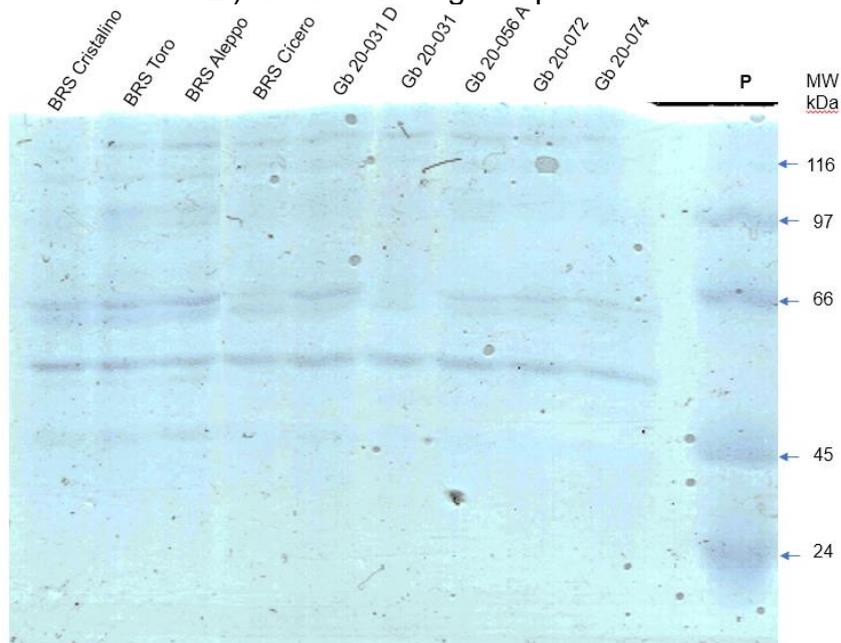
Nota: Resultados apresentam médias  $\pm$  desvio padrão, de três determinações. Valores em mesma coluna contendo letras iguais sobrescritas não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey's ( $p < 0,05$ ).

Observou-se que a linhagem Gb 19-084 UPL 4 (Desi) apresentou a menor quantidade de  $\mu\text{mol}$  de  $\alpha$ -amino grupos solubilizados em seu extrato aquoso,

diferindo dos demais grãos, indicando que este grão apresentava seu material proteico menos fragmentado (Tabela 4). Em contrapartida, o cultivar BRS Cristalino (Kabuli) apresentou a maior concentração de  $\mu\text{mol}$  de  $\alpha$ -amino grupos solubilizados, indicando conteúdo proteico previamente mais fragmentado em comparação às outras amostras.

Embora os resultados da Tabela 4 indiquem diferenças significativas na composição de  $\alpha$ -amino grupos entre amostras, a análise eletroforética do conteúdo proteico dos hidrolisados (Figura 3) não indica grande diferença no perfil do peso molecular dos principais componentes proteicos. Como exemplo, observa-se significativa diferença no conteúdo de  $\alpha$ -amino grupos entre os extratos das amostras BRS Cristalino e BRS Aleppo (Tabela 4), mas o perfil eletroforético relativo a essas amostras apresenta grande semelhança. Assim, as diferenças expressas na Tabela 4 seriam mais devidas a presença de aminoácidos e peptídeos de baixo peso molecular livres, do que a uma significativa diferença de conteúdo de frações proteicas. Importante destacar que um gel de eletroforese de 12% de poliacrilamida, como aqui utilizado, não seria capaz de manter pequenos peptídeos entre as bandas visualizáveis, possibilitando visualizar apenas as bandas correspondentes a cadeias proteicas dos extratos.

Figura 3 - Perfil eletroforético dos extratos aquosos das amostras de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) de diferentes genótipos.



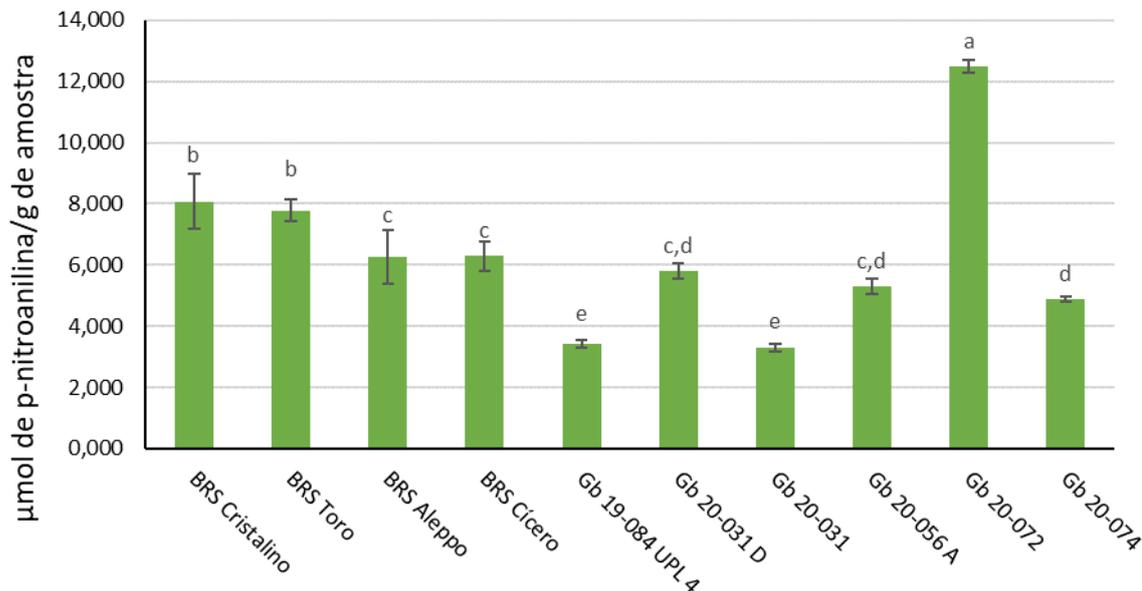
Fonte: Autor (2022).

Nota: Linha: P – marcador de peso molecular.

O perfil eletroforético dos extratos aquosos (Figura 3) apresentou uma linha expressiva na margem entre 45 e 66 kDa, demonstrando que maior parte do conteúdo proteico se encontra com o peso molecular dentro dessa faixa. Essa característica apresentada na eletroforese condiz com o resultado encontrado na literatura, como apresentado por Ferreira *et al.* (2019) que observaram bandas intensas no perfil eletroforético de amostras de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) entre 49 e 62 kDa, coerente com o fato de a fração globulina (com peso molecular entre 43 e 53 kDa) ser a majoritária nas leguminosas.

Outra característica do material proteico analisado nos extratos aquosos foi a presença de atividade de protease. Os extratos aquosos das amostras apresentaram essa atividade, sendo a linhagem Gb 20-072 (Desi) a que apresentou maior atividade e as linhagens Gb 19-084 UPL 4 e Gb 20-031 ambas do genótipo Desi as com menor atividade (Figura 4).

Figura 4 - Atividade de protease presente no material solúvel em água de amostras de grão de bico (*Cicer arietinum* L.), a partir de 1 grama de grãos e considerando-se BAPNA como substrato.



Fonte: Autor (2022).

Nota: Dados expressos como µmol de p-nitroanilina liberados/minuto/g de grãos. Resultados apresentam médias de três determinações. Letras iguais não apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

A presença de proteases nos extratos aquosos pode indicar o potencial para hidrólise de proteínas dos grãos a partir de seu próprio conteúdo. Ou seja, durante o

processo de produção da farinha e posterior contato desta com a água para extração, a liberação de proteases contidas nos grãos, promovida pela trituração, associada à presença de água, favoreceu a proteólise e solubilização de conteúdo proteico na forma de peptídeos e aminoácidos livres. Processo semelhante, inclusive, provocado pelo natural processo de germinação dos grãos (Bueno *et al.*, 2020). Essa ação de endo proteases pode influenciar características tecno funcionais, como a citada, ou seja, maior solubilização de material proteico, representado por peptídeos solúveis (Xu *et al.* 2021).

Outra característica observada entre as proteínas solubilizadas é a presença de inibidores de tripsina (Tabela 5).

Tabela 5 – Atividade de Inibição de tripsina entre os componentes solúveis em água das diferentes amostras de grão de bico (*Cicer arietinum* L.).

(continua)

Amostras		UIT*/g de amostra (farinha do grão)	UIT*/g de proteína do grão	UIT*/g de proteína solubilizada
Cultivar	Tipo			
BRS Cristalino	Kabuli	15013,23 ± 231,55 <sup>c,d</sup>	64936,13 ± 1001,52 <sup>e,f</sup>	93369,60 ± 7472,17 <sup>c,d,e</sup>
BRS Toro	Kabuli	13714,29 ± 147,16 <sup>d</sup>	63492,06 ± 681,32 <sup>e,f</sup>	82539,43 ± 2704,41 <sup>e</sup>
BRS Aleppo	Kabuli	13938,40 ± 688,82 <sup>d</sup>	58811,82 ± 2906,43 <sup>f</sup>	88535,08 ± 6212,83 <sup>d,e</sup>
BRS Cícero	Kabuli	17123,45 ± 338,93 <sup>a</sup>	106489,10 ± 2107,81 <sup>a</sup>	99357,06 ± 2614,87 <sup>b,c,d</sup>
Linhasgens	Tipo			
Gb 19-084 UPL 4	Desi	17754,54 ± 528,10 <sup>a</sup>	95300,80 ± 2834,68 <sup>b</sup>	117439,15 ± 8702,49 <sup>a</sup>
Gb 20-031 D	Desi	16661,47 ± 1045,08 <sup>a,b</sup>	78964,32 ± 4953,00 <sup>c</sup>	102396,39 ± 1726,09 <sup>a,b,c,d</sup>
Gb 20-031	Desi	17038,66 ± 198,54 <sup>a</sup>	80219,70 ± 934,76 <sup>c</sup>	101775,42 ± 9591,21 <sup>a,b,c,d</sup>
Gb 20-056 A	Desi	17464,52 ± 444,70 <sup>a</sup>	82147,34 ± 2091,73 <sup>c</sup>	108016,56 ± 2786,91 <sup>a,b,c</sup>
Gb 20-072	Desi	16558,21 ± 215,60 <sup>a,b,c</sup>	75955,10 ± 989,00 <sup>c,d</sup>	105013,19 ± 2249,38 <sup>a,b,c,d</sup>

Tabela 5 – Atividade de Inibição de tripsina entre os componentes solúveis em água das diferentes amostras de grão de bico (*Cicer arietinum* L.).  
(conclusão)

Amostras		UIT*/g de amostra (farinha do grão)	UIT*/g de proteína do grão	UIT*/g de proteína solubilizada
Linhagens	Tipo			
Gb 20-074	Desi	15243,75 ± 848,99 <sup>b,c,d</sup>	68882,75 ± 3836,39 <sup>d,e</sup>	112093,75 ± 5874,09 <sup>a,b</sup>

Fonte: Autor (2022).

Nota: \*Unidade de inibição de tripsina. Resultados apresentam médias ± desvio padrão, de três determinações. Valores em mesma coluna contendo letras iguais sobrescritas não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey's ( $p < 0,05$ ).

A atividade de inibição de tripsina por grama de farinha, de modo geral, foi maior no tipo Desi, destacando-se as linhagens Gb 20-031 D, Gb 20-031, Gb 20-056 A e Gb 20-072 (Tabela 5). Também em termos de g de extrato, o destaque foi para amostras da linhagem Desi (Gb 20-072 e Gb 20-074). Considerando a atividade inibitória de tripsina por g de proteína nas farinhas e no extrato aquoso (proteína solubilizada), a linhagem Desi também apresentou valores maiores. Por g de proteína da farinha, destacam-se as amostras Gb 19-084 UPL 4, Gb 20-031 D, Gb 20-031, Gb 20-056 A e Gb 20-072; e por g de proteína solubilizada, igualmente, as maiores atividades de inibição de tripsina são da linhagem Desi (Gb 19-084 UPL 4 e Gb 20-074) (Tabela 5).

Quando analisado a atividade inibidora de tripsina por grama de proteína tanto do grão como do extrato aquoso (Tabela 5), observa-se concentrações maiores de componentes com essa atividade dentre as proteínas solubilizadas. Isto se deve ao fato de que dentre os inibidores de tripsina presentes nas leguminosas os principais são os do tipo Bowman-Birk, que são proteínas que apresentam característica de baixo peso molecular e solubilidade em meio aquoso devido ao arranjo dos aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos presentes nos inibidores Bowman-Birk (Losso, 2008).

Portanto, nos extratos aquosos pôde-se observar que há uma extração relevante desses inibidores de tripsina, conferindo assim aos extratos, por um lado, características antinutricionais e, por outro, nutracêutica. Idate *et al.* (2021) descreveram em seu trabalho que os inibidores de proteases são conhecidos pela capacidade de bloquear a ação de enzimas proteolíticas podendo levar a

dificuldades no processo digestivo, mas por outro lado, podem, a exemplo dos inibidores tipo Bowman-Birk, serem interessantes na prevenção e tratamento de alguns tipos de câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, atrofia muscular e processos inflamatórios (Clemente; Domoney, 2007; Oliva *et al.*, 2011).

### 5.2.2 Solubilização de componentes fenólicos

Os resultados de solubilização aquosa dos fenólicos totais são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Fenólicos totais solúveis em água a partir de diferentes amostras de grão de bico (*Cicer arietinum* L.).

Amostras		Fenólicos totais solúveis (mg equivalente de ácido gálico/g de amostra)		Proporção do peso de cascas nos grãos íntegros (%)	% de Fenólicos totais solúveis advindos das cascas
Cultivar	Tipos	Grão integral	Casca		
BRS Cristalino	Kabuli	2,66 ± 0,06 <sup>c,d,e</sup>	0,87 ± 0,01 <sup>e</sup>	5,41	1,8
BRS Toro	Kabuli	2,80 ± 0,01 <sup>b,c</sup>	0,86 ± 0,01 <sup>e</sup>	4,87	1,5
BRS Aleppo	Kabuli	2,62 ± 0,04 <sup>d,e</sup>	0,71 ± 0,01 <sup>e</sup>	4,47	1,2
BRS Cícero	Kabuli	2,52 ± 0,02 <sup>e</sup>	0,47 ± 0,02 <sup>e</sup>	5,24	1,0
Linhagens	Tipos				
Gb 19-084 UPL 4	Desi	2,56 ± 0,03 <sup>e</sup>	4,07 ± 0,22 <sup>d</sup>	10,47	16,7
Gb 20-031 D	Desi	2,91 ± 0,06 <sup>a,b</sup>	9,37 ± 0,11 <sup>c</sup>	7,91	25,4
Gb 20-031	Desi	2,64 ± 0,03 <sup>d,e</sup>	9,36 ± 0,11 <sup>c</sup>	8,07	28,6
Gb 20-056 A	Desi	3,04 ± 0,04 <sup>a</sup>	11,02 ± 0,16 <sup>a</sup>	9,21	33,3
Gb 20-072	Desi	2,99 ± 0,00 <sup>a</sup>	9,47 ± 0,29 <sup>c</sup>	7,45	23,6
Gb 20-074	Desi	2,70 ± 0,11 <sup>c,d</sup>	10,28 ± 0,13 <sup>b</sup>	8,35	31,8

Fonte: Autor (2022).

Nota: Resultados apresentam médias ± desvio padrão, de três determinações. Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As amostras apresentaram quantidades de componentes fenólicos totais solúveis do grão bastante próximas (Tabela 6), com destaque para maiores valores nas amostras Gb 20-056 A e Gb 20-072 da linhagem Desi. Se considerada apenas a casca, todos os grãos da linhagem Desi se mostraram superiores em conteúdo de fenólicos totais solúveis. As cascas das amostras dessa linhagem contribuem muito mais em termos de fenólicos totais solúveis dos grãos, do que as da linhagem Kabuli (16,7% a 31,8% e 1% a 1,8%, respectivamente).

Os resultados não apontam para uma grande diferença em conteúdo de fenólicos totais nos extratos aquosos dos grãos entre as amostras de coloração creme (Kabuli) e marrom (Desi). Porém, quando os resultados das cascas são considerados isoladamente, observam-se valores bastante diferentes entre as amostras claras e escuras, com estas últimas apresentando valores até dez vezes maiores do que os encontrados para os grãos do tipo Kabuli.

Foi realizada uma análise de correlação (Tabela 7) com a quantidade de fenólicos totais dos extratos dos grãos íntegros e dos extratos das cascas com os valores dos índices de colorimetria (item 5.1.1).

Tabela 7 – Coeficientes de correlação entre valores de fenólicos totais dos grãos íntegros e índices de colorimetria das amostras de grãos de bico (*Cicer arietinum* L.).

Métodos correlacionados	Coeficientes de correlação (r)
Luminosidade/Fenólicos totais dos grãos	-0,3116 ( $p = 0,38072$ )
Índice a/Fenólicos totais dos grãos	0,5419 ( $p = 0,10561$ )
Índice b/Fenólicos totais dos grãos	0,2494 ( $p = 0,48709$ )
Tom/Fenólicos totais dos grãos	-0,4159 ( $p = 0,2319$ )
Croma/Fenólicos totais dos grãos	0,4702 ( $p = 0,17031$ )
Luminosidade/Fenólicos totais das cascas	-0,6614 ( $p = 0,03729$ )*
Índice a/Fenólicos totais das cascas	0,8386 ( $p = 0,0024$ )*
Índice b/Fenólicos totais das cascas	0,0391 ( $p = 0,91464$ )
Tom/Fenólicos totais das cascas	-0,7708 ( $p = 0,009055$ )*
Croma/Fenólicos totais das cascas	0,484 ( $p = 0,1563$ )

Fonte: Autor (2022).

Nota: \*As correlações marcadas (r) são significativas ( $p < 0,05$ ).

Foi observado que não há correlação entre os valores de fenólicos totais encontrados nos extratos aquosos dos grãos íntegros e os índices de colorimetria encontrados nas amostras (Tabela 7). Porém, quando consideradas apenas as cascas há correlação com os valores dos índices de luminosidade, eixo “a” e tom. Isso demonstra que quanto mais escuro e próximo da cor vermelha é a cor da casca do grão, maior é a concentração de fenólicos totais presentes. Outros estudos confirmam esses resultados, demonstrando que para diferentes leguminosas, as sementes mais pigmentadas tendem a conter níveis mais altos de compostos fenólicos, como antocianinas (Choung *et al.*, 2003; Dueñas *et al.*, 2006).

Quando os flavonoides totais solúveis foram determinados (Tabela 8), seguiu-se a mesma característica apresentada para os resultados da análise da solubilização de fenólicos totais. Os extratos aquosos dos grãos íntegros dos tipos Kabuli e Desi não apresentaram diferenças entre si nas concentrações de flavonoides totais, mas sim entre as amostras. Sendo as amostras BRS Cristalino (Kabuli), Gb 20-072 (Desi), Gb 20-056 A (Desi) e BRS Toro (Kabuli) as com maior concentração de flavonoides (sem diferença entre si) e a variedade Gb 20-031 (Desi) com menor concentração (Tabela 8).

Tabela 8 – Flavonoides totais solúveis em água a partir de diferentes amostras de grão de bico (*Cicer arietinum* L.).

Amostras		Flavonoides totais solúveis (mg equivalente de catequinas/g de amostra)		Proporção do peso de cascas nos grãos íntegros (%)	% de flavonoides totais solúveis advindos das cascas
Cultivar	Tipos	Grão integral	Casca		
BRS Cristalino	Kabuli	1,27 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,15 <sup>e</sup>	5,41	3,4
BRS Toro	Kabuli	1,16 ± 0,03 <sup>a,b</sup>	0,60 ± 0,08 <sup>e</sup>	4,87	2,5
BRS Aleppo	Kabuli	0,89 ± 0,05 <sup>c,d</sup>	0,44 ± 0,02 <sup>e</sup>	4,47	2,2
BRS Cícero	Kabuli	0,88 ± 0,04 <sup>c,d</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>e</sup>	5,24	2,0
<b>Linhagens</b>	<b>Tipos</b>				
Gb 19-084 UPL 4	Desi	0,79 ± 0,09 <sup>d,e</sup>	2,48 ± 0,05 <sup>d</sup>	10,47	33,1
Gb 20-031 D	Desi	1,13 ± 0,03 <sup>b</sup>	5,90 ± 0,23 <sup>c</sup>	7,91	41,4

(continua)

Tabela 8 – Flavonoides totais solúveis em água a partir de diferentes amostras de grão de bico (*Cicer arietinum* L.).

Amostras		Flavonoides totais solúveis (mg equivalente de catequinas/g de amostra)		Proporção do peso de cascas nos grãos íntegros (%)	(conclusão) % de flavonoides totais solúveis advindos das cascas
Linhagens	Tipos	Grão integral	Casca		
Gb 20-031	Desi	0,71 ± 0,05 <sup>e</sup>	6,20 ± 0,22 <sup>c</sup>	8,07	70,2
Gb 20-056 A	Desi	1,16 ± 0,00 <sup>a,b</sup>	7,78 ± 0,36 <sup>a</sup>	9,21	61,6
Gb 20-072	Desi	1,28 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,76 ± 0,16 <sup>b</sup>	7,45	39,4
Gb 20-074	Desi	0,97 ± 0,02 <sup>c</sup>	6,25 ± 0,24 <sup>b,c</sup>	8,35	53,9

Fonte: Autor (2022).

Nota: Resultados apresentam médias ± desvio padrão, de três determinações. Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os valores das concentrações de flavonoides totais dos extratos aquosos das cascas apresentaram a mesma característica dos resultados de fenólicos totais solúveis, onde houve diferença entre as linhagens, sendo a maioria das amostras do genótipo Desi com maior concentração de flavonoides totais solúveis. Destaque para a amostra Gb 20-056 A (Desi) com maior concentração e diferença das demais.

Assim como nos fenólicos, uma análise de correlação dos valores de flavonoides totais solúveis presente nos extratos aquosos dos grãos íntegros e o percentual de flavonoides solúveis presentes nas cascas não mostrou correlação ( $r = -0,1928$ ;  $p = 0,5936$ ).

Sobre o percentual de flavonoides totais solúveis nos extratos aquosos dos grãos íntegros, que correspondem aos presentes nas cascas, a mesma característica apresentada nos fenólicos totais solúveis foi observada, tendo a linhagem Desi entre 33,1% e 70,2% e a linhagem Kabuli entre 2,0% e 3,4%. Porém, essa concentração também não altera proporcionalmente as concentrações dos flavonoides totais detectados nos extratos aquosos dos grãos íntegros, fato que pode estar relacionado também as condições de extrações apresentadas anteriormente.

Da mesma forma como apresentado na Tabela 7 foi realizado uma análise de correlação (Tabela 9) com os valores de flavonoides totais apresentados nos

extratos dos grãos íntegros, nos extratos das cascas e os valores dos índices de colorimetria.

Tabela 9 – Coeficientes de correlação entre valores de flavonoides totais dos e índices de colorimetria das amostras de grãos de bico (*Cicer arietinum* L.).

Variáveis correlacionadas	Coeficientes de correlação (r)
Luminosidade/Flavonoides totais dos grãos	0,0043 ( $p = 0,99052$ )
Índice a/Flavonoides totais dos grãos	0,1191 ( $p = 0,74305$ )
Índice b/Flavonoides totais dos grãos	0,2371 ( $p = 0,50953$ )
Tom/Flavonoides totais dos grãos	-0,0496 ( $p = 0,89175$ )
Croma/Flavonoides totais dos grãos	0,2292 ( $p = 0,5240$ )
Luminosidade/Flavonoides totais das cascas	-0,6653 ( $p = 0,0357$ )*
Índice a/Flavonoides totais das cascas	0,8219 ( $p = 0,00352$ )*
Índice b/Flavonoides totais das cascas	0,0275 ( $p = 0,9399$ )
Tom/Flavonoides totais das cascas	-0,7678 ( $p = 0,0095$ )*
Croma/Flavonoides totais das cascas	0,4667 ( $p = 0,1739$ )

Fonte: Autor (2022).

Nota: \*Correlações significativas ( $p < 0,05$ ).

O resultado encontrado foi similar ao observado na análise de correlação de fenólicos totais e os dados de colorimetria, sendo que não há correlação entre os valores de flavonoides totais dos extratos aquosos dos grãos íntegros e os índices de colorimetria encontrados. Porém, da mesma forma que os fenólicos totais solúveis, quando analisados os valores de flavonoides totais presentes nos extratos das cascas, há correlação com os valores dos índices de luminosidade, eixo “a” e tom. O que demonstra que quanto mais escuro e próximo da cor vermelha é a cor da casca do grão, maior é a concentração de flavonoides totais presentes.

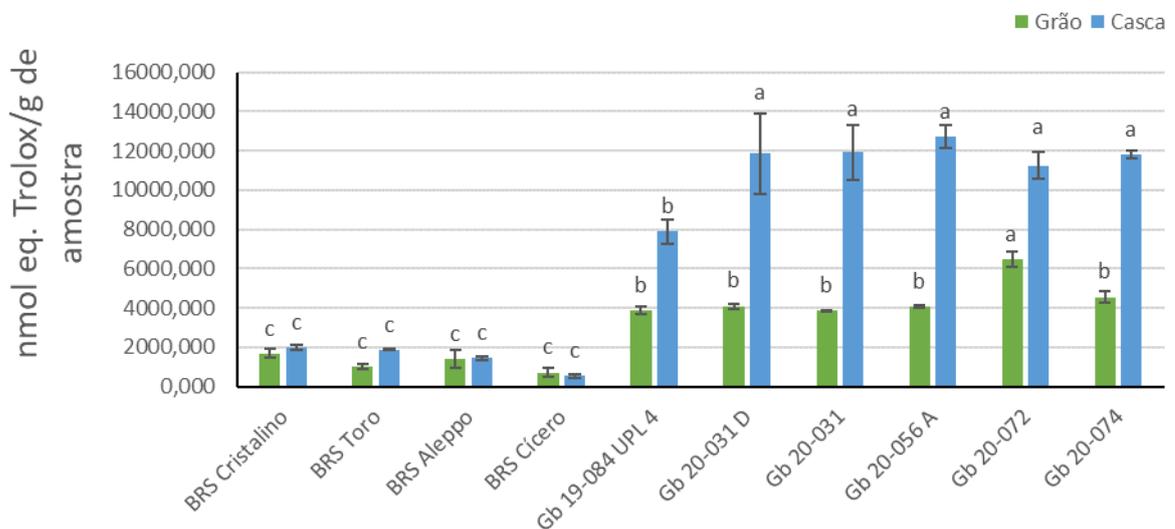
Segev *et al.* (2010) em seu trabalho de análise de determinação de polifenóis, flavonoides e atividade antioxidante de variedades de grão de bico de cores diferentes, constatou a mesma característica, observando que as sementes mais escuras, amarelas e com alta intensidade de cor contêm mais fenólicos totais,

flavonoides totais e maior atividade antioxidante do que as sementes de cor mais clara.

### 5.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS COMPONENTES SOLÚVEIS DOS DIFERENTES GRÃOS

Após a análise da atividade antioxidante pelo método DPPH (Figura 5) observou-se que há atividade antioxidante em todos os extratos aquosos das amostras. As amostras Desi apresentaram os maiores valores, tanto para os extratos dos grãos íntegros como para os extratos das cascas, sendo a amostra Gb 20-072 a com maior atividade no extrato do grão inteiro. Os extratos das amostras Kabuli apresentaram os menores valores, sem diferença entre eles, mas diferentes das amostras Desi.

Figura 5 - Atividade antioxidante dos extratos aquosos dos grãos íntegros e das cascas das amostras de grãos de bico (*Cicer arietinum* L.) de genótipos diferentes expressos em nmol equivalente de Trolox/g de amostra realizado pelo método DPPH.



Fonte: Autor (2022).

Nota: Resultados apresentam médias de três determinações. Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

São várias as substâncias encontradas na composição química do grão de bico com potencial de atividade antioxidante, entre elas o material proteico (proteínas, peptídeos e aminoácidos), os ácidos fenólicos e os flavonoides (Matsui *et al.*, 2018; Soto *et al.*, 2021; Jameel *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2019). Desta forma foi

feita a análise de correlação dos valores de atividade antioxidante encontrados nos extratos aquosos e os valores de proteínas solúveis,  $\alpha$ -amino grupos solúveis, fenólicos totais solúveis e flavonoides totais solúveis nos extratos aquosos dos grãos íntegros e das cascas (Tabela 10).

Tabela 10 – Coeficientes de correlação entre valores de atividade antioxidante obtidos com método DPPH e componentes solúveis das amostras de grãos de bico (*Cicer arietinum* L.).

Variáveis correlacionadas	Coeficientes de correlação (r)
Atividade Antioxidante/Proteínas totais solubilizadas	-0,2889 ( $p = 0,4182$ )
Atividade Antioxidante / $\alpha$ -amino grupos	0,2614 ( $p = 0,4656$ )
Atividade Antioxidante /Fenólicos totais dos grãos	0,5573 ( $p = 0,09422$ )
Atividade Antioxidante das cascas/Fenólicos totais das cascas	0,9838 ( $p = 2,9314E-07$ )*
Atividade Antioxidante /Flavonoides totais dos grãos	0,1491 ( $p = 0,6809$ )
Atividade Antioxidante das cascas/Flavonoides totais das cascas	0,9735 ( $p = 2,0969E-06$ )*

Fonte: Autor (2022).

Nota: \*Correlações significativas ( $p < 0,05$ ).

O resultado obtido entre os valores de proteínas totais solubilizadas e os valores de  $\mu\text{mol}$  de  $\alpha$ -amino grupos presentes nos extratos, em ambas as análises, é que não há correlação. Desta forma, o teor de proteína ou quão fragmentado é seu material proteico não apresentou relevância na atividade antioxidante dos extratos aquosos.

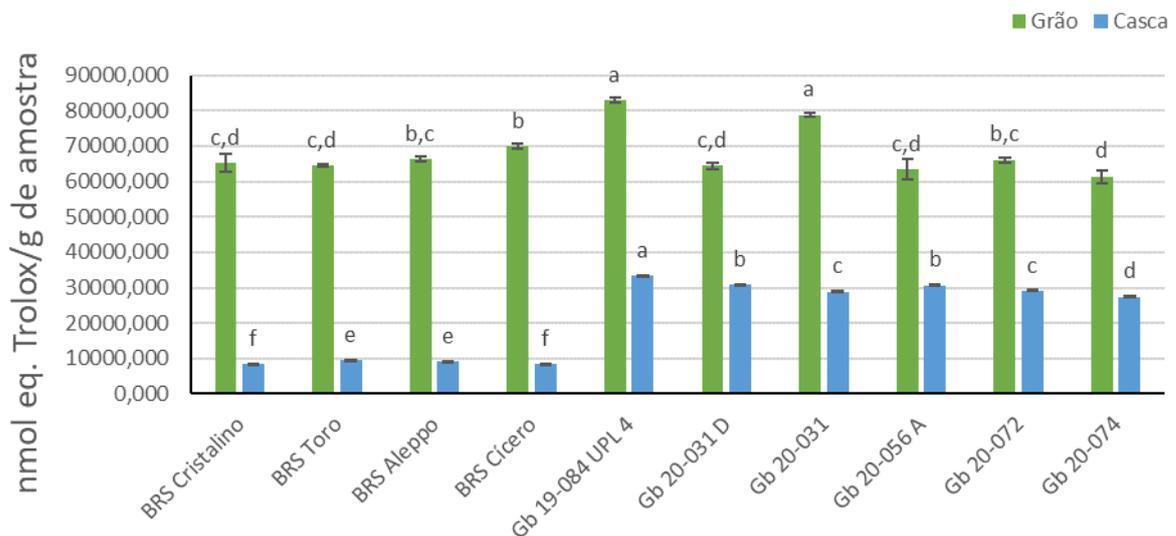
O resultado da correlação entre o teor de fenólicos totais solúveis presentes nos extratos dos grãos íntegros não apresentou correlação com a atividade antioxidante, porém nos extratos das cascas se obteve uma forte correlação.

Outra análise realizada de correlação foi a da atividade antioxidante e as concentrações de flavonoides totais presentes nos extratos dos grãos íntegros e das cascas, o resultado obtido foi similar aos apresentados nas concentrações de fenólicos totais, sendo os extratos dos grãos íntegros sem correlação, porém os extratos das cascas apresentaram forte correlação com a atividade antioxidante.

Desta forma, como o percentual de cascas do grão é pequeno em relação aos outros componentes, a atividade antioxidante dos extratos dos grãos íntegros sofre pouca influência dos fenólicos totais e flavonoides totais presentes nas cascas, porém essas substâncias presentes nas cascas têm forte correlação com a atividade antioxidante quando presente em maiores concentrações.

Outro método realizado para analisar a atividade antioxidante dos extratos aquosos das amostras foi com uso do reagente ABTS+ (Figura 6).

Figura 6 - Atividade antioxidante dos extratos aquosos dos grãos íntegros e das cascas das amostras de grãos de bico (*Cicer arietinum* L.) de genótipos diferentes expressos em nmol equivalente de Trolox/g de amostra realizado pelo método ABTS.



Fonte: Autor (2022).

Nota: Resultados apresentam médias de três determinações. Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A partir deste método foi observado um padrão de resultados próximo ao obtido com o uso do DPPH, quando analisado os extratos aquosos das cascas. Porém, quando analisados os resultados referentes aos extratos dos grãos íntegros, não houve uma diferença entre os tipos Kabuli e Desi, mas apenas entre algumas amostras. Desatacando-se as amostras Gb 19-084 UPL 4 e Gb 20-031 D com os maiores resultados. Importante notar que a Gb19-084 UPL 4 apresentou a maior atividade antioxidante tanto para o extrato do grão íntegro, quanto para o da casca.

Essa diferença de resultados entre os métodos pode ser explicada pela diferente reatividade dos reagentes DPPH e ABTS+ com compostos antioxidantes presentes nos extratos. Como descrevem Quintero-Soto *et al.* (2018), a

neutralização de radicais livres por fenólicos de grão de bico, quando medida usando DPPH se baseia na transferência de átomos de hidrogênio.

Assim como feito anteriormente com os valores obtidos usando DPPH, foi feita análise de correlação dos valores obtidos com o uso do ABTS+ com os valores de proteínas solúveis,  $\alpha$ -amino grupos presentes nos extratos aquosos, fenólicos totais solúveis e flavonoides totais solúveis presentes nos extratos aquosos dos grãos íntegros e das cascas (Tabela 11).

Tabela 11 – Coeficientes de correlação entre valores de atividade antioxidante obtidos método ABTS+ e componentes solúveis das amostras de grãos de bico (*Cicer arietinum* L.).

Variáveis correlacionadas	Coeficientes de correlação (r)
Atividade Antioxidante /Proteínas totais solubilizadas	-0,7476 ( $p = 0,0129$ )*
Atividade Antioxidante / $\alpha$ -amino grupos	-0,5331 ( $p = 0,1126$ )
Atividade Antioxidante /Fenólicos totais dos grãos	-0,5399 ( $p = 0,10723$ )
Atividade Antioxidante das cascas/Fenólicos totais das cascas	0,8654 ( $p = 0,0012$ )*
Atividade Antioxidante /Flavonoides totais dos grãos	-0,7218 ( $p = 0,0184$ )*
Atividade Antioxidante das cascas/Flavonoides totais das cascas	0,8493 ( $p = 0,0019$ )*

Fonte: Autor (2022).

Nota: \*Correlações significativas ( $p < 0,05$ ).

Desta forma, a atividade antioxidante, medida tanto com uso de DPPH, quanto ABTS, não apresenta correlação com o material proteico dos extratos (Tabela 11).

Quanto ao teor de fenólicos totais presentes nos extratos dos grãos íntegros e das cascas e sua correlação com a atividade antioxidante, medida com uso de ABTS, os resultados mostram forte e direta correlação para fenólicos totais presentes nas cascas, mas sem correlação com esse conteúdo a partir dos grãos íntegros (Tabela 11). Mesmos resultados obtidos com uso de DPPH (Tabela 10).

A correlação entre atividade antioxidante, pelo método ABTS, e a concentração de flavonoides totais nos extratos dos grãos íntegros e das cascas, se

mostrou forte e inversa com relação aos grãos e forte e direta com relação às cascas (Tabela 11).

Assim, a elaboração de alimentos a partir de extratos aquosos de grão de bico tem o potencial de produzir bebidas de interesse nutracêutico.

Recomendações de consumo de proteínas são encontradas na literatura como é o caso das *Dietary protein quality evaluation in human nutrition* (FAO, 2013) e as *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids* (IOM, 2005). Porém, recomendações de consumo de substâncias bioativas, particularmente, fenólicos totais, ainda não estão bem estabelecidas. Como descrevem Kapolou *et al.* (2021), a bioacessibilidade e biodisponibilidade dos polifenóis depende de vários parâmetros, desde a estrutura do alimento, variação genética e interações com outros componentes na refeição. Além disso, a absorção dessas substâncias no intestino delgado é de aproximadamente 50%, dependendo da subcategoria do polifenol (Kapolou *et al.* 2021).

Há evidências de consumo de polifenóis e efeitos benéficos a saúde, como a descrita por Costa *et al.* (2017), em que o consumo regular de aproximadamente 1 a 2g de polifenóis por dia é associado a prevenção de DCNT.

Estudos epidemiológicos com objetivo de investigar a ingestão de polifenóis propõem o consumo de 900mg/dia. Porém, os autores ressaltam a importância de investigar os métodos de avaliação de polifenóis da dieta, os procedimentos analíticos padronizados e validados e a criação de bancos de dados de alimentos contendo as subcategorias de polifenóis, além da validação de biomarcadores específicos afetados (Del Bo *et al.*, 2019; Williamson; Holst, 2008).

## 6 CONCLUSÕES

As amostras apresentaram características de composição semelhante ao descrito na literatura, mas com a extratibilidade proteica em água acima do esperado (de 50% a 70%). Embora existam algumas diferenças significativas entre as amostras no que se refere aos parâmetros aqui analisados, também foram observadas semelhanças, especialmente em relação às características de suas proteínas.

Entre os grãos de coloração marrom, linhagem Desi, e os da linhagem Kabuli, se destacou a diferença nas concentrações de fenólicos totais e flavonoides totais presentes nos extratos aquosos das cascas dos grãos e os dados de atividade antioxidante tanto dos extratos aquosos dos grãos quanto das cascas, quando analisados pelo método DPPH. Pelo método ABTS há apenas a diferença dos extratos aquosos das cascas das amostras.

As amostras analisadas apresentaram atividade antioxidante consideradas características bioativas, o que as torna opções promissoras para a produção de alimentos de alto valor nutricional e funcional, especialmente bebidas que contenham essas substâncias solúveis em água.

## REFERÊNCIAS

- AHN, C. B. *et al.* Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. **Food. Chem.**, v. 147, p. 78-83, 2014.
- ALVARENGA, M. *et al.* **Nutrição comportamental**. 2. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2019.
- ARANTES, R. C. *et al.* Longevity in the city of São Paulo, Brazil, through the analysis of obituaries in the newspaper Jornal da Tarde (2004-2005). **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, v. 11, n.1, p. 65-80, 2008.
- AROOJ, A. *et al.* Technological, processing and nutritional aspects of chickpea (*Cicer arietinum*). **Saudi. J. Pathol. Microbiol.**, v. 6, n. 4, p. 150-155, 2021.
- ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stressa concise review. **Saudi Pharm. J.**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 22<sup>nd</sup> ed. Washington D. C: AOAC, 2023.
- BARBANA, C.; BOYE, J. I. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. **Food. Res. Int.**, v. 43, n. 6, p. 1642–1649, 2010.
- BARCENA *et al.* Methionine restriction extends lifespan in progeroid mice and alters lipid and bile acid metabolism. **Cell Rep.**, v. 24, p. 2392–2403, 2018.
- BLESA, J. *et al.* Oxidative stress and Parkinson's disease. **Front. in Neuro.**, v. 9, n. 91, 2015.
- BOATENG, J. *et al.* Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus spp. L.*). **LWT- Food Sci. and Tech.**, v. 41, p. 1541–1547, 2008.
- BUENO, D. B. *et al.* The germination of soybeans increases the water-soluble components and could generate innovations in soy-based foods. **LWT - Food Sci. and Tech.**, v. 117, p. 108599, 2020.
- CAMPOLINA, A. G. *et al.* The health transition and changes in healthy life expectancy in the elderly population: possible impacts of chronic disease prevention. **Cad. S. Publ.**, v. 29, n. 6, p. 1217-1229, 2013.
- CHANDRASEKARAN, S. *et al.* Identification and comparison of peptides from chickpea protein hydrolysates using either bromelain or gastrointestinal enzymes and their relationship with markers of type 2 diabetes and bitterness. **Nutrients**, v. 12, p. 3843, 2020.

- CHEN, P. *et al.* Reactive sites of an anticarcinogenic Bowman–Birk proteínase inhibitor are similar to other trypsin inhibitors. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 1990–1994, 1992.
- CHOUNG, M. G. *et al.* Anthocyanidin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. of Agri. and Food Chem.**, v. 51, p. 7040–7043, 2003.
- CHURCH, F. C. C. *et al.* Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. **J. of Dai. Sci.**, v. 66, p. 1219–1227, 1983.
- CID-GALLEGOS, M. S. *et al.* Modification of in vitro and in vivo antioxidant activity by consumption of cooked chickpea in a colon cancer model. **Nutr.**, v. 12, p. 2572, 2020.
- CLEMENTE, A.; DOMONEY, C. Biological significance of polymorphism in plant protease inhibitors from the Bowman–Birk class. **Curr. Prot. Pept. Sci.**, v. 7, p. 201–216, 2006.
- CLEMENTE, A.; DOMONEY, C. Therapeutic properties of legume protease inhibitors from the Bowman–Birk class. **I. Rec. Prog. in Med. Plants**, v. 20, p. 397–417 2007.
- CORTES, C. *et al.* Quality characteristics of horchata (a Spanish vegetable beverage) treated with pulsed electric fields during shelf-life. **Food Chem.**, v. 91, n. 2, p. 319–325, 2015.
- CORTEZ, A. C. L. *et al.* Aspectos gerais sobre a transição demográfica e epidemiológica da população brasileira. **Enferm. Bras.**, v. 18, n. 5, p. 700-709, 2019.
- COSTA, C. *et al.* Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. **Food Chem. Toxicol.**, v. 110, p. 286–299, 2017.
- DEL BO, C. *et al.* Systematic Review on Polyphenol Intake and Health Outcomes: Is there Sufficient Evidence to Define a Health-Promoting Polyphenol-Rich Dietary Pattern?. **Nutrients**, v. 11, p. 1355, 2019.
- del MAR YUST, M. *et al.* Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. **J. of the Sci. of Food a Agri.**, v. 92, p. 1994–2001, 2012.
- DARMADI-BLACKBERRY, I. *et al.* Legumes: the most important dietary predictor of survival in older people of different ethnicities. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.**, v. 13, n. 2, p. 217-220, 2004.
- DOMÍNGUEZ-ARISPURO, D.M. *et al.* Optimal germination condition impacts on the antioxidant activity and phenolic acids profile in pigmented desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. **J. Food Sci. Technol.**, v. 55, p. 638–647, 2018.

DUEÑAS, M. *et al.* Assessment of in vitro antioxidant capacity of the seed coat and the cotyledon of legumes in relation their phenolic contents. **Food Chem.**, v. 98, p. 95–103, 2006.

EKMEKCIOGLU, C. Nutrition and longevity - from mechanisms to uncertainties. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, p. 1–20, 2019.

FARIDY, J. C. M. *et al.* Biological activities of chickpea in human health (*Cicer arietinum* L.). A review. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 75, p. 142–153, 2020.

FERNANDEZ-OROZCO, R. *et al.* Evaluation of bioprocesses to improve the antioxidant properties of chickpeas. **Food Sci. Technol.**, v. 42, p. 885–892, 2009.

FERREIRA, C. D. *et al.* Changes in the chemical composition and bioactive compounds of chickpea (*Cicer arietinum* L.) fortified by germination. **LWT.**, v. 111, p. 363-369, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Dietary protein quality evaluation in human nutrition.** Rome: FAO, 2013.

FRANÇA, B. K. *et al.* Peroxidação lipídica obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE j. Port. de Gastr.**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.

GARZÓN-TIZNADO, J. A. *et al.* Acceptability properties and antioxidant potential of desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. **Food Nutr. Sci.**, v. 3, p. 1281, 2012.

GIORDANO, L. B.; NASCIMENTO, W. M. **Cícero: grão de bico.** Brasília: Embrapa, 2005.

GUPTA, R. K. *et al.* Health risks and benefits of chickpea (*Cicer arietinum*) consumption. **J. Agric. Food Chem.**, v. 65, p. 6-22, 2017.

HAJAM, Y. A. *et al.* Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. **Cells.**, v. 11, n. 3, p. 552, 2022.

HEIRAS-PALAZUELOS, M. J. *et al.* Technological properties, antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of pigmented chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 64, n. 1, p. 69–76, 2013.

HELENO, S. A. *et al.* Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chem.**, v. 173, p. 501-513, 2015.

HERNANDEZ, L. M. R.; MEJIA, E. G. Enzymatic Production, Bioactivity, and Bitterness of Chickpea (*Cicer arietinum*) Peptides. **Inst. of Food Tech.**, v.18, 2019.

HINE, C. *et al.* Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. **Cell**, v. 160, p. 132–144, 2015.

HIRDYANI, H. Nutritional composition of Chickpea (*Cicer arietinum*-L) and value added products - a review. **Indian J. Comm. Health**, v. 26, p. 102-106, 2014.

- HUANG, W. J.; ZHANG, X. I. A.; CHEN, W. W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. **Biom. Rep.**, n. 4, v. 5, p. 519-522, 2016.
- HUSSEIN, H. *et al.* Impact of chickpea as prebiotic, antioxidant and thickener agent of stirred bio-yoghurt. **Annals of Agri. Sci.**, v. 65, p. 49-58, 2020.
- IDATE, A. *et al.* A comprehensive review on antinutritional factors of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Pharma Innovation**, v. 10, p. 816-823, 2021.
- INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids**. Washington, DC: The National Academies Press, 2005.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz v. 1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p.27.
- JAMEEL S. *et al.* Biochemical Profiling for Antioxidant and Therapeutic Potential of Pakistani Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genetic Resource. **Front. Plant Sci.**, v. 12, p. 663623, 2021.
- JUKANTI, A. K. *et al.* Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. **Brit. J. of Nutr.**, v. 108, n. 1, p. 11–26, 2012.
- KAUR, M.; SINGH, N. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. **Food Chem.**, v. 102, p. 366–374, 2006.
- KENNEDY, A. R. *et al.* Effects of Bowman–Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. **Nutr. Cancer**, v. 43, p. 174–186, 2002.
- KIM, H. *et al.* Reduction of *Bacillus cereus* spores in sikhye, a traditional Korean rice beverage, by modified tyndallization processes with and without carbon dioxide injection. **Let. in Appl. Microb.**, v. 55, n. 3, p. 218–223, 2012.
- KISHOR, K. *et al.* Nutritional Composition of Chickpea (*Cicer arietinum*) Milk. **Int. J. of Chem. Studies**, v. 5, p. 1941-1944, 2017.
- KOU, X. *et al.* Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. **LWT – Food Sci. and Tech.**, v. 50, p. 591–598, 2013.
- LAEMMLI, U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clin. Inter. in Aging.**, v.3, p. 757-772, 2018.

- LOPES, A. C. S. *et al.* Nutritional status, anthropometry, food intake and biochemical assays in the bambuí project: a population-based study. **Rev. Min. Enferm.**, v. 12, n. 4, p. 483-493, 2008.
- LOSSO, J. N. The Biochemical and Functional Food Properties of the Bowman-Birk Inhibitor. **Crit. Rev. in Food Sci. and Nut.**, v. 48, n. 1, p. 94-118, 2008.
- MAHBUB, R. *et al.* The anti-inflammatory and antioxidant properties of chickpea hull phenolic extracts. **Food Biosci.**, v. 40, p. 100850, 2021.
- MATEMU, A. *et al.* Health Benefits of Antioxidative Peptides Derived from Legume Proteins with a High Amino Acid Score. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 316, 2021.
- MATSUI, R. *et al.* Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains. **Food Chem.**, v. 245, p. 750–755, 2018.
- MILAN-NORIS, A. *et al.* Peptides and isoflavones in gastrointestinal digests contribute to the anti-inflammatory potential of cooked or germinated Desi and Kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Food Chem.**, v. 268, p. 66–76, 2018.
- MILLER, R. A. *et al.* Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. **Aging Cell**, v. 4, p. 119–125, 2005.
- MINOLTA K. Precise color communication. Color control from perception to instrumentation. **Daisennishimachi**, Sakai, Osaka, v. 59, 1998.
- MU, W. C. *et al.* Long-term effects of dietary protein and branched-chain amino acids on metabolism and inflammation in mice. **Nutrients**, v. 10, p. 918, 2018.
- MUNE, M. A. *et al.* Investigation on antioxidant, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of Bambara bean protein hydrolysates. **Food Chem.**, v. 250, p. 162-169, 2018.
- NASCIMENTO, W. M. *et al.* **BRS Aleppo: grão de bico.** Maior tolerância a fungos de solo. Brasília: Embrapa, 2014.
- NEINAST, M. *et al.* Branched chain amino acids. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 81, p. 139–164, 2019.
- OLIVEIRA, C. B. C. *et al.* Obesity: Inflammation and Bioactive Compounds. **J. Health Biol. Sci.**, v. 8, n.1, p. 1-5, 2020.
- OLIVA, M. L. *et al.* Structural and functional properties of Kunitz proteínase inhibitors from Leguminosae: a mini review. **Curr. Protein Pept. Sci.**, n. 12, p. 348-357, 2011.
- ORDOVAS, J. M.; BERCIANO, S. Personalized nutrition and healthy aging. **Nutr. Rev.**, v. 78, n. 3, p. 58-65, 2020.

ORGERON, M. L. *et al.* The impact of dietary methionine restriction on biomarkers of metabolic health. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.**, v. 121, p. 351–376, 2014.

PAREDES, S. *et al.* New approaches for improving cardiovascular risk assessment. **Rev. Port. de Card.**, v. 35, n. 1, p. 15-18, 2016.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. *et al.* Otimização de Metodologia Analítica para o Doseamento de Flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 288-291, 2010.

PEREIRA, I. F. S. *et al.* Nutritional status of elderly Brazilians: a multilevel approach. **Cad. S. Publ.**, v. 32, n. 5, 2016.

PEREIRA, M. P.; TAVANO, O. L. Use of different spices as potential natural antioxidant additives on cooked beans (*Phaseolus vulgaris*). Increase of DPPH radical scavenging activity and total phenolic content. **Plant Foods for Human Nutr.**, v. 69, n. 4, p. 337-343, 2014.

PHANIENDRA, A. *et al.* Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian J. Clin. Biochem.**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 2015.

POPRAC, P. *et al.* Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **T. in Pharm. Sci.**, v. 38, n. 7, p. 592-607, 2017.

PORSCH, L.; SIMAS, L. A. W.; GRANZOTI, R. O. C. Estresse Oxidativo E O Seu Impacto No Envelhecimento: Uma Revisão Bibliográfica. **Rev. Elet. Braz. J. of Nat. Sci.**, v. 2, n. 2, 2019.

QUEIROZ, T. M. *et al.* 2015. A-Lipoic acid reduces neurogenic hypertension by blunting oxidative stress-mediated increase in ADAM17. **Amer. J. of Phys. H. an Circ. Phys.**, v. 309, n. 5, p. 926-934, 2015.

QUINTERO-SOTO, M.F. *et al.* Phenolic profiles and their contribution to the antioxidant activity of selected chickpea genotypes from Mexico and ICRISAT collections. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 73, p. 122–129, 2018.

QUINTERO-SOTO M. F. *et al.* Characterization of peptides with antioxidant activity and antidiabetic potential obtained from chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolyzates. **J. Food Sci.**, v. 1, p.16, 2021.

RACHWA-ROSIK, D. *et al.* Chickpeas composition, nutritional value, health benefits, application to bread and snacks: a review. **Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.**, v. 55, n. 8, p. 1137–1145, 2015.

RAMADHANI, U. P. *et al.* Overview of phytochemistry and pharmacology of chickpeas (*Phaseolus vulgaris*). **World J. Pharm. Pharmaceutic. Sci.**, v. 9, p. 442–461, 2020.

- RAMASARMA, P. R. *et al.* Role of disulfide linkages in structure and activity of proteinase inhibitor from horsegram (*Dolichos biflorus*). **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1248, p. 35–42, 1995.
- ROSSI, L. *et al.* **Avaliação nutricional: novas perspectivas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
- RYAN, E. *et al.* Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. **Plant Foods for Hum. Nutr.**, v. 62, n. 3, p. 85–91, 2007.
- SAVIC, I. M. *et al.* Modeling and optimization of bioactive compounds from chickpea seeds (*Cicer arietinum* L.). **Sep. Sci. and Tech.**, v. 54, n. 5, p. 837-846, 2018.
- SCHIEBER, M.; CHANDEL, N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr. Biol.**, v. 24, p. 453–462, 2014.
- SEGEV, A. *et al.* Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in colored chickpea (*Cicer arietinum* L.). **J. Food Sci.**, v. 75, n. 2, p. S115–S111, 2010.
- SENER, A.; MALAISSE, W. J. L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. **Nature**, v. 288, p. 187–189, 1980.
- SETHI, C. *et al.* Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. **J. of Food Sci. and Tech.**, v. 53, n. 9, p. 3408–3423, 2016.
- SHIMADA, K. *et al.* Antioxidative Properties of Xanthan on the Autoxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion. **J. of Agric. and Food Chem.**, v. 40, p. 945-948, 1992.
- SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Red. Bio.**, v. 11, p. 613-619, 2017.
- SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biol.**, v. 4, p. 180–183, 2015.
- SIMIONI, C. *et al.* Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. **Oncotarget**, v. 9, n. 24, p. 17181-17198, 2018.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **A. J. of Enol and Vit.**, v. 16, n. 3, p. 144-146, 1965.
- SOLON-BIET, S. M. *et al.* Branched chain amino acids impact health and lifespan indirectly via amino acid balance and appetite control. **Nat. Metab.**, v. 1, p. 532–545, 2019.

SOTO, M. F. Q. *et al.* Characterization of peptides with antioxidant activity and antidiabetic potential obtained from chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolyzates. **J. Food. Sci.**, v. 1, n. 16, 2021.

SWAMINATHAN, A. *et al.* Methionine restriction plus overload improves skeletal muscle and metabolic health in old mice on a high fat diet. **Sci. Rep.**, v. 11, p. 1260, 2021.

TAVANO, O. L. *et al.* Avaliação nutricional de proteínas do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) por método químico e microbiológico. **J Alim. Nutr.**, v.15, n.1, p.17-22, 2004.

TAVANO, O. L. *et al.* Nutritional Responses of Rats to Diets Based on Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seed Meal or Its Protein Fractions. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 56, p. 11006–11010, 2008.

THUSHAN, S. W. G. *et al.* Physicochemical, thermal and functional characterization of protein isolates from Kabuli and Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.): a comparative study with soy (*Glycine max*) and pea (*Pisum sativum* L.). **J. Sci. Food. Agric.**, v. 91, p. 1022–1031, 2011.

TIAN, M. *et al.* Dietary branched-chain amino acids regulate food intake partly through intestinal and hypothalamic amino acid receptors in piglets. **J. Agric. Food Chem.**, v. 67, p. 6809–6818, 2019.

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

TRIGUEROS, L. *et al.* Antioxidant activity and protein–polyphenol interactions in a pomegranate (*Punica granatum* L.) yogurt. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, p. 6417–6425, 2014.

TRIST, B. G. *et al.* Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Aging Cell.**, v. 18, 2019.

TRIVEDI, M. V. *et al.* The role of thiols and disulfides on protein stability. **Curr. Prot. Pept. Sci.**, v. 10, p. 614–625, 2009.

WANG, S. *et al.* Synergistic, additive and antagonistic effects of *Potentilla fruticosa* combined with EGb761 on antioxidant capacities and the possible mechanism. **Ind. Crop. Prod.**, v. 67, p. 227–238, 2015.

WILLIAMSON, G.; HOLST, B. Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: Are we heading in the right direction?. **BJN**, v. 99, 2008.

XU, X. *et al.* Alcalase and bromelain hydrolysis affected physicochemical and functional properties and biological activities of legume proteins. **Food Struct.**, v. 27, 2021.

XUE, Z. *et al.* Antioxidant activity and anti-proliferative effect of a bioactive peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Food Res. Int.**, v. 77, p. 75–81, 2015.

YANG, J. *et al.* Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. **Nutr. Rev.**, v. 68, p. 270–279, 2010.

YANG, J. *et al.* Leucine stimulates insulin secretion via down-regulation of surface expression of adrenergic alpha2A receptor through the mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway: implication in new-onset diabetes in renal transplantation. **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 24795–24806, 2012.

YUST, M. *et al.* Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. **Food Chem.**, v. 122, n.4, p. 1212–1217, 2010.

ZHANG, J. *et al.* ROS and ROS-mediated cellular signaling. **Oxid. Med. Cell Longev.**, p. 1–18, 2016.

ZHANG, X. *et al.* Influence of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Chickpea Yam Milk. **J. of Food Qual.**, v. 2021, 2021.

ZHAO, Y. *et al.* In vitro antioxidant activity of extracts from common legumes. **Food Chem.**, v. 152, p. 462–466, 2014.