



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAROLINE CAGNIN

**FARELO DE GLÚTEN DE MILHO: EXTRUSÃO E PROPRIEDADES  
FUNCIONAIS TECNOLÓGICAS E DE SAÚDE**

---

Londrina

2023

**CAROLINE CAGNIN**

**FARELO DE GLÚTEN DE MILHO: EXTRUSÃO E PROPRIEDADES  
FUNCIONAIS TECNOLÓGICAS E DE SAÚDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Prudencio.

Londrina

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C131f Cagnin, Caroline.  
FARELO DE GLÚTEN DE MILHO : EXTRUSÃO E PROPRIEDADES FUNCIONAIS TECNOLÓGICAS E DE SAÚDE / Caroline Cagnin. - Londrina, 2023.  
150 f.

Orientador: Sandra Helena Prudencio.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Milho - Tese. 2. Peptídeos - Tese. 3. Extrusão - Tese. 4. Digestão gastrointestinal simulado - Tese. I. Prudencio, Sandra Helena. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641.1

CAROLINE CAGNIN

**FARELO DE GLÚTEN DE MILHO: EXTRUSÃO E PROPRIEDADES  
FUNCIONAIS TECNOLÓGICAS E DE SAÚDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual  
de Londrina, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutora em Ciência de Alimentos

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Prudencio  
Universidade Estadual de Londrina – UEL –  
CCA/DCTA

---

Profa. Dra. Rúbia Casagrande  
Universidade Estadual de Londrina – UEL –  
CCS/DCF

---

Dra. Bruna Yumi Yoshida  
Autônoma

---

Profa. Dra. Maria Victória Eiras Grossmann  
Universidade Estadual de Londrina – UEL –  
CCA/DCTA

---

Prof. Dr. André Luiz Buzzo Mori  
Universidade Estadual de Londrina – UEL –  
CCA/DCTA

Londrina, 18 de setembro de 2023.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que esteve ao meu lado em todos os momentos dessa caminhada, me guiando, dando força, saúde, paciência e inteligência para a realização desse objetivo.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Sandra Helena Prudencio, por ter aceitado o convite de me guiar durante todos estes anos e por inúmeras contribuições que realizou neste trabalho. Obrigada pelas orientações, pelos ensinamentos e pelas experiências repassadas.

Ao meu companheiro e eterno amigo, Thiago César Furtado, pela paciência, companheirismo e parceria ao longo destes anos de estudo e pesquisa. Obrigada, eternamente, pelo seu apoio aos meus sonhos, por me acompanhar na caminhada e por tornar os meus dias mais leves e felizes.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina pela disponibilização de equipamentos, reagentes e laboratórios utilizados durante a pesquisa. E a todo suporte dado a questões relacionadas ao curso. Aos professores do Departamento de Ciência de Alimentos pelos ensinamentos repassados durante toda a pós-graduação, especialmente ao Dr. Fábio Yamashita pela ajuda e sugestões na estatística do trabalho e a Dra. Thaís de Souza Rocha pelas contribuições no trabalho.

Agradeço à CAPES pela disponibilização de bolsa de estudos e apoio às pesquisas durante o período do doutorado em Ciência de Alimentos.

Aos meus pais, Dirce e Adair Cagnin, por todo o apoio e compreensão, diante dos meus objetos.

A Danielly Nascimento Moraes pelo apoio, dicas e conversas durante as pesquisas de laboratório e em outros momentos de descontração. Obrigado pelas dicas, pela ajuda em algumas análises e pelo companheirismo. E a todos os colegas do Departamento de Ciência de Alimentos que, a partir das conversas, tornam tudo mais leve, trazendo uma atmosfera tranquila e confortável para trabalhar.

CAGNIN, Caroline. **Farelo de glúten de milho: extrusão e propriedades funcionais tecnológicas e de saúde.** 2023. 150 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

## RESUMO

O farelo de glúten de milho, um resíduo proteico do processamento industrial do milho, é utilizado em ração animal, mas devido à proporção elevada de proteínas (cerca de 60%), torna-se interessante o seu uso na alimentação humana. A estrutura molecular das proteínas de origem vegetal pode resultar em características tecnofuncionais pouco desejáveis para aplicação em alimentos e baixa digestão dessa matéria-prima. O processamento por extrusão pode modificar a estrutura conformacional das proteínas e contribuir para melhorar as características tecnofuncionais e a digestão dessas moléculas. O estudo da digestão de proteínas, que pode ser realizada *in silico* e *in vitro*, indica peptídeos que podem possuir ação biológica no corpo humano, como ação antioxidante e anti-hipertensiva. O objetivo desse estudo foi conhecer as propriedades bioativas de peptídeos do farelo de glúten de milho, além de modificar a estrutura molecular de suas proteínas por extrusão e verificar as consequências em suas propriedades tecnofuncionais e de saúde, para um maior aproveitamento desse resíduo como um ingrediente alimentar. Foi feita uma análise *in silico* da alfa-zeína a partir de banco de dados disponível em ferramentas computacionais (UniProt, BIOPEP e PeptideRanker). Observou-se que o maior número de ocorrências de fragmentos peptídicos estava relacionado à inibição da enzima conversora de angiotensina, seguida pela inibição da dipeptidil peptidase IV e dipeptidil peptidase III. Sugere-se que os peptídeos de milho podem ter potencial como agentes alternativos para o tratamento da hipertensão e diabetes mellitus tipo 2. Pela avaliação de artigos científicos que mostravam evidências de propriedades bioativas de peptídeos de milho por ensaios *in vitro*, a ação mais frequentemente encontrada foi a antioxidante. Num segundo estudo, o material foi extrusado em diferentes umidades de amostra (20 – 40%), temperaturas (120 – 160°C) e velocidades do parafuso (33 – 117 rpm) empregando-se um planejamento fatorial completo, com dois pontos centrais. Observou-se que a condição de extrusão de 20% de umidade, 120°C e 117 rpm foi a otimizada para as maiores capacidade de absorção de água e solubilidade de proteínas em pH 7. A extrusão na condição otimizada acarretou diminuição da luminosidade e aumento da cromaticidade do farelo, além de aumentar a atividade e capacidade emulsificante. A solubilidade em água das proteínas do farelo reduziu e em soluções de tampão fosfato contendo ureia e/ou SDS foi alterada, indicando modificação da conformação nativa das moléculas devido à extrusão, que foi corroborada pela intensificação da conformação folha  $\beta$  e agregação das proteínas. Posteriormente num terceiro estudo, o farelo de glúten de milho foi extrusado nas mesmas condições citadas anteriormente, visando o aumento do rendimento da digestão gastrointestinal simulada. A condição de extrusão otimizada foi 40% de umidade, 140°C e 54 rpm. As amostras controle (não extrusada e não digerida), não extrusada-digerida, extrusada otimizada e extrusada otimizada-digerida foram comparadas em relação a atividade biológica. A amostra extrusada otimizada-digerida apresentou maiores teor de nitrogênio, grau de hidrólise, digestibilidade e potencial de ação biológica (atividade antioxidante/ABTS, capacidade redutora, atividade de inibição de ECA e alfa-amilase) em relação às demais amostras. Os resultados do estudo possibilitam mais perspectivas para o aproveitamento e agregação de valor ao

farelo de glúten de milho como um ingrediente alimentar a partir de alterações das características tecnofuncionais ou daquelas relacionadas à saúde, além de contribuir para redução de resíduos agroindustriais.

**Palavras-chave:** antioxidante, digestão gastrointestinal, conformação estrutural de proteínas, peptídeos, resíduo proteico, solubilidade proteica.

CAGNIN, Caroline. **Corn gluten meal: extrusion and technological and health functional properties.** 2023. 150 f. Thesis (Doctorate in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

## ABSTRACT

Corn gluten meal, a protein residue from the industrial processing of corn, is used in animal feed, but due to the high proportion of proteins (about 60%), its use in human food becomes interesting. The molecular structure of proteins of vegetable origin can result in less desirable technofunctional characteristics for application in foods and low digestion of this raw material. Extrusion processing can modify the conformational structure of proteins and contribute to improving the technofunctional characteristics and digestion of these molecules. The study of protein digestion, which can be performed *in silico* and *in vitro*, indicates peptides that may have biological action in the human body, such as antioxidant and antihypertensive action. The objective of this study was to know the bioactive properties of peptides from corn gluten meal, in addition to modifying the molecular structure of its proteins by extrusion and verifying the consequences on its technofunctional and health properties, for greater use of this residue as an ingredient. to feed. An *in silico* analysis of alpha-zein was performed from a database available in computational tools (UniProt, BIOPEP, and PeptideRanker). It was observed that the highest number of occurrences of peptide fragments was related to the inhibition of the angiotensin-converting enzyme, followed by the inhibition of dipeptidyl peptidase IV and dipeptidyl peptidase III. It is suggested that corn peptides may have potential as alternative agents for the treatment of hypertension and type 2 diabetes mellitus. According to the evaluation of scientific articles that showed evidence of bioactive properties of corn peptides by *in vitro* assays, the most frequently found action was the antioxidant one. In a second study, the material was extruded at different sample moistures (20 – 40%), temperatures (120 – 160°C), and screw speeds (33 – 117 rpm) using a full factorial design with two central points. It was observed that the extrusion condition of 20% humidity, 120°C, and 117 rpm was optimized for the highest water absorption capacity and protein solubility at pH 7. The extrusion in the optimized condition led to a decrease in luminosity and an increase in the chromaticity of the bran, in addition to increasing the activity and emulsifying capacity. The solubility in water of the bran proteins was reduced and in phosphate buffer solutions containing urea and/or SDS it was altered, indicating modification of the native conformation of the molecules due to extrusion, which was corroborated by the enhancement of the  $\beta$ -sheet conformation and protein aggregation. Subsequently, in a third study, corn gluten meal was extruded under the same conditions mentioned above, aiming to increase the yield of simulated gastrointestinal digestion. The optimized extrusion condition was 40% humidity, 140°C, and 54 rpm. Control (non-extruded and non-digested), non-extruded-digested, optimized extruded, and optimized extruded-digested samples were compared for biological activity. The digested-optimized extruded sample showed higher nitrogen content, degree of hydrolysis, digestibility, and biological action potential (antioxidant activity/ABTS, reducing capacity, ACE, and alpha-amylase inhibition activity) concerning the other samples. The results of the study provide more perspectives for the use and added value of corn gluten meal as a food ingredient based on changes in techno-functional characteristics or those related to health, in addition to contributing to the reduction of agro-industrial waste.

**Keywords:** antioxidant, gastrointestinal digestion, protein structural conformation, protein solubility, peptides, protein waste.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática anatômica do grão de milho.....	18
<b>Figura 2</b> – Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido (GA) e corpos proteicos (CP) no endosperma do milho.....	18
<b>Figura 3</b> – Fluxograma do processamento do milho por via úmida.....	19
<b>Figura 4</b> – Farelo de glúten de milho desidratado em pó.....	21
<b>Figura 5</b> – Estrutura química dos aminoácidos metionina e cisteína.....	22
<b>Figura 6</b> – Esquema representativo de um extrusor de parafuso único.....	24
<b>Figura 7</b> – Modelos de matrizes responsáveis pelas formas do material extrusado.....	25
<b>Figura 8</b> – Possíveis alterações na estrutura proteica durante a extrusão.....	25
<b>Figura 9</b> – Esquema representativo de hidrólise enzimática de proteína para obtenção de peptídeos ativos.....	33
<b>Figura 10</b> – Abordagem híbrida que integra métodos <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> para produção de peptídeos ativos a partir de alimentos.....	37

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Artigo 1

<b>Figure 1.</b> Biological activities of the 24 $\alpha$ -zein protein sequences analyzed using the BIOPEP-UWM database.....	64
<b>Figure 2.</b> Biological activities of the 24 $\alpha$ -zein protein sequences analyzed using the BIOPEP-UWM database after simulated gastrointestinal digestion with pepsin, trypsin, and chymotrypsin.....	65
<b>Figure 3.</b> Biological activities of the 24 $\alpha$ -zein protein sequences analyzed using the BIOPEP-UWM database after simulated digestion with subtilisin.....	66
<b>Figure 4.</b> Structure of $\alpha$ -zein.....	67
<b>Figure 5.</b> Number of scientific studies in corn on bioactive peptides, in the last ten years, according to biological activity.....	70

## **Artigo 2**

**Figura 1** – Curvas de contorno do efeito da umidade (%), temperatura (°C) e velocidade do parafuso (rpm) sobre a capacidade de absorção de água (CAA) (g de água absorvida g de amostra seca<sup>-1</sup>).....105

**Figura 2** – Curvas de contorno do efeito da umidade (%), temperatura (°C) e velocidade do parafuso (rpm) sobre a solubilidade proteica em pH 7,0 (SP7) (g de proteína solúvel 100 g<sup>-1</sup>).....107

**Figura 3** – FTIR do farelo de glúten de milho controle (GM) e extrusado (EGMO).....112

**Figura 4** – Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas do farelo de glúten de milho controle (GM) e extrusado (EGMO).....113

**Figura 5** – Solubilidade das proteínas do farelo de glúten de milho controle (GM) e extrusado otimizado (EGMO) em diferentes pHs.....116

## **Artigo 3**

**Figura 1** – Curvas de contorno do efeito da umidade da amostra (%), temperatura (°C) e velocidade do parafuso do extrusor (rpm) sobre o rendimento de amostra digerida (%) de farelo de glúten de milho extrusado.....136

**Figura 2** – Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas dos GM e GMEO antes e após a digestão gastrointestinal simulada.....140

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Tabela 1</b> – Funcionalidades das proteínas em diferentes alimentos.....	28
--	----

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Artigo 1

<b>Table 1</b> - Identification of alpha-zein in UniProt using BLAST.....	93
<b>Table 2</b> - Predicted potential for obtaining bioactive peptides for Alpha zein O48966.....	81
<b>Table 3</b> - Predicted potential for obtaining bioactive peptides for Alpha zein P06679.....	84
<b>Table 4</b> - Predicted potential for obtaining bioactive peptides for Alpha zein K7TUP3.....	87
<b>Table 5</b> - Scores at PeptideRanker of the bioactive peptide fragments with biological potential obtained from BIOPEP-UWM and peptide sequences with the same bioactive fragment identified in scientific studies at the literature.....	90

#### Artigo 2

<b>Tabela 1</b> – Planejamento fatorial completo com dois pontos centrais ( $2^3$ ), três variáveis independentes e dois níveis para extrusão do farelo de glúten de milho.....	98
<b>Tabela 2</b> – Coeficientes de regressão e ANOVA dos modelos matemáticos das funções respostas.....	104
<b>Tabela 3</b> – Validação das funções respostas utilizando a condição desejável <sup>1</sup> de extrusão de farelo de glúten de milho.....	109
<b>Tabela 4</b> – Solubilidade proteica ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) em diferentes soluções e teores ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) de sulfidril livre total ( $\text{SH}_L$ ), sulfidril total ( $\text{SH}_T$ ) e ligações dissulfeto (SS) de farelo de glúten de milho controle (GM) e extrusado (EGMO).....	110
<b>Tabela 5</b> – Composição química, cor e características tecnofuncionais do farelo de glúten de milho controle (GM) e extrusado (EGMO).....	115

### **Artigo 3**

<b>Tabela 1</b> – Planejamento fatorial completo com dois pontos centrais ( $2^3$ ), três variáveis independentes e dois níveis para extrusão do farelo de glúten de milho.....	128
<b>Tabela 2</b> – Coeficientes de regressão e ANOVA do modelo matemático da função resposta.....	135
<b>Tabela 3</b> – Validação da função resposta utilizando a condição desejável <sup>1</sup> de digestão enzimática de farelo de glúten de milho extrusado.....	137
<b>Tabela 4</b> – Grau de hidrólise, teor de nitrogênio e ação biológica dos GM e GMEO antes e após a digestão gastrointestinal simulada.....	138

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>16</b>
2. 1 Objetivo Geral.....	16
2. 2 Objetivos Específicos.....	16
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
3. 1 Grão de milho .....	17
3. 2 Processamento do milho .....	18
3. 3 Farelo de glúten de milho .....	20
3. 4 Extrusão de Proteínas .....	22
3. 5 Propriedades funcionais tecnológicas ou tecnofuncionais de proteínas .....	27
3. 5. 1 Propriedades funcionais tecnológicas de extrusados proteicos .....	30
3. 6 Propriedades funcionais de saúde: peptídeos ativos .....	31
3. 7 Abordagem integrada para peptídeos ativos .....	34
3. 8 Peptídeos ativos no milho .....	37
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
5. 1 Artigo Científico 1 .....	53
5. 2 Artigo Científico 2 .....	94
5. 3 Artigo Científico 3 .....	124
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>149</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A previsão para a produção mundial de milho para a safra de 2023/24 é de 1.222,8 milhões de toneladas, o que significa aumento de 6,3% em relação à safra de 2022/23 (USDA, 2023). No Brasil, estima-se que a safra de milho de 2023 seja de 305,4 milhões de toneladas, representando um recorde para o país (NERY; ALBERTO, 2023). O milho é a principal fonte para produção de amido industrial e matéria-prima para diversos produtos, como farinha de milho, canjica, polenta, fubá e flocos de milho, sendo uma das culturas brasileira de relevância, e é base para alimentação humana e animal (XUE et al., 2013). A produção industrial do milho pode ser realizada por via úmida ou seca. Um dos produtos do processamento do milho obtido por via úmida é o farelo de glúten de milho (GM). O GM apresenta, em base seca (b.s.), aproximadamente, 60% de proteínas, composta por 68% de zeína e 22% de glutelina, 25-30% de carboidratos, 3-6% de lipídeos, 1% de fibras e 1-2% de cinzas (GIANNENAS et al., 2017; ORTIZ-MARTINEZ et al., 2017).

Atualmente, o GM é estudado e utilizado principalmente, em rações para animais, como por exemplo, cabras (WU et al., 2020) e cães e gatos (SMITH e ALDRICH, 2023). Entretanto, a alta proporção de proteínas do GM o torna atrativo para a alimentação humana. As proteínas vegetais, geralmente, apresentam conformações estruturais, como globulares e fibrosas, que possuem menor qualidade em relação às características tecnofuncionais em comparação com proteínas de origem animal, possuindo menor capacidade de formação de gel e espuma, menor capacidade emulsificante e menor capacidade de absorção de água (HERTZLER et al., 2020), o que prejudica a sua utilização na alimentação humana e aplicação em produtos alimentícios.

Para modificar as características tecnofuncionais das proteínas podem-se utilizar algumas técnicas de processamento, como a extrusão. Este processamento aquece a matéria-prima, previamente hidratada (SCHMID et al., 2021) modificando a conformação estrutural dos ingredientes, principalmente, as proteínas a partir de alterações na sua estrutura molecular como resultado do tratamento termodinâmico (CHEN; WEI; ZHANG, 2011). As subunidades proteicas, ao serem submetidas ao cisalhamento e aquecimento no extrusor, podem sofrer desnaturação e, posterior, formação de novas interações não covalentes (interações hidrofóbicas, dipolo permanente e ligações de hidrogênio) e covalentes (ligações dissulfeto) (LI et al., 2018; PRUDÊNCIO-FERREIRA; ARÊAS, 1993; PIETSCH; EMIN; SCHUCHMANN, 2017). A extrusão das proteínas também pode resultar na formação de agregados proteicos que

irão apresentar diferente solubilidade se comparada a proteína na sua conformação nativa (WANG et al., 2017).

Zhang et al. (2023) estudaram o GM extrusado e notaram aumento da agregação proteica, como resultado do aumento das ligações covalentes com aumento da temperatura de extrusão. Zheng et al. (2020) encontraram que blendas (1:1) de isolado proteico de soja e fubá de milho após a extrusão, tiveram maior capacidade de absorção de água como consequência da redução da proporção de  $\alpha$ -hélice e aumento de folhas  $\beta$  nas proteínas presentes no fubá de milho devido ao processamento.

A extrusão, além de influenciar as características tecnofuncionais também facilita a digestibilidade das proteínas, devido à alteração na conformação das moléculas e a possibilidade de exposição de sítios ativos para a ação das enzimas digestivas, desde que não haja agregação das moléculas de proteínas, que poderá dificultar a digestão (MOHAMED, 2023). A partir da digestão de uma proteína obtém-se peptídeos, que são associações de 2 a 20 aminoácidos e que podem apresentar bioatividade ao interagir com um receptor apropriado do corpo humano ou animal (DU; LI, 2022).

O estudo da bioatividade dos peptídeos pode ocorrer de forma *in silico*, *in vitro* ou *in vivo*, sendo que o estudo *in silico* anterior ao estudo *in vitro* ou *in vivo* pode resultar em economia de tempo e reagentes, além de permitir o conhecimento da relação estrutura-função do peptídeo e prever as propriedades bioativas da sequência específica de aminoácidos contribuindo para a escolha da melhor enzima para a produção do peptídeo (SARKER, 2022). Numerosas investigações relataram que os peptídeos liberados a partir da hidrólise enzimática do GM possuem propriedades ativas, incluindo antioxidante (HU et al., 2022), anti-inflamatória (MOCHIZUKI; SHIGEMURA; HASEGAWA, 2010), inibição de agentes relacionados à distúrbio neurocognitivo (prolil oligopeptidase) (CHANAION et al., 2023) e ação anti-hipertensiva (WONGNGAM et al., 2023).

Objetivou-se realizar um estudo *in silico* de propriedades bioativas de peptídeos da  $\alpha$ -zeína e modificar a estrutura molecular das proteínas do GM por extrusão e verificar as consequências em suas propriedades tecnofuncionais e de saúde, visando o maior aproveitamento desse resíduo como um ingrediente alimentar.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Conhecer as propriedades bioativas de peptídeos do farelo de glúten de milho (estudo *in vitro*) e da  $\alpha$ -zeína (estudo *in silico*), além de modificar a estrutura molecular das proteínas do farelo por extrusão e verificar as consequências em suas propriedades tecnofuncionais e de saúde, para um maior aproveitamento desse resíduo como um ingrediente alimentar.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in silico* as possibilidades de liberação de peptídeos bioativos da zeína do milho em diferentes condições enzimáticas por meio dos bancos de dados BIOPEP-UWM, UniProt e Peptide Ranker.
- Empregar a extrusão para modificar o farelo de glúten de milho e avaliar os efeitos das condições de extrusão (umidade da amostra, temperatura e velocidade de rotação do parafuso) sobre suas propriedades de hidratação, bem como, avaliar o efeito da extrusão, em condição otimizada, sobre as propriedades físicas, químicas e tecnofuncionais do material.
- Avaliar o efeito das condições de extrusão (umidade da amostra, temperatura e velocidade de rotação do parafuso) sobre a digestão do farelo de glúten de milho em condições gastrointestinais simuladas e efeito da extrusão em condição otimizada sobre as propriedades de saúde desse material.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Grão de milho

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, sendo o ranking liderado pelos Estados Unidos, seguido da China. Ainda, estima-se que o Brasil produzirá 312,5 milhões toneladas de milho na safra 2022/2023 (CONAB, 2022). Contudo, o consumo do grão pelos humanos representa pequena parcela da safra de milho brasileira, sendo que a maior parte é destinada ao processamento industrial e produção de ração animal (MAPA, 2015).

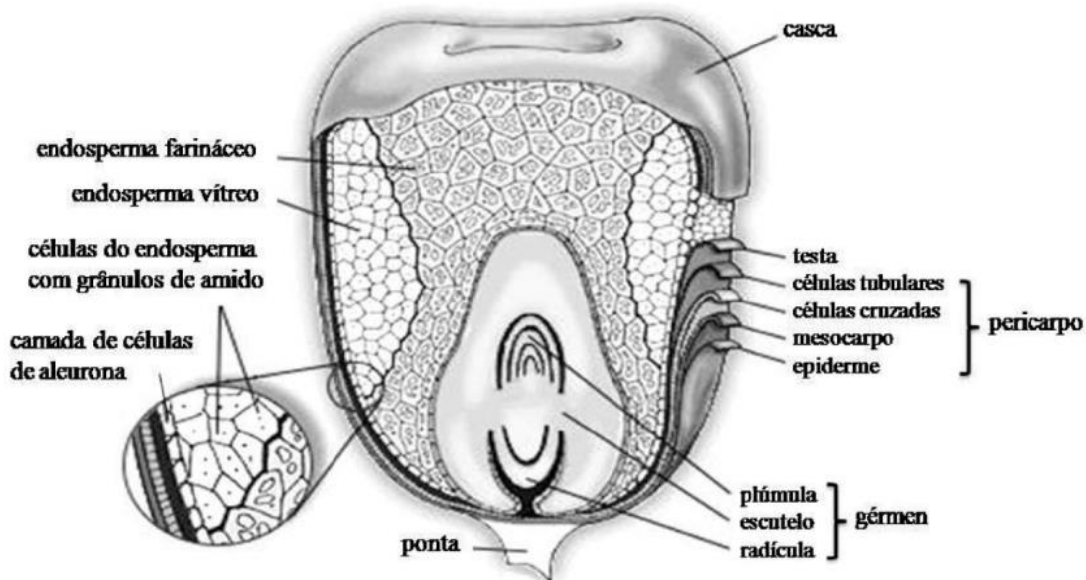
O milho é a principal fonte para produção de amido industrial e matéria-prima para diversos produtos, como o fubá, farinha de milho, flocos de milho, canjica e polenta, por isso é uma das culturas brasileira de relevância, sendo uma das bases para alimentação humana e animal (XUE et al., 2013). As propriedades nutricionais do milho, carboidratos totais, em torno de 78%, sendo 60% de amido, além de, aproximadamente, 8% de proteína, 3,7% de lipídeos, 1,5% de minerais totais e 1,35% de fibras, tornam esse grão um importante e rico alimento para a alimentação humana (GIACOMELLI et al., 2012).

O grão de milho é constituído por quatro partes: endosperma, que representa 82% do grão; pericarpo, 5%; gérmen, 11% e ponta, 2% (Figura 1), sendo que os nutrientes estão distribuídos de forma heterogênea entre as estruturas do grão (CALLEGARO et al., 2005). O endosperma apresenta a maior proporção de amido (aproximadamente, 88%), destes 15 – 25% de amilose e 75 – 85% de amilopectina, e menor proporção de proteínas (aproximadamente, 12%). Entre os grânulos de amido do endosperma encontram-se os corpos proteicos (Figura 2). Os corpos proteicos do milho apresentam formato circular e estão dispostos, externamente, ao redor dos grânulos de amido, estando a delta e gama zeínas na região central e a alfa zeína na região externa (PAPALIA; LONDERO, 2015). O gérmen é rico em lipídios, açúcares e proteínas; o pericarpo e ponta são compostos por fibras (PAES, 2008).

As zeínas são proteínas são prolaminas e representam a maior porção das proteínas do milho, aproximadamente 47% (b.s.). As prolaminas são insolúveis em água e solúveis em soluções alcoólicas a 70%. Apesar da abundância das prolaminas, o endosperma possui outras proteínas: aproximadamente, em b.s., 39% de albuminas (solúveis em água), 4% de globulinas (solúveis em soluções salinas diluídas) e 4% de

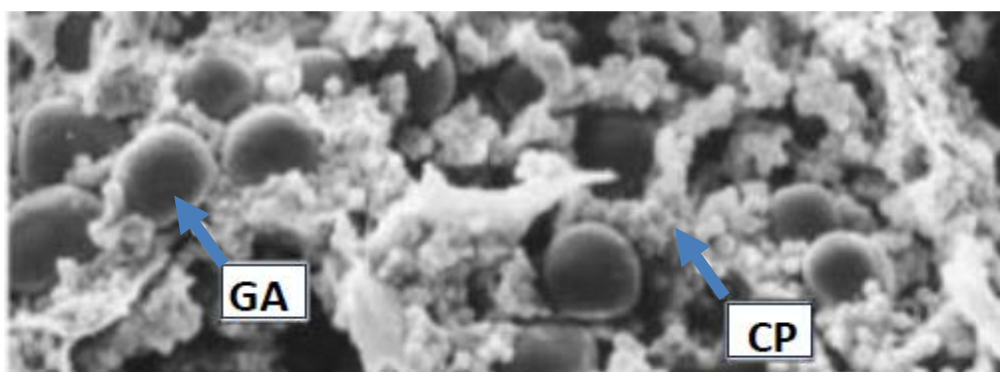
glutelinas (solúveis em soluções ácidas e básicas) (SETHI et al., 2021; ANDERSON; LAMSAL, 2011).

**Figura 1** – Representação esquemática anatômica do grão de milho.



Fonte: Papalia; Londero (2015).

**Figura 2** – Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido (GA) e corpos proteicos (CP) no endosperma do milho.



Fonte: adaptado de Sabelli; Larkins (2009).

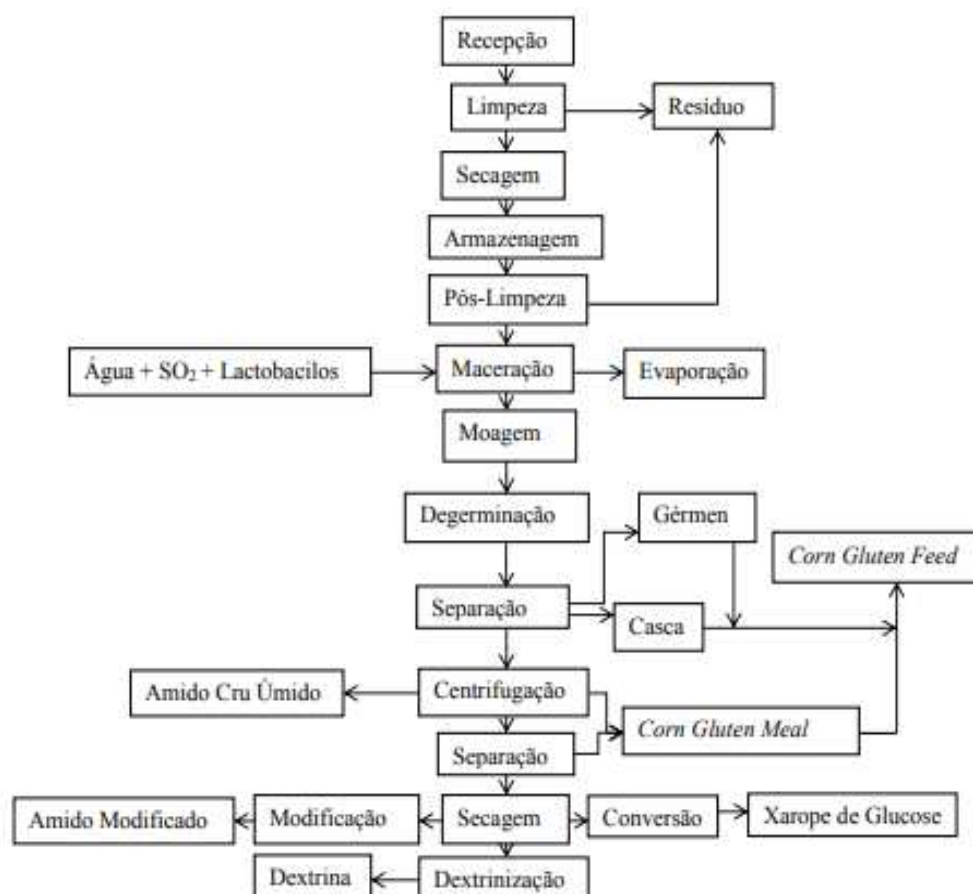
### 3. 2 Processamento do milho

A manufatura de produtos a partir do grão de milho depende do tipo de processamento, que pode ser realizado por via seca ou via úmida. No Brasil, as indústrias de pequeno porte comumente utilizam o processamento por via seca devido à

simplicidade do processo e necessidade de poucos equipamentos. Nesse processamento efetua-se a quebra física do grão de milho (STRAZZI, 2015). Primeiro há a extração do gérmen, para posterior extração de óleo, por degerminadores. E o endosperma é usado na produção de canjicas, fubás e farinhas. Os produtos resultantes podem ser empregados na produção de diversos alimentos, como snacks, pipoca doce, cereais matinais, alimentos infantis, e em produtos de panificação, além do uso doméstico (EMBRAPA, 2011).

Para a produção de amido, dextrinas, xaropes, glicose, farelo de glúten de milho e de outros produtos o processamento utilizado é por via úmida, empregado em indústrias alimentícias de grande porte e nas indústrias produtoras de ração animal. O fluxograma desse processamento pode ser visualizado na Figura 3 (EMBRAPA, 2011).

**Figura 3** – Fluxograma do processamento do milho por via úmida.



Fonte: Abimilho (2015).

A primeira etapa do processamento do milho por via úmida é a limpeza, com o objetivo de retirar sujidades resultantes da colheita e transporte. Os grãos de milho limpos são secos e armazenados até o momento em que se inicia a industrialização. Onde é

realizada uma nova limpeza dos grãos para retirada de resíduos do armazenamento, como os pós. Após, inicia-se o processo de maceração que é dividido em três etapas. A primeira etapa tem a função de hidratar o milho e iniciar o processo fermentativo com a própria microbiota (*Lactobacillus spp.*) dos grãos. Nessa etapa há a adição de até 300 ppm de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), que contribui para a fermentação e conservação dos grãos (RAUSCH; ECKHOFF, 2016).

A segunda fase da maceração consiste na difusão do SO<sub>2</sub> nos grãos. A difusão do gás, quando alcança a concentração de 2.500 ppm, irá contribuir para a liberação do amido e proteínas do milho. Ao alcançar essa concentração de gás tem-se o início da terceira fase, que tem como objetivo a hidrólise das interações entre as proteínas do endosperma, permitindo maior rendimento da separação do amido-proteína do milho e formação de ácido sulfuroso, que atua como agente asséptico e controle da germinação durante a fermentação do grão (LOPES; RAMOS; ROMERO, 2006). O processo de maceração ocorre em temperaturas de 50°C por, aproximadamente, 40 horas (RAUSCH; ECKHOFF, 2016).

Após a maceração os grãos hidratados são levados para o processo de moagem com a função de separar o gérmen e a casca dos grãos. Nessa etapa, há a formação do “leite de amido” juntamente com a proteína do milho. A mistura é centrifugada para garantir a separação da proteína-amido. A porção de proteína separada, conhecida como farelo de glúten de milho (corn gluten meal) é comercializada para o emprego em ração animal, principalmente, na forma seca ou úmida (SANTOS, 2004). O farelo de glúten de milho é rico em proteínas, que representam cerca de 60% da massa do material (ZHUANG et al., 2013).

### **3. 3 Farelo de glúten de milho**

Comercialmente na empresa Cargill (Brasil), o farelo de glúten de milho (GM) pode ser classificado como o produto GM 21 (Corn gluten feed), conhecido como Promill®, que possui aproximadamente 21% de proteínas e 11% de fibras, e como GM 60 (corn gluten meal), produto conhecido como Glutenose®, o qual apresenta aproximadamente 60% de proteínas e 1,5% de fibras (SANTOS, 2004; SCHROEDER, 2003). Na literatura internacional não há discriminação entre GM 21 e GM 60. No presente estudo foi empregada a denominação GM para o farelo de glúten de milho com 60% ou maior teor de proteína.

O GM (Figura 4) é o resíduo desidratado resultado da separação do amido presente no endosperma dos grãos de milho. Apresenta, em b.s., aproximadamente, 60% de proteínas, 25-30% de carboidratos, 3-6% de lipídeos, 1% de fibras e 1-2% de cinzas (GIANNENAS et al., 2017). Conforme Ortiz-Martinez et al. (2017), a fração proteica do GM é constituída por, aproximadamente, 68% de zeína e 22% de glutelina. As proteínas do GM são fontes de metionina e cisteína, mas são deficientes em lisina e triptofano (ZHUANG et al., 2013). O GM é uma fonte rica em carotenos, em torno de 49-73 mg/kg e xantofilas (244-550 mg/kg) (LOY; LUNDY, 2019). No entanto, a composição química pode variar conforme a cultivar do grão, tipo de plantio e processamento industrial.

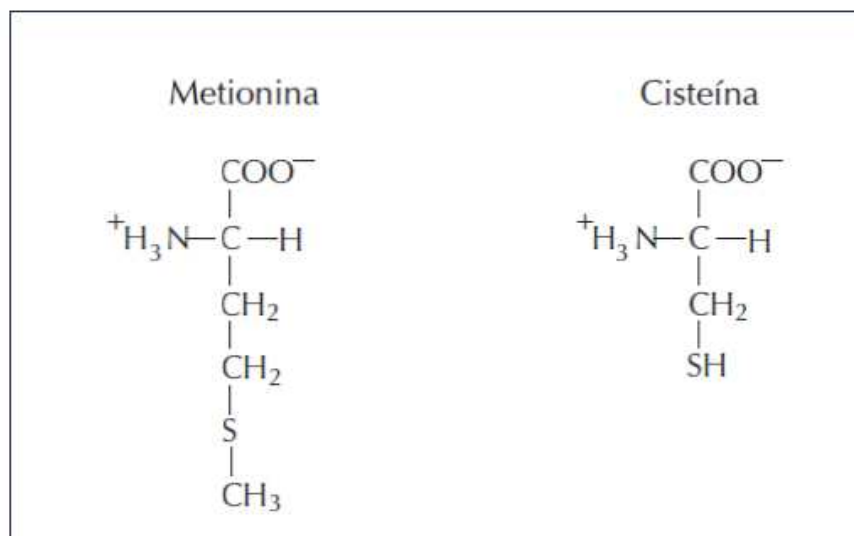
**Figura 4** – Farelo de glúten de milho desidratado em pó



Fonte: arquivo pessoal.

Os aminoácidos cisteína e metionina são os únicos que possuem enxofre na composição, sendo a cisteína resultado da metabolização da metionina. A metionina pode ser transformada em homocisteína, que, após, pode sofrer reação de transsulfuração para formar cisteína em proteínas de grãos (SOBCZYŃSKA-MALEFORA, 2019). O aminoácido cisteína é polar e hidrofílico, já a metionina é apolar e hidrofóbica. A cisteína tem um radical tiol (-SH) e a metionina tem o enxofre no meio de sua estrutura química (Figura 5) (ELANGO, 2020). Essa disposição do enxofre na estrutura química que resulta em características distintas para estes aminoácidos. O enxofre presente na cisteína atua como estruturador de proteínas e alimentos devido a capacidade de fazer ligações dissulfeto. Na indústria de alimentos, as ligações dissulfeto são essenciais para a formação e estruturação do glúten em produtos de panificação, auxiliando no amassamento da massa de farinha de trigo, além de aumentar a elasticidade da massa e conferir textura aos produtos (GASPARRE; ROSELL, 2022).

**Figura 5** – Estrutura química dos aminoácidos metionina e cisteína



Fonte: adaptado de Damodaran (2010).

Alguns pesquisadores estudaram a aplicação do GM em rações animais (vacas, cabras, camarão branco, cães e gatos), por ser fonte dos aminoácidos cisteína e metionina e as proteínas serem de fácil digestão e consideradas *by-pass* (de rápida digestão e absorção) (TAYLOR; LEMENAGER; STEWART, 2017; WU et al., 2020, LIN et al., 2023, SMITH; ALDRICH, 2023). Ozturk e Mert (2018) estudaram o GM microfluidizado como base para a produção de pães sem glúten de trigo e afirmaram que este material também pode ser investigado para aplicação em outros produtos na indústria alimentícia.

### 3. 4 Extrusão de Proteínas

A extrusão é uma das tecnologias mais eficientes para o processamento de alimentos desidratados, devido a não geração de resíduos e pouco consumo energético, quando comparados com a produtividade do processo, e a sua versatilidade, por poder ser aplicada a diversas matérias-primas (amido, proteínas, fibras) (FERNANDES et al., 2016; SÁ; MORENO; CARCIOFI, 2019). Industrialmente, a extrusão é utilizada para produzir uma gama de materiais alimentícios, como cereais matinais, salgadinhos,

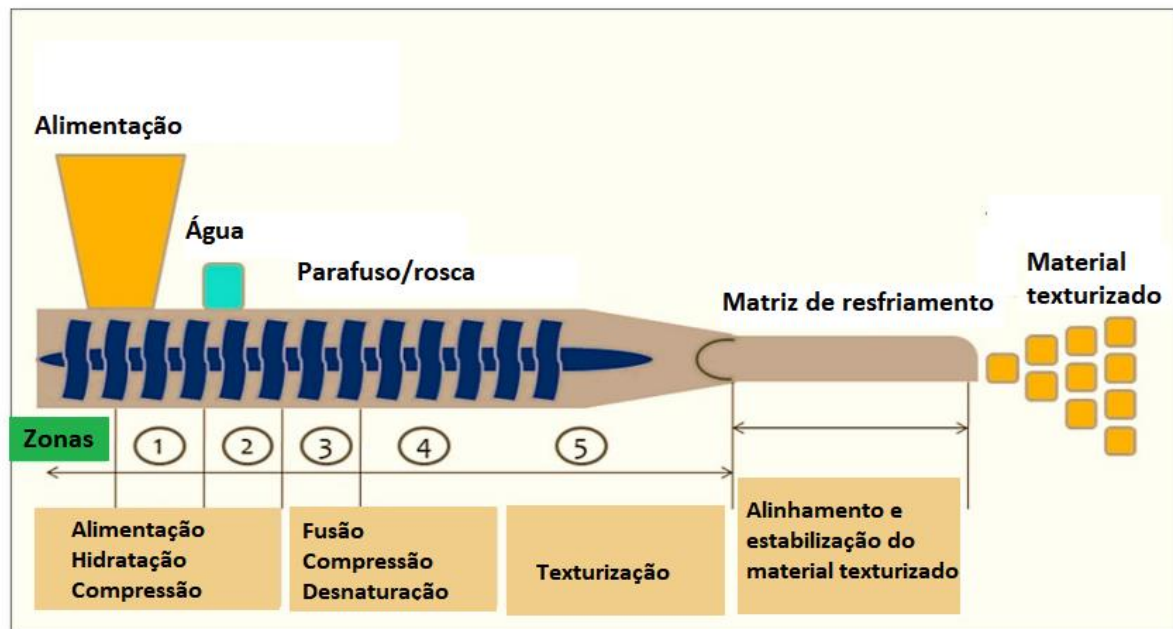
produtos crocantes, proteínas texturizadas, alimentos para bebês, além de ser utilizada em etapas de pré-processamento para a extração de óleo vegetal, despolimerização da celulose para fermentação alcoólica, contribui para o aumento da liberação de substâncias antioxidantes e melhora da digestibilidade enzimática das proteínas (DALBHAGAT et al., 2019; ZHOU et al., 2017; MOHAMED, 2023). A extrusão contribui para a esterilização dos alimentos e pode atuar na inativação de fatores antinutricionais (SÁ; MORENO; CARCIOFI, 2019).

Os extrusores podem conter um ou dois parafusos (ou roscas) que apresentam diferentes configurações e até quatro zonas de aquecimento (responsáveis pela alimentação, compressão, fusão e texturização do material) e, em alguns extrusores, uma zona de resfriamento (responsável, também, pela texturização do produto), para possibilitar a obtenção de produtos distintos com as características desejadas pelas indústrias e consumidores (Figura 6). As zonas 1, 2 e 3 são de suma importância para a homogeneização, cisalhamento e fusão do material, atuando juntamente com as zonas 4 e 5 para provocar a desnaturação e texturização do material com consequente formação dos produtos com composição uniforme (PRABHA et al., 2021). Para a mistura, homogeneização, fusão e bombeamento da matéria-prima destaca-se o parafuso rotativo, percorrendo todas as zonas, dentro de um barril estacionário. A ação do parafuso irá ocasionar a tensão de cisalhamento e a mistura intensa dos componentes (SINGH et al., 2021). O barril estacionário é aquecido por temperaturas elevadas, que podem variar na ordem de 100 – 260 °C, sendo mais utilizado o emprego de temperatura de até 140 °C para matérias-primas alimentícias (PRABHA et al., 2021).

Segundo Schmid et al. (2021) a extrusão é um processo de cozimento de uma matéria-prima previamente hidratada e pode ser classificada como cozimento por extrusão à baixa umidade (LMEC, 10-40% de água, v/v), comumente utilizada para materiais proteicos e amiláceos, e cozimento por extrusão à alta umidade (HMEC, acima de 60% de água, v/v) aplicada a carnes e produtos cárneos. A hidratação no processo LMEC e em produtos proteicos é essencial para manter um equilíbrio entre a desnaturação proteica e a agregação das proteínas (MOHAMED, 2023). Além disso, a água atua como plastificante reduzindo o ponto de fusão e melhorando a mobilidade da estrutura química (VERBEEK et al., 2010). O cisalhamento evita o realinhamento das proteínas até que elas sejam forçadas a atravessar a matriz de resfriamento, em que ocorre arrefecimento e despressurização, e os filamentos proteicos convertem-se em estruturas semelhantes a fibras. As fibras vão se tornando materiais com características de

extrusados à medida que resfriam após a saída da extrusora devido à expansão ocasionada pela evaporação da água (SINGH et al., 2021).

**Figura 6** – Esquema representativo de um extrusor de parafuso único



Fonte: adaptado de Singh et al. (2021).

Na saída do extrusor é utilizado um molde, com a finalidade de conferir forma ao material extrusado (Figura 7). Assim, para obtenção de *pellets*, ou snacks, empregam-se matrizes circulares, na quais há evaporação da água que formam vacúolos e expande o material, devido à redução da pressão interna para a atmosférica e da temperatura. A expansão é responsável pela textura final do alimento extrusado (DALBHAGAT et al., 2019). Os extrusados de amido passam por uma grande expansão, o que não ocorre nos extrusados proteicos, em que a expansão é menor e apresentam maior resistência a ruptura e a necessidade de algum processamento posterior para o consumo (ORDÓÑEZ, 2005).

As proteínas, ao serem transportadas pelo parafuso do extrusor, passam por alterações na estrutura molecular devido ao tratamento termodinâmico (CHEN; WEI; ZHANG, 2011). As mudanças estruturais ocorrem em duas etapas sucessivas que envolvem a desnaturação das subunidades proteicas e, posterior, formação de novas interações não covalentes (interações hidrofóbicas, van der Waals e ligações de hidrogênio) e covalentes (ligações dissulfeto), quando as proteínas possuem aminoácidos cisteína em sua estrutura (Figura 8) (LI et al., 2018; PIETSCH; EMIN; SCHUCHMANN,

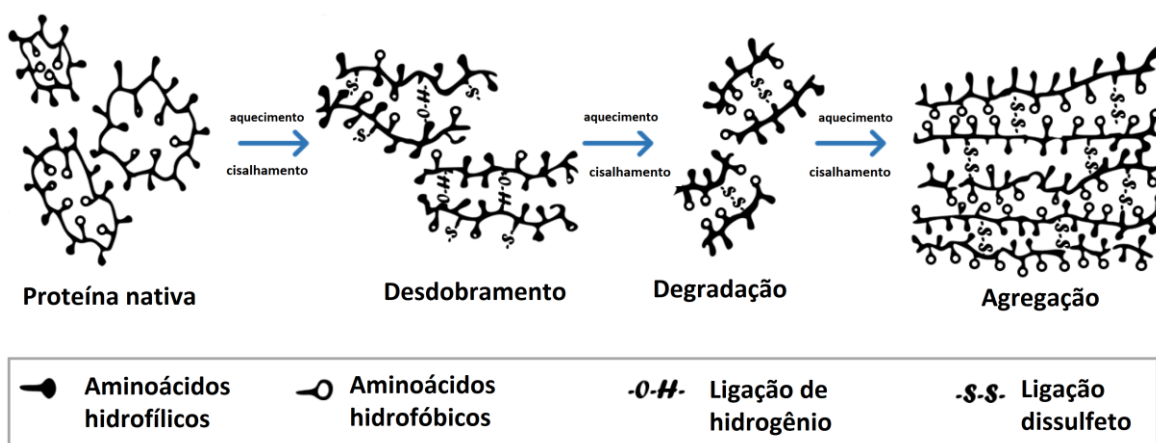
2017; PRUDÊNCIO-FERREIRA; ARÊAS, 1993). Durante a formação das interações proteína-proteína pode haver a formação de agregados proteicos, com diferentes índices de solubilidade em água, conforme a composição de aminoácidos e a organização estrutural do agregado. Contudo, os agregados não solúveis podem ser hidratados e reterem a água (WANG et al., 2017).

**Figura 7** – Modelos de matrizes responsáveis pelas formas do material extrusado



Fonte: Adaptado de Dalbhagat et al. (2019).

**Figura 8** – Possíveis alterações na estrutura proteica durante a extrusão



Fonte: Adaptado de Zahari et al. (2020).

Além da temperatura e a velocidade do parafuso durante o processo de extrusão, o teor de umidade e o estado físico da matéria-prima também são fatores importantes para as mudanças estruturais nas proteínas (SAMRAY et al., 2019). Lopes-da-Silva, Santos e Choupina (2016) descreveram que durante o processo de extrusão, as proteínas da soja são desnaturadas pelo calor e, posteriormente, sob ação do cisalhamento são comprimidas contra a parede do barril sendo estiradas formando um material constituído de fibras lineares, com aparência e textura semelhante às fibras musculares cárneas, podendo ser utilizado como análogo de carne. Segundo Pietsch et al. (2019) as amostras extrusadas de

proteína de soja, em temperatura de 100°C, não apresentaram fibras com orientação na direção do fluxo do material, que se tornou visível apenas com o aumento da temperatura da extrusão. Estes autores observaram que o mesmo comportamento ocorreu para a velocidade do parafuso e destacaram que essas diferenças influenciaram as características reológicas do material extrusado.

Além de alterações estruturais, o extrusado proteico pode sofrer alterações no valor nutricional, cor e aroma, por meio das reações de Maillard caso tenha a presença de açúcares redutores em sua composição química. A perda nutricional devido a esta reação é o resultado da destruição de aminoácidos, como a lisina. E, devido ao processamento por extrusão, pode haver perda nutricional em decorrência da formação de ligações cruzadas entre cadeias de proteínas que, eventualmente, reduzem a solubilidade e a digestibilidade das proteínas (HURRELL, 1990). A reação de Maillard provoca escurecimento do extrusado, cuja intensidade será resultado da taxa de umidade da amostra e da temperatura da extrusão. Quanto menor a umidade e maior a temperatura durante o processamento das proteínas, maior será o escurecimento do produto e as alterações de aroma e valor nutricional (LOPES-DA-SILVA; SANTOS; CHOUPINA, 2016).

Alguns pesquisadores verificaram que na extrusão de proteínas do milho, principalmente das zeínas, o teor de ligações dissulfetos e a alta hidrofobicidade de superfície dessas moléculas, devido à presença de aminoácidos apolares (leucina, prolina, alanina, glicina e valina, principalmente), podem ser alterados pelo processo (FEDERICI et al., 2020; ZHENG et al., 2014; ZHANG et al., 2022).

Selling (2010) observou que durante a extrusão de zeínas, a temperatura influenciou a desnaturação da proteína. Verificou que a 90°C a desnaturação proteica iniciou de forma moderada. Em 150°C foi confirmada a desnaturação da proteína devido ao alcance da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), em torno de 120°C. A partir de 220°C ocorreu a degradação do material proteico com alteração da estrutura secundária. O autor observou, também, que com a diminuição da umidade, em 5%, a temperatura de reticulação do material com outros componentes (água e agentes redutores) reduziu em, aproximadamente, 30°C. O autor sugere que materiais ricos em zeínas não sejam extrusados em temperaturas superiores a 160°C.

Conforme Mohamed (2023), a extrusão auxilia na posterior digestão das proteínas e amido, devido à alteração na conformação das moléculas, e no caso das proteínas, possibilita a exposição de sítios ativos para ação das enzimas digestivas, desde

que não haja agregação das moléculas de proteínas, que poderá dificultar a digestão. Dessa forma, o consumo de proteínas extrusadas pode ser interessante para pessoas que necessitam de rápida absorção de nutrientes sem que ocorra alteração no metabolismo (BRENNAN et al., 2013). Contudo, as proteínas extrusadas sofrem alterações nas suas propriedades funcionais e reológicas, devido a mudança estrutural, podendo apresentar menor solubilidade, mas melhores características emulsificantes e melhor capacidade de formação de gel (AFIZAH; RIVZI, 2014; MA et al., 2018). Por isso, é importante que sejam estudadas as propriedades funcionais tecnológicas ou tecnofuncionais de materiais proteicos extrusados.

### **3. 5 Propriedades funcionais tecnológicas ou tecnofuncionais de proteínas**

Funcionalidade é qualquer propriedade da proteína alimentar referente a suas características físico-químicas, que possam influenciar o desempenho destas moléculas em sistemas alimentares durante o processamento, armazenamento, preparo e consumo, não relacionada com as características nutritivas. As propriedades funcionais alteram, principalmente, fatores sensoriais nos alimentos, como a textura. Contudo, podem atuar modificando o comportamento físico dos ingredientes durante o processamento do produto (DAMODARAN, 2010).

As proteínas apresentam diversas funcionalidades a partir de distintos mecanismos e características moleculares que podem ser aplicadas em diferentes alimentos (Tabela 1). Tais funcionalidades estão relacionadas com fatores extrínsecos e intrínsecos. As características extrínsecas que afetam a funcionalidade proteica incluem: pH, temperatura, umidade, aditivos químicos, processamento mecânico, força iônica e enzimas. Os fatores intrínsecos referem-se a forma, tamanho, composição, sequência de aminoácidos, distribuição de taxas líquidas, razão entre hidrofobicidade e hidroflicidade, estrutura (primária, secundária, terciária ou quaternária) das proteínas e a capacidade de interagir com outros componentes moleculares (SÁ et al., 2022).

**Tabela 1** – Funcionalidades das proteínas em diferentes alimentos.

<b>Função</b>	<b>Propriedade físico-química e modo de ação</b>	<b>Alimento(s)</b>	<b>Exemplos de proteína de origem vegetal</b>
<b>Solubilidade</b>	Hidrofilicidade, ligação de hidrogênio e ionização de superfície e solvatação das proteínas.	Bebidas	Proteínas de soja, amêndoa e arroz
<b>Viscosidade</b>	Ligação à água, forma e tamanho hidrodinâmicos	Sopas, molhos para salada e molhos	Proteínas de soja
<b>Ligação à água</b>	Ligações de hidrogênio e hidratação iônica	Análogos de carne, bolos e produtos de confeitaria	Proteínas de soja e cereais
<b>Formação de gel</b>	Agregação térmica, enredamento e imobilização de água e formação de matriz de proteínas	Análogos de carne, produtos de confeitaria e sobremesas	Proteínas de sementes
<b>Coesão-adesão</b>	Interações iônicas e ligações de hidrogênio	Análogos de carne, massas, “snacks” extrusados e produtos de confeitaria	Proteínas de sementes
<b>Elasticidade</b>	Interações hidrofóbicas, ligações dissulfeto	Análogos de carne, produtos extrusados e produtos de confeitaria	Proteínas do glúten
<b>Emulsificação</b>	Hidrofilicidade, hidrofobicidade, formação de filme na interface óleo/água	Análogos de carne, sopas, molhos, bolos, sorvetes e molhos de salada	Proteínas de sementes
<b>Formação de espuma</b>	Hidrofilicidade, hidrofobicidade, formação de filme na interface ar/água	Sorvetes, mousses, bolos e sobremesas	Proteínas de sementes

Fonte: adaptado de Arntfield; Maskus (2011); Sá et al. (2022).

As propriedades funcionais proteicas podem ser incluídas em três grupos principais: propriedades de hidratação (relacionadas ao número de interações e ligações moleculares entre a proteína e a água), propriedades de superfície (relacionadas com as diferenças de conformação das proteínas, como a estabilidade e flexibilidade da cadeia proteica, facilidade de adaptação e mudanças no ambiente e padrão de distribuição dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na superfície da proteína) e propriedades hidrodinâmicas e reológicas (relacionada com mudanças físico-química nos alimentos). As propriedades de hidratação manifestam-se na absorção e retenção de água, no intumescimento, adesão, solubilidade e viscosidade dos produtos. O segundo e terceiro grupo são frequentemente relacionados com a precipitação e formação de gel, a formação de emulsões, a característica espumante e a tensão superficial do alimento (DAMODARAN, 2010).

A capacidade de hidratação das proteínas é afetada pelo pH, força iônica e conformação da proteína. A hidratação das proteínas influencia outras características tecnofuncionais, como a solubilidade, capacidade de formação de gel, formação de espuma e capacidade emulsificante dos alimentos (GOMES; SABRAL, 2022). Segundo Zhang et al. (2023) o aumento da temperatura pode contribuir para a capacidade de hidratação devido a exposição de grupos iônicos das proteínas. Entretanto, os autores observaram que temperatura, acima de 100°C, pode provocar desnaturação e, posterior, agregação das proteínas o que poderia diminuir sua capacidade de hidratação.

Se para a hidratação das proteínas em água é necessária a exposição de grupos hidrofílicos, o contrário ocorre para a ligação de óleo pelas proteínas, em que se necessita que haja exposição de grupos hidrofóbicos por meio da desnaturação proteica. A partir do aumento da capacidade de ligação de óleo pode-se utilizar a molécula de proteína, por exemplo, como carreadora de aromas (aromáticos lipossolúveis) nos produtos alimentícios (ZHANG et al., 2021).

Conforme Grossmann e Weiss (2021) a solubilidade das proteínas depende de vários fatores que influenciam as interações moleculares das proteínas e a entropia da mistura, sendo que, geralmente, moléculas menores têm a solubilidade favorecida. Os autores observaram, também, que baixa força iônica e pHs extremos favorecem a dissociação e a solubilidade, contudo, pH neutro e alta força iônica favorecem, o estado nativo das proteínas e resulta em solubilidade baixa. O estudo da solubilidade das proteínas é de suma importância, pois outras propriedades tecnofuncionais são

dependentes desta propriedade: emulsificação, aeração e formação de géis (SÁ et al., 2022).

A emulsão é um sistema heterogêneo, com dois líquidos imiscíveis, em que um é disperso no outro no formato de pequenas gotas. É classificada conforme a distribuição dos líquidos, ou seja, emulsão óleo em água, indicando que as gotas de óleo (fase dispersa) estão dispersas na água (fase contínua). Estas são encontradas em maionese, leite, creme, sopas e molhos (DICKISON; MCCLEMENTS, 1995). Para manter a emulsão estável usa-se um emulsificante (molécula anfifílica que interage com as duas fases da emulsão). Devido às características anfifílicas das proteínas, elas podem migrar espontaneamente para a interface óleo-água e atuar como emulsificante do alimento. Estando na interface as proteínas formam uma película altamente viscoelástica que suporta movimento e manipulação do produto durante a estocagem e consumo (DAMODARAN, 2010).

As proteínas podem apresentar capacidade de formação de espuma (aeração) atuando como surfactante, molécula com propriedades anfifílicas que interage com uma dispersão ar/água (GROSSMANN; WEISS, 2021). A espuma é formada por uma fase gasosa, uma fase líquida e um surfactante. Nesse caso, a proteína sofre desdobraimento e é adsorvida na interface gasosa-líquida podendo formar uma película ao redor das bolhas de ar e assim interagir com ambas as fases. Em semelhança com as demais propriedades descritas, a composição de aminoácidos das proteínas interfere nesta capacidade, sendo que a maior formação de espuma se deve a proteína com alta solubilidade na fase líquida e com facilidade para formar filme em torno das bolhas de ar (KINSELLA, 1981).

Conforme Murate e Prudêncio-Ferreira (1999) as propriedades funcionais dos alimentos, principalmente de alimentos rico em proteínas, podem ser modificadas e/ou melhoradas através de extrusão.

### **3. 5. 1 Propriedades funcionais tecnológicas de extrusados proteicos**

Os extrusados proteicos são, frequentemente, reduzidos a pó ou a pedaços, reidratados e adicionados como ingredientes em alimentos, podendo alterar as características químicas e funcionais do produto, por isso a importância do conhecimento das propriedades tecnofuncionais desse material (SCHMID et al., 2022).

Durante o processo de extrusão, o aumento da viscosidade da massa ocorre conforme há o aumento da proporção de proteínas no material, sendo relacionada à baixa

expansão do produto extrusado. O aumento da viscosidade é resultado da formação de interações inter e intramoleculares não covalentes. Essas interações durante a extrusão sofrem influência da quantidade de água e sua distribuição na estrutura. Tais condições associadas à temperatura, tempo de permanência e cisalhamento do extrusor afetam as propriedades tecnofuncionais solubilidade, capacidade de hidratação, capacidade emulsificante, capacidade de formação de gel e outras propriedades das proteínas (BECK; KNOERZER; ARCOT, 2017).

A extrusão de isolado proteico de ervilha resultou em redução da solubilidade e capacidade de formação de espuma, contudo melhorou a estabilidade da espuma e o índice de absorção de água (ZHANG et al., 2022). Menor solubilidade, após o processo de extrusão, também foi observado em proteínas de okara, sendo justificada por alterações estruturais das proteínas e formação de agregados proteicos insolúveis após o processo (YOSHIDA; DA SILVA; PRUDENCIO, 2022). Menor solubilidade proteica e capacidade de formação de espuma foi observado por Zhang et al. (2022) em isolado proteico de pera extrusado. Entretanto, os autores verificaram que houve aumento da capacidade emulsificante, sendo justificada por alterações na estrutura terciária e secundária das proteínas.

Wu (2001) investigou as propriedades emulsificantes do glúten de milho hidratado extrusado e notou que houve melhora destas propriedades em pH acima de quatro para o produto extrusado comparado ao não extrusado. Em glúten de milho desidratado, Zhang et al. (2023) notaram aumento da agregação proteica, como resultado do aumento das ligações covalentes dissulfeto com aumento da temperatura de extrusão. Bhattacharya e Hanna (1985) relataram que a extrusão de glúten de milho aumentou a digestibilidade e a capacidade de retenção de água do material. Na literatura há poucos relatos sobre as propriedades funcionais de extrusado de glúten de milho, portanto destaca-se a importância do estudo das alterações tecnofuncionais das proteínas desse material para ampliar a sua aplicação em alimentos e agregação de valor.

### **3. 6 Propriedades funcionais de saúde: peptídeos ativos**

As proteínas apresentam sequências de aminoácidos que são inativas, mas que após a hidrólise química, enzimática ou microbiológica apresentam bioatividade ao interagir com um receptor apropriado do corpo humano ou animal (DU; LI, 2022). As proteínas alimentares são os principais materiais de partida para a geração de peptídeos

ativos, estes possuem entre 2 e 20 aminoácidos e massa molecular menor que 6000 Da (MEISEL; FITZGERALD, 2003; SUN et al., 2004). Iwaniak, Darewicz e Minkiewicz (2018) e Du e Li (2022) descreveram que a bioatividade dos peptídeos se relaciona com várias funções do corpo humano como a redução da pressão arterial, a partir dos peptídeos inibidores da ação enzimática de conversão da angiotensina (ECA) EC 3.4.15.1 e redução dos níveis de glicose no sangue, a partir da ação de inibidores da dipeptidil peptidase IV (DPP IV) EC 3.4.14.5. Conforme Akbarian et al. (2022), os peptídeos ativos podem atuar, também, como agentes antioxidantes, antibacterianos, imunomoduladores e antitrombóticos.

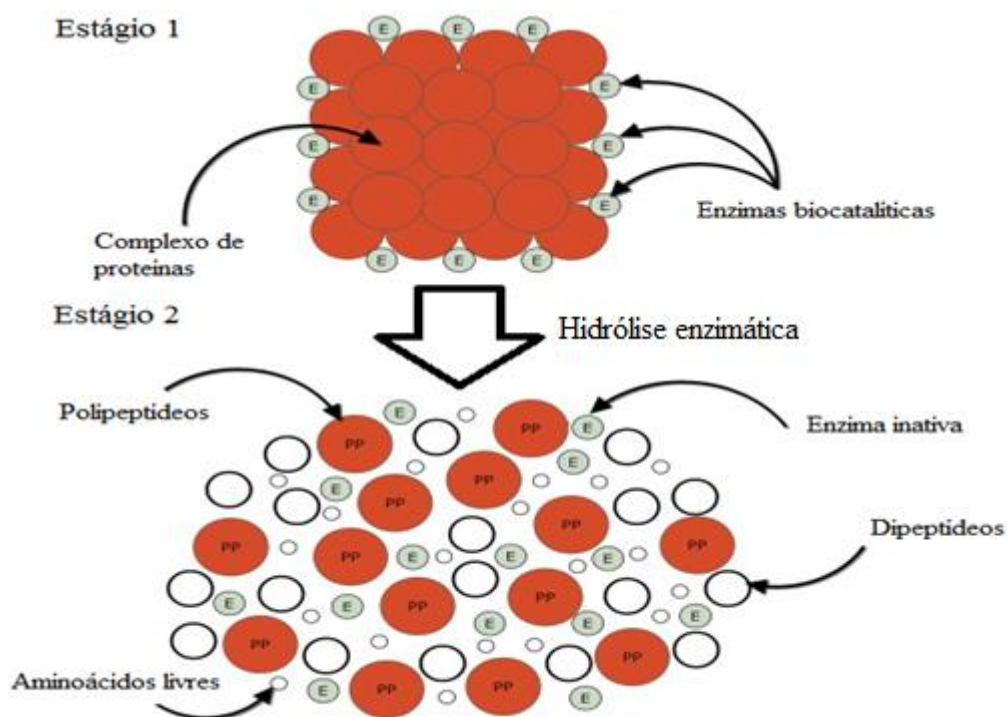
As vantagens da ingestão de peptídeos, do ponto de vista nutricional, relacionam-se a maior biodisponibilidade destas moléculas, menores efeitos alergênicos em relação as proteínas nativas e possibilidade de aplicação em medicamentos e alimentos (AKBARIAN et al., 2022). Pesquisadores vêm relatando que o peptídeo ativo pode ser empregado como ingrediente nos alimentos, auxiliando no tratamento de disfunções e doenças do organismo humano (TIDONA et al., 2009; IWANIAK; MINKIEWICZ; DAREWICZ, 2014; MÄKINEN et al., 2012) devido estes compostos serem atóxicos, mais seguros e não apresentarem efeitos colaterais quando comparados com inibidores sintéticos de funções do organismo (KUMAR et al., 2010).

A bioatividade dos peptídeos é dependente da natureza do substrato proteico, da especificidade da enzima e das condições de hidrólise (ABDELHEDI; NASRI, 2019). Conforme Nasri (2017), os peptídeos ativos podem ser produzidos por processos químicos, com uso de ácidos e bases para as reações, processos enzimáticos, usando enzimas proteolíticas, e processos microbiológicos, a partir da fermentação com bactérias proteolíticas. O uso de processos enzimáticos para hidrólise das proteínas em sequências de peptídeos requer condições específicas, como pH e temperatura controlados, sendo que estes parâmetros dependem da enzima selecionada (AKBARIAN et al., 2022). Contudo, este processo tem como vantagem não fazer uso de produtos químicos, como ocorre na hidrólise química. O processo enzimático pode gerar inúmeras sequências distintas de peptídeos, a partir da ação de diferentes enzimas, que podem ser aplicados em diversas funções biológicas, sendo essa uma vantagem perante o processo microbiológico de produção de peptídeos ativos, além disso, o processo microbiológico demanda mais tempo se comparado ao processo enzimático (NASRI, 2017).

O processo de obtenção de peptídeos ativos a partir da hidrólise enzimática ocorre conforme indicado na Figura 9. Na primeira etapa, as enzimas em estado nativo se

ligam ao complexo de proteínas. A partir da interação entre as enzimas e as proteínas inicia-se a reação de hidrólise enzimática. Na etapa 2, há a representação do processo após a ação das enzimas que clivam as proteínas em pontos específicos (relacionado com a especificidade enzimática), e ocorre a liberação de fragmentos de peptídeos com diferentes massas moleculares, alguns aminoácidos livres, e desativação das enzimas (SAADI et al., 2015).

**Figura 9** – Esquema representativo de hidrólise enzimática de proteína para obtenção de peptídeos ativos



Fonte: adaptado de Saadi et al. (2015).

O grau de hidrólise das proteínas (DH) depende da especificidade da enzima que é selecionada durante a produção dos peptídeos. Segundo Nasri (2017) e Du e Li (2022) as enzimas proteolíticas mais aplicadas são Alcalase® (preferência por clivar proteínas em locais onde há aminoácidos hidrofóbicos), Neutrase® (metalprotease, responsável por clivar o interior das proteínas com o metal cobre), da espécie *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens*, respectivamente, e Flavourzyme® (complexo de proteases e peptidases, que cliva as proteínas na porção N-terminal) da espécie *Aspergillus oryzae*.

Há, ainda, o uso de enzimas comumente encontradas no trato digestivo, como a tripsina, quimiotripsina e pepsina. Cavalcante et al. (2023) observaram que o uso da enzima tripsina, que é responsável pela clivagem das proteínas e peptídeos a partir da lateral do carbono dos resíduos de arginina e lisina, foi responsável pela liberação de peptídeos com ação anticancerígena da  $\beta$ -lactoglobulina e ausência de peptídeos alérgicos ao longo da digestão de soro de leite. Sutopo et al. (2023) verificaram que a hidrólise da proteína do alho com enzima quimiotripsina, que cliva as moléculas a partir da lateral da carboxila dos aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos (fenilalanina (Phe), tirosina (Try) e triptofano (Trp)), liberou peptídeos com atividade ECA. A pepsina A, presente na mucosa estomacal do porco, pode ser usada para clivar bandas de peptídeos que possuem Phe, Leu (leucina) e Glu (ácido glutâmico) na extremidade com a carboxila (DHAR et al., 2023).

### 3. 7 Abordagem integrada para peptídeos ativos

Antes do estudo *in vitro* e *in vivo*, as sequências de peptídeos do material a ser estudado e as possíveis ações destas podem ser verificadas por bancos de dados, através de estudo *in silico*. A vantagem do processo *in silico* é a economia de tempo e custo, e a possibilidade de verificar quais peptídeos têm ação biológica no organismo, proporcionando uma produção mais eficaz. A abordagem *in silico* é realizada a partir de métodos computacionais avançados, como o BLAST, o banco de dados BIOPEP e modelos quantitativos de relação estrutura-atividade (QSAR). Nas bases de dados podem ser observadas a sequência que um peptídeo expressa, nome do peptídeo (se possível), o comprimento de uma cadeia peptídica (expressa no número de resíduos de aminoácidos), fonte de origem, massa molecular e artigo de referência (IWANIAK et al., 2019; SARKER, 2022).

O BIOPEP-UWM é uma das ferramentas que auxiliam na avaliação de proteínas como fontes potenciais de peptídeos ativos. O BIOPEP-UWM possui dois bancos de dados de peptídeos, um apresenta mais 3.700 peptídeos com várias funções biológicas e o segundo que apresenta 480 peptídeos sensoriais, inclusive possuindo aminoácidos com características aromáticas (IWANIAK et al., 2016). Em fevereiro de 2019 foi adicionado um banco de dados com mais de 700 sequências de proteínas (IWANIAK et al., 2019). Além disso, a plataforma permite que a análise do potencial de uma proteína para fonte

de peptídeos ativos ocorra a partir do cálculo de seus discriminantes qualitativos e quantitativos (MINKIEWICZ et al., 2008).

Outro banco de dados de sequências de peptídeos ativos é o UniProt que fornece acesso a proteomas referentes a mais de 84 mil espécies com genomas completamente sequenciados (The UniProt Consortium, 2019). O banco extrai informações de publicações científicas e armazena na seção UniProtKB/Swiss-Prot da UniProt Knowledgebase. Estes dados descrevem informações funcionais na forma de resumos de sintaxe controláveis e de texto livre legíveis, como o Gene Ontology (GO) ou ChEBI (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2019). O UniProt é um banco de dados mais simples se comparado ao BIOPEP-UWM, mas o uso combinado dos dois pode ser interessante, pois uma sequência de peptídeos ativos pode estar relatada em apenas um desses bancos de dados de proteínas.

Segundo Sarker (2022), a abordagem *in silico* contribui para o conhecimento da relação estrutura-função do peptídeo o que permite prever a propriedade ativa de uma sequência específica de aminoácidos e, a partir disso, selecionar enzimas com a especificidade desejada para o peptídeo escolhido. Essa técnica foi utilizada para identificar peptídeos anti-COVID da microalga *Spirulina máxima*, além de identificar o encaixe molecular para compreender os efeitos inibitórios dos peptídeos da proteína spike do COVID-19 (MUBARAK ALI et al., 2021) trazendo economia de tempo e custo nas análises realizadas.

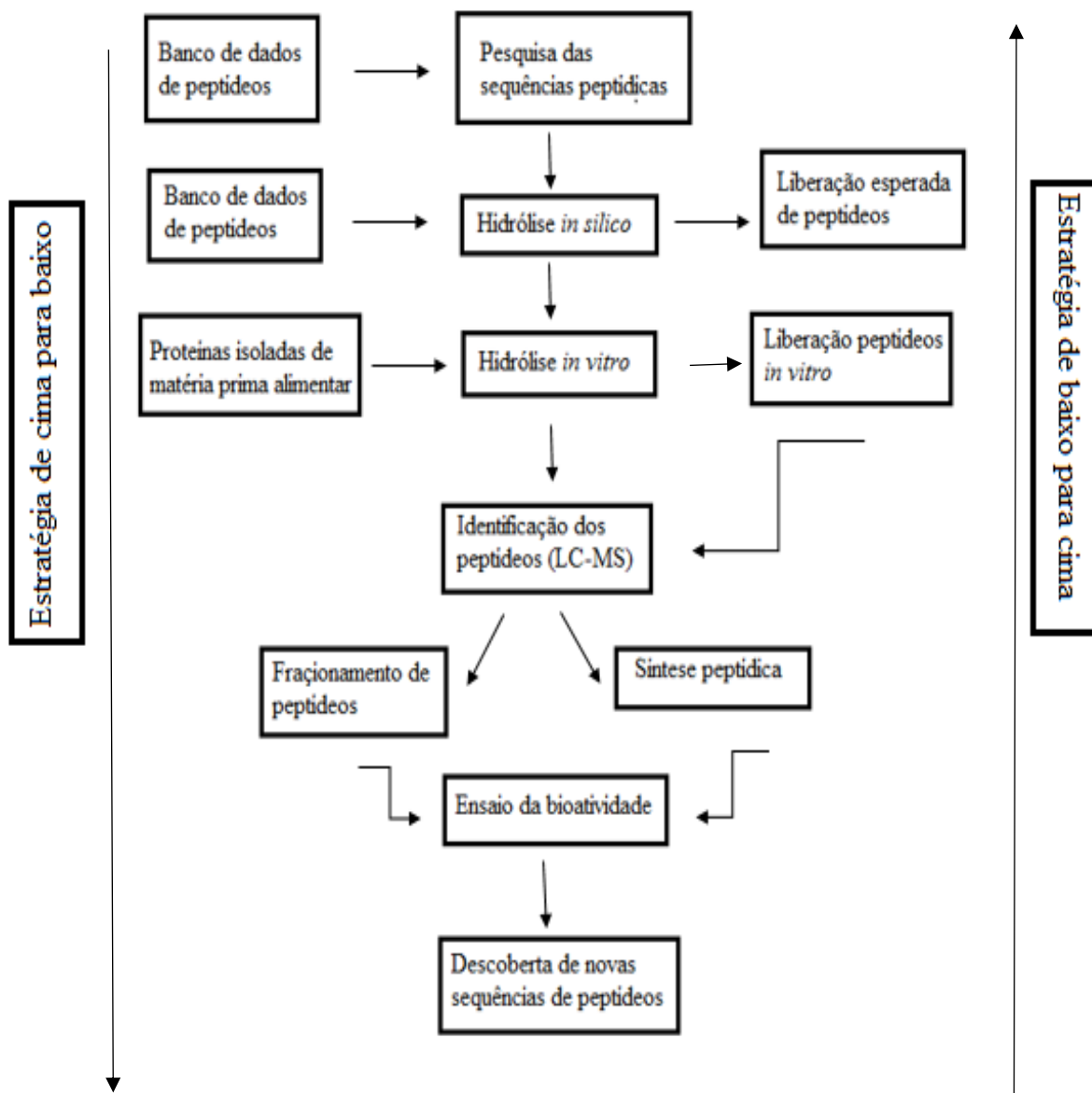
A determinação dessas características ocorre com base na especificidade da enzima e na sequência de reconhecimento, que são parâmetros importantes para estimar a atividade dos peptídeos (MINKIEWICZ et al., 2008). Estas ferramentas matemáticas auxiliam no estudo do que pode ser esperado no ensaio *in vitro* e *in vivo*. Iwaniak et al. (2019) descreveram que a abordagem *in silico* também pode ser usada após a hidrólise das proteínas *in vitro* para auxiliar na identificação dos peptídeos hidrolisados e prever as suas ações biológicas.

Entretanto, algumas considerações devem ser relatadas no estudo *in silico*. Os resultados podem ser diferentes dos resultados no estudo *in vitro* ou *in vivo*, pois o programa computacional não considera as condições de hidrólise, como o pH, temperatura, tempo e a natureza das interações protease-proteína e a disponibilidade da ligação peptídica (FITZGERALD et al., 2020; SARKER et al., 2022; DU; LI, 2022). Além disso, a ação dos peptídeos *in vitro* e *in vivo* podem variar devido à localização da enzima e do substrato em diferentes regiões intra e extracelulares, ao impacto dos

inibidores, à inacessibilidade de uma ligação peptídica do substrato para ataque enzimático e à interação do substrato com outras proteínas (RAWLINGS, 2009; ABD-TALIB et al., 2022).

Diante disso, Iwaniak et al. (2019) descreveram que o processo de abordagem integrada é interessante para relatar a atividade das proteínas. A abordagem integrada relaciona-se com o emprego de técnicas conjuntas *in silico* e *in vitro*, podendo ser feita análise *in silico* e, posterior *in vitro* (estratégia de cima para baixo) e análises *in vitro* e, posterior *in silico* (estratégia de baixo para cima) (Figura 10). As técnicas necessárias para esta abordagem envolvem a hidrólise, identificação dos fragmentos de peptídeos e o ensaio da atividade, podendo resultar na descoberta de novas sequências peptídicas com ações biológicas. Estas novas sequências podem ser incluídas no banco de dados BIOPEP-UWM.

**Figura 10** – Abordagem híbrida que integra métodos *in silico* e *in vitro* para produção de peptídeos ativos a partir de alimentos



Fonte: adaptado de Iwaniak et al. (2019).

### 3. 8 Peptídeos ativos no milho

Os peptídeos naturalmente presentes no milho e isolados do glúten de milho podem ser caracterizados como seguros para o consumo e facilmente absorvíveis, além de apresentarem baixa massa molecular (< 6 kDa). Algumas pesquisas têm relatado as propriedades ativas, como antioxidantes (JIANG et al., 2020), anti-hipertensivos

(WONGNGAM et al., 2023), hepatoprotetor (WU et al., 2014), álcool-metabolismo-facilitador (YU et al., 2013), anti-inflamatório (TEHSEEN et al., 2022), atividades anticancerígenas (HU et al., 2022), antimicrobianas (LIANG et al., 2018) e antidiabéticas, a partir da ação da dipeptidil peptidase IV (EC 3.4.14.5) (HIRA et al., 2009).

A produção dos hidrolisados proteicos de milho é feita, principalmente, por via de hidrólise enzimática alterando-se as condições da reação, como especificidade enzimática, tempo e grau de hidrólise e razão enzima/substrato. Estas condições contribuem para determinar a composição dos peptídeos e suas atividades biológicas (WANG et al., 2014; MALUMBA et al., 2008). Conforme Tavano (2013) a clivagem da cadeia peptídica por proteases pode produzir diversos produtos ativos, dependente da taxa de hidrólise que diminui com o aumento do tempo de hidrólise até estabilidade enzimática.

Wongngam et al. (2023) observaram que a hidrólise de GM com Alcalase® revelou que frações peptídicas com massa molecular entre 3 e 10 kDa apresentaram peptídeos com ação inibitória de ECA. Huang et al. (2021) descreveram que peptídeos do GM com ação inibitória de ECA apresentavam forte amargor. Para evitar esta característica, os autores utilizaram hidrólise enzimática combinada (Flavourzyme-Protamex) após aplicação de pré-tratamento com ultrassom e concluíram que quanto menor a proporção do aminoácido leucina no peptídeo menor o amargor da molécula, sendo que a presença ou ausência deste aminoácido não influenciou na capacidade de inibição ECA dos peptídeos.

Huang et al. (2011) verificaram que uma fração peptídica do GM com massa molecular menor que 3 kDa apresentou efeito anti-hipertensivo. Suh, Wang e Lee (1999) observaram que a sequência de aminoácidos “prolina-asparagina-glicina-glutamina-tirosina-tirosina” foi responsável por reduzir em 6 mmHg a pressão arterial em 15 minutos após a ingestão. Sequências menores de peptídeos, leucina-arginina-prolina e alanina-tirosina, isolados do GM foram capazes de reduzir a pressão arterial em 15 mmHg e 9,5 mmHg, respectivamente (MIYOSHI et al., 1991; YANG et al., 2007).

A ação antioxidante dos peptídeos é resultado da presença de aminoácidos hidrofóbicos, como tirosina, fenilalanina, leucina e alanina, devido a propriedade destes compostos de doarem hidrogênio (ZHOU et al., 2015). Wang et al. (2014) analisaram peptídeos de milho hidrolisados pela enzima alcalase® e protamex® e observaram que a enzima alcalase têm capacidade de hidrolisar peptídeos que apresentaram maior capacidade antioxidante quando estudados pela técnica de DPPH, ABTS e radical

hidroxila. Yu et al. (2023) observaram que peptídeos de GM hidrolisados com uma combinação de Alcalase, Flavorzyme e Protamex apresentaram capacidade antioxidante devido a presença da sequência de aminoácidos arginina-tirosina-leucina-leucina.

Os peptídeos de milho com massa molecular menor que 5 kDa podem contribuir para diminuir os níveis de dano hepático, como necrose e lesões no fígado (MA et al., 2015). Yamaguchi et al. (1997) descreveram que o consumo de alanina, leucina e prolina forneceram conteúdo de NAD<sup>+</sup>, que contribuiu para retardar a taxa de absorção de álcool através da membrana gastrointestinal. Chanajon et al. (2023) notaram que GM hidrolisado com pepsina e pancreatina foram eficazes na inibição de prolil oligopeptidase (POP) contribuindo para menores chances de degradação de peptídeos neuroativos.

Ainda, segundo, Hu et al. (2022) peptídeos hidrolisados do GM com a enzima neutrase podem reduzir a oxidação lipídica e o crescimento de células cancerígenas HepG2. Li et al. (2013) observaram que os peptídeos de milho podem inibir as células tumorais, a partir do fortalecimento do sistema imune do hospedeiro. Além dos peptídeos aumentarem o índice de baço e, conseqüentemente, prolongar o tempo de sobrevivência de camundongos com tumor H22. Por fim, Hira et al. (2009) e Mochida, Hira e Hara (2010) sugerem que os peptídeos de milho podem apresentar atividade plasmática do DPP-IV e estimular a secreção de GLP-1 ativo. No entanto, mais estudos ainda são necessários para comprovar estas funções.

## REFERÊNCIAS

ABDELHEDI, O.; NASRI, M. Basic and recent advances in marine antihypertensive peptides: production, structure-activity relationship and bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 543-557, 2019.

ABIMILHO. Associação brasileira das indústrias de milho. Milho: O cereal que enriquece a alimentação humana, 2015. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/milho/cereal>>. Acesso em: 07 maio 2019.

AFIZAH, M. N.; RIVZI, S. S. H. Functional properties of whey protein concentrate texturized at acidic pH: effect of extrusion temperature. **LWT – Food Science and Technology**, v. 57, p. 290 – 298, 2014.

AKBARIAN, M.; KHANI, A.; EGHBALPOUR, S.; UVERSKY, V. N. Bioactive peptides: synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1445, 2022.

ANDERSON, T. J.; LAMSAL, B. P. Development of new method for extraction of  $\alpha$ -Zein from corn gluten meal using different solvents. **Cereal chemistry**, v. 88, n. 4, p. 356-362, 2011.

ARNTFIELD, S. D.; MASKUS, H. D. Peas and other legume proteins. *In*: Phillips, G. O.; Williams, P. A. **Handbook of Food Proteins**. Sawston: Woodhead Publishing, p. 233 -266, 2011.

BECK, S. M.; KNOERZER, K.; ARCOT, J. A Review: Protein-Fortified low Moisture extrusion. **Reference Module in Food Science**. 2017.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 40° revised ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 2009.

BHATTACHARYA, M.; HANNA, M. A. Extrusion processing of wet corn gluten meal. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 5, p. 1508 – 1509, 1985.

BRENNAN, M. A.; DERBYSHIRE, E.; TIWARI, B. K.; BRENNAN, C. S. Ready-to-eat snack products: the role of extrusion technology in developing consumer acceptable and nutritious snacks. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 5, p. 893 - 902, 2013.

CALLEGARO, M. G.; DUTRA, C. B.; HUBER, L. S.; BECKER, L. V.; ROSA, C. S.; KUBOTA, L. H.; HECKTHEUR, L. H. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber of corn products. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 2, p. 271-274, 2005.

CAVALCANTE, K. N.; FEITOR, J. F.; MORAIS, S. T. B.; NASSU, R. T.; AHRNÉ, L. M.; CARDOSO, D. R. Impact of UV-C pretreatment on  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysis by trypsin: production and bioavailability of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v. 142, 105650, 2023.

CHANAION, P.; TIAN, F.; NOISA, P.; ROYTRAKUL, S.; YONGSAWATDIGUL, J. Corn gluten meal peptides inhibit prolyl oligopeptidase and modulate  $\alpha$ -synuclein aggregation in KCl-treated SH-SY5Y cells. **Journal of Functional Foods**, v. 104, 105501, 2023.

CHEN, F. L.; WEI, Y. M.; ZHANG, B. Chemical cross-linking and molecular aggregation of soybean protein during extrusion cooking at low and high moisture content. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 957–962, 2011.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Produção e balanço de oferta e demanda de grãos. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 09 jun. 2023.

DALBHAGAT, C. G.; MAHATO, D. K.; MISHRA, H. N. Effect of extrusion processing on physicochemical, functional and nutritional characteristics of rice and rice-based products: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 85, p. 226 – 240, 2019.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas. *In*: FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**, 4<sup>o</sup> ed. Editora Artmed, 2010.

DHAR, H.; VERMA, S.; DOGRA, S.; KATOCH, S.; VIJ, R.; SINGH, G.; SHARMA, M. Functional attributes of bioactive peptides of bovine milk origin and application of in silico approaches for peptide prediction and functional annotations. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2023.

DICKINSON, E.; MCCLEMENTS, D. J. **Advances in Food Colloids**. Springer science & business media, Ed. 1. 1995. 333 p.

DU, Z.; LI, Y. Review and perspective on bioactive peptides: a roadmap for research, development, and future opportunities. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 9, 100353, 2022.

ELANGO, R. Methionine nutrition and metabolism: insights from animal studies to inform human nutrition. **The Journal of Nutrition**, v. 150, n. 1, p. 2518S-2523S, 2020.

EMBRAPA. Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. Agência Embrapa de informação tecnológica: Moagem, Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fdyq37d402wx5a900e1ge5pdism0z.html>. Acesso em: 07 maio 2019.

FEDERICI, E.; JONES, O. G.; SELLING, G. W.; TAGLIASCO, M.; CAMPANELLA, O. H. Effect of zein extrusion and starch type on the rheological behavior of gluten-free dough. **Journal of Cereal Science**, v. 91, 102866, 2020.

FERNANDES, A. F.; MADEIRA, R. A. V.; CARVALHO, C. W. P.; PEREIRA, J. Physical and sensory characteristics of pellets elaborated with different levels of corn grits and whey protein concentrate. **Ciência e Agrotecnológica**, v. 40, n. 2, p. 235 – 243, 2016.

GASPARRE, N.; ROSELL, C. M. Wheat gluten: a functional protein still challenging to replace in gluten-free cereal-based foods. **Cereal Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 243-255, 2023.

GIACOMELLI, D.; MONEGO, B.; DELAGUSTIN, M. G.; BORBA, M. M. de.; RICALDE, S. F.; FACCO, E. M. P.; SIVIERO, J. Composição nutricional das farinhas de milho pré-cozida, moída à pedra e da preparação culinária “polenta”. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 3, p. 415 – 420, 2012.

GIANNENAS, I.; BONOS, E.; ANESTIS, V.; FILIOUSSIS, G.; PAPANASTASIOU, D. K.; BARTZANAS, T.; PAPAIOANNOU, N.; TZORA, A.; SKOUFOS, I. Effects of protease addition and replacement of soybean meal by corn gluten meal on the growth of broilers and on the environmental performances of a broiler production system in Greece. **PloS One**, v. 12, n. 1, e0169511, 2017.

GIOIA, D. L.; CUQ, B.; GUILBERT, S. Thermal properties of corn gluten meal and its proteic componentes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 24, n. 4, p. 341 – 350, 1999.

GOMES, A.; SOBRAL, P. J. A. Plant protein-based delivery systems: an emerging approach for increasing the efficacy of lipophilic bioactive compounds. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 60, 2022.

HAMMANN, F.; SCHMID, M. Determination quantification of molecular interactions in protein films: a review. **Materials**, v. 7, n. 12, p. 7975 – 7996, 2014.

HERTZLER, S. R.; LIEBLEIN-BOFF, J. C.; WEILER, M.; ALLGEIER, C. Plant proteins: assessing their nutritional quality and effects on health and physical function. **Nutrients**, v. 12, n. 12, p. 3704, 2020.

HIRA, T.; MOCHIDA, T.; MIYASHITA, K.; HARA, H. GLP-1 secretion is enhanced directly in the ileum but indirectly in the duodenum by a newly identified potent stimulator, zein hydrolysate, in rats. **The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 297, n. 4, p. 663–671, 2009.

HU, R.; XU, J.; QI, G.; WANG, W.; SUN, X. S.; LI, Y. Antioxidative hydrolysates from corn gluten meal may effectively reduce lipid oxidation and inhibit HepG2 cancer cell growth. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 7, 100252, 2022.

HUANG, S.; LI, Y.; LI, C.; RUAN, S.; QU, W.; DING, Y.; YE, X.; MA, H. Ultrasound-assisted multi-enzymatic system for the preparation of ACE inhibitory peptides with low bitterness from corn gluten meal. **Processes**, v. 9, n. 12, p. 2170, 2021.

HUANG, W. H.; SUN, J.; HE, H.; DONG, H.; LI, J. Antihypertensive effect of corn peptides, produced by a continuous production in enzymatic membrane reactor, in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 968–973, 2011.

HURREL, R. F. **Influence of the Maillard reaction on the nutritional value of foods.** *In: The Maillard Reaction in Food Processing. Human Nutrition and Physiology*, p. 245 – 258, 1990.

ISMAIL, N. I.; HASHIM, Y. Z. H.; JAMAL, P.; OTHMAN, R.; SALLEH, H. M. Production of cysteine: approaches, challenges and potential solution. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 3, n. 3, p. 95 -101, 2014.

IWANIAK, A.; DAREWICZ, M.; MINKIEWICZ, P. Peptides derived from foods as supportive diet components in the prevention of the metabolic syndrome. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 63 – 81, 2018.

IWANIAK, A.; DAREWICZ, M.; MOGUT, D.; MINKIEWICZ, P. Elucidation of the role of *in silico* methodologies in approaches to studying bioactive peptides derived from foods. **Journal of Functional Foods**, v. 61, 103486, 2019.

IWANIAK, A.; MINKIEWICZ, P.; DAREWICZ, M. Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 114 - 134, 2014.

IWANIAK, A.; MINKIEWICZ, P.; DAREWICZ, M.; SIENIAWSKI, K.; STAROWICZ, P. BIOPEP database of sensory peptides and amino acids. **Food Research International**, v. 85, p. 155-161, 2016.

JIANG, X.; CUI, Z.; WANG, L.; XU, H.; ZHANG, Y. Production of bioactive peptides from corn gluten meal by solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* MTCC5480 and evaluation of its antioxidant capacity *in vivo*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 131, 109767, 2020.

KINSELLA, J. E. Functional Properties of Proteins: Possible Relationships Between Structure and Function in Foams. **Food Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 273–288, 1981.

KINSELLA, J. E.; DAMODARAN, S.; GERMAN, J. B. **Physicochemical and functional properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins.** *In: New Protein Foods: Seed Storage Proteins* (Altshul, A. M.; Wilcke, H. L., Eds.), Academic Press, London, p. 107-179, 1985.

KUMAR, R.; SHARMA, R. J.; KUMAR, A.; BARUWA, A. Pharmacological review on natural ACE inhibitors. **Der Pharmacia Lettre**, v. 2, n. 2, p. 273 – 293, 2010.

LI, J. T.; ZHANG, J.; HE, H.; MA, Z.; NIE, Z.; WANG, Z.; XU, X. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 51, p. 297–305, 2013.

LI, S.; BU, T.; ZHENG, J.; LIU, L.; HE, G.; WU, J. Preparation, bioavailability, and mechanism of emerging activities of Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 4, p. 1097 – 1110, 2019.

LI, T.; GUO, X.; XHU, K.; ZHOU, H. Effects of alkali on protein polymerization and textural characteristics of textured wheat protein. **Food Chemistry**, v. 239, p. 579–587, 2018.

LIANG, Q.; CHALAMAIAH, M.; REN, X.; MA, H.; WU, J. Identification of new anti-inflammatory peptides from zein hydrolysate after simulated gastrointestinal digestion and transport in Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 1114–1120, 2018.

LIN, H.; DENG, Y.; ZHU, D.; YANG, Q.; ZHOU, X.; TAN, B.; FENG, L.; CHI, S. Effects of partially replacing fishmeal with corn gluten meal on growth, feed utilization, digestive enzyme activity, and apparent nutrient digestibility for juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, 1162599, 2023.

LOPES, J. F. F.; RAMOS, A. P.; ROMERO, J. T. Water diffusivity, sulfur dioxide, and lactic acid in corn kernels during steeping for the wet milling process. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 257-263, 2006.

LOPES-DA-SILVA, M. de. F.; SANTOS, L.; CHOUPINA, A. A extrusão em tecnologia alimentar: aplicações, características dos produtos, composição e tendências futuras. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 39, n. 1, p. 04-14, 2016.

LOY, D. D.; LUNDY, E. L. Chapter 23 – Nutritional properties and feeding value of corn and its coproducts. **Corn – Chemistry and Technology**, n. 3, p. 633- 659, 2019.

MA, Z.; HOU, T.; SHI, W.; LIU, W.; HE, H. Inhibition of hepatocyte apoptosis: An important mechanism of corn peptides attenuating liver injury induced by ethanol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 22062–22080, 2015.

MÄKINEN, S.; JOHANNSON, T.; GERD, E. V.; PIHLAVA, J. M.; PIHLANTO, A. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant properties of rapeseed hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 575 – 583, 2012.

MALUMBA, P.; VANDERGHEM, C.; DEROANNE, C.; BÉRA, F. Influence of drying temperature on the solubility, the purity of isolates and the electrophoretic patterns of corn proteins. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 564–572, 2008.

MAPA. Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. Milho, Brasília, DF, 2015. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/sumarios-executivos-de-produtos-agricolas/milho.pdf/view>>. Acesso em: 07 maio 2019.

MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1289 – 1295, 2003.

MINKIEWICZ, J.; DZIUBA, J.; IWANIAK, A.; DZIUBA, M.; DAREWICZ, M. BIOPEP and other programs for processing bioactive peptide sequences. **Journal of AOAC International**, v. 91, p. 965 – 980, 2008.

MIYOSHI, S.; ISHIKAWA, H.; KANEKO, T.; FUKUI, F.; TANAKA, H.; MARUYAMA, S. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an  $\alpha$ -zein hydrolysate. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1313–1318, 1991.

MOCHIDA, T.; IRA, T.; HARA, H. The corn protein, zein hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats. **Endocrinology**, v. 151, n. 7, p. 3095–3104, 2010.

MOHAMED, I. O. Interaction of starch with some food macromolecules during the extrusion process and its effect on modulating physicochemical and digestible properties. A review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 5, 100294, 2023.

MUBARAKI, A. D.; MOHAMED, S. J.; STHAYA, R.; IRFAN, N.; KIM, J. W. An evidence of microalgal peptides to target spike protein of COVID-19: In silico approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 160, 105189, 2021.

MURATE, E. H.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de concentrado protéico extrusado de sementes de girassol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 2, 1999.

NASRI, M. Chapter Four - Protein hydrolysates and biopeptides: production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A Review. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 81, p. 109 – 159, 2017.

NERY, C.; ALBERTO, C. Estimativa de maio prevê safra recorde de 305,4 milhões de toneladas em 2023. 2023. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/37135-estimativa-de-maio-preve-safra-recorde-de-305-4-milhoes-de-toneladas-em-2023>. Acesso em: 25 jul. 2023.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. 1ª ed., Porto Alegre, Editora Artmed. 2005. 293 p.

ORTIZ-MARTINEZ, M.; MEJIA, E. G. de.; GARCÍA-LARA, S.; AGUILAR, O.; LOPEZ-CASTILLO, M.; OTERO-PAPPATHEODOROU, J. T. Antiproliferative effect of peptide fractions isolated from a quality protein maize, a white hybrid maize, and their derived peptides on hepatocarcinoma human HepG2 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 36–48, 2017.

OZTURK, O. K.; MERT, B. The effects of microfluidization on rheological and textural properties of gluten-free corn breads. **Food Research International**, v. 105, p. 782 – 792, 2018.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. Circular Técnica n. 75. Sete Lagoas, dezembro, Embrapa, 2006, p. 1- 6.

PAPALIA, Í. da. S.; LONDERO, P. M. G. Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos. **Ciência Rural**, v. 45, n. 3, p. 552-559, 2015.

PIETSCH, V. L.; BÜHLER, J. M.; KARBSTEIN, H. P.; EMIN, M. A. High moisture extrusion of soy protein concentrate: influence of thermomechanical treatment on protein-protein interactions and rheological properties. **Journal of Food Engineering**, v. 251, p. 11 – 18, 2019.

PIETSCH, V. L.; EMIN, M. A.; SCHUCHMANN, H. P. Process conditions influencing heat gluten polymerization during high moisture extrusion of meat analog products. **Journal of Food Engineering**, v. 198, p. 28–35, 2017.

PRABHA, K.; GHOSH, P.; ABDULLAH, S.; JOSEPH, R. M.; KRISHNAN, R.; RANA, S. S.; PRADHAN, R. C. Recent development, challenges, and prospects of extrusion technology. **Future Foods**, v. 3, 100019, 2021.

PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H.; ARÊAS, J. A. G. Protein-protein interactions in the extrusion of soya at various temperatures and moisture contents. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 2, p. 378–381, 1993.

RAUSCH, K. D.; ECKHOFF, S. R. Maize dry milling. Elsevier, p. 1 – 15, 2016.  
RAWLINGS, N. D. A large and accurate collection of peptidase cleavages in the MEROPS database. **Database (Oxford)**, 2009.

SÁ, A. G. A.; LAURINDO, J. B.; MORENO, Y. M. F.; CARCIOFI, B. A. M. Influence of emerging technologies on the utilization of plant proteins. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022.

SÁ, A.; MORENO, Y.; CARCIOFI, B. Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 20, p. 3367 – 3386, 2020.

SAADI, S.; SAARI, N.; ANWAR, F.; HAMID, A. A.; GHAZALI, H. M. Production, biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 80 – 116, 2015.

SABELLI, P. A.; LARKINS, B. A. The development of endosperm in grasses. **Plant Physiology**, v. 149, p. 14 – 26, 2009.

SAETAE, D.; SUNTORNSUK, W. Toxic compound, anti-nutritional factors and functional properties of protein isolated from detoxified *Jatropha curcas* L. seed cake. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 1, p. 66 – 77, 2010.

SAMRAY, M. N.; MASATCIOGLU, T. M.; KOKSEL, H. Bread crumbs extrudates: a new approach for reducing bread waste. **Journal of Cereal Science**, v. 85, p. 130 – 136, 2019.

SANTOS, F. A. Glúten de milho na alimentação de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, n. 3, p. 79-100, 2004.

SARKER, A. A review on the application of bioactive peptides as preservatives and functional ingredients in food model systems. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 8, e16800, 2022.

SCHMID, E.; FARAHNAKY, A.; ADHIKARI, B.; TORLEY, P. J. High moisture extrusion cooking of meat analogs: a review of mechanisms of protein texturization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 21, n. 6, p. 4573-4609, 2022.

SCHMID, E.; FARAHNAKY, A.; ADHIKARI, B.; TORLEY, P. J. High moisture extrusion cooking of meat analogs: A review of mechanisms of protein texturization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, p. 1 – 37, 2022.

SCHROEDER, J. W. Optimizing the level of wet corn gluten feed in the diet of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 3, p. 844-851, 2003.

SELLING, G. W. The effect of extrusion processing on Zein. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 12, p. 2241 – 2249, 2010.

SETHI, M.; SINGH, A.; KAUR, H.; PHAGNA, R. K.; RAKSHIT, S.; CHAUDHARY, D. P. Expression profile of protein fractions in the developing kernel of normal, Opaque-2 and quality protein maize. **Scientific Reports**, v. 11, p. 2469, 2021.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, p. 171-192, 2001.

SINGH, M.; TRIVEDI, N.; ENAMALA, M. K.; KUPPAM, C.; PARIKH, P.; NIKOLOVA, M. P.; CHAVALI, M. Plant-based meat analogue (PBMA) as a sustainable food: a concise review. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 4, 2021.

SMITH, S. C.; ALDRICH, C. G. Evaluation of corn-fermented protein as a dietary ingredient in extruded dog and cat diets. **Translational Animal Science**, v. 7, n. 1, 2023.

SOBCZYŃSKA-MALEFORA, A. Chapter 11 – Methods for assessment of folate (Vitamin B<sub>9</sub>). **Laboratory Assessment of Vitamin Status**, p. 219-264, 2019.

STRAZZI, S. Derivados do milho são usados em mais de 150 diferentes produtos industriais. *Visão Agrícola*, n. 13, 2015. Disponível em: <[https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/VA\\_13\\_Industrializacao-artigo4.pdf](https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/VA_13_Industrializacao-artigo4.pdf)>. Acesso em: 16 jun. 2019.

SUH, H. J.; WHANG, J. H.; LEE, H. A peptide from corn gluten hydrolysate that is inhibitory toward angiotensin I converting enzyme. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 12, p. 1055– 1058, 1999.

SUN, J.; HE, H.; XIE, B. J. Novel antioxidant peptides from fermented Mushroom *Ganoderma lucidum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6646 – 6652, 2004.

SUTOPO, C. C. Y.; AZNAM, N.; ARIANINGRUM, R.; HSU, J. Screening potential hypertensive peptides using two consecutive bioassay-guided SPE fractionations and

identification of an ACE inhibitory peptide, DHSTAVW (DW7), derived from pearl garlic protein hydrolysate. **Peptides**, v. 167, 171046, 2023.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1– 11, 2013.

TAYLOR, E. G.; LEMENAGER, R. P.; STEWART, K. R. Using corn gluten feed in post-partum diets of young beef cows to optimize reproductive performance. **Translational Animal Science**, v.1, n. 3, p. 296 – 303, 2017.

TEHSEEN, A.; AHMAD, N.; NISA, M. U.; SAEED, F. Optimization of bioactive peptides production in multigrain flakes and their antioxidative and inflammatory activity. **Food Science and Technology**, v. 42, e40722, 2022.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, v. 47, 2019.

TIDONA, F.; CRISCIONE, A.; GUASTELLA, A. M.; ZUCCARO, A.; BORDONARO, S.; MARLETTA, D. Bioactive peptides in dairy products. **Italian Journal of Animal Science**, v. 8, n. 3, p. 315 – 340, 2009.

USDA. Milho e soja: projeções para a campanha 2023/2024 USDA – junho de 2023. Disponível em: [https://www.3tres3.com.br/noticias-sector-suinicola/milho-e-soja-projec%C3%B5es-para-a-campanha-2023-2024-usda-%E2%80%93-junho-de-2023\\_3463/#:~:text=A%20produ%C3%A7%C3%A3o%20mundial%20de%20milho,\(1.150%2C7%20Mt\)](https://www.3tres3.com.br/noticias-sector-suinicola/milho-e-soja-projec%C3%B5es-para-a-campanha-2023-2024-usda-%E2%80%93-junho-de-2023_3463/#:~:text=A%20produ%C3%A7%C3%A3o%20mundial%20de%20milho,(1.150%2C7%20Mt).). Acesso em: 25 jul. 2023.

VACLAVIK, V. A.; CHRISTIAN, E. W. **Chapter 1: Evaluation of Food Quality**. Essentials of Food Science, Food Science Text Series. New York: Springer, 2007.

VERBEEK, C. J. R., VAN DEN BERG, L. E. Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 295, p. 10–21, 2010.

WANG, K.; LI, C.; WANG, B.; YANG, W.; LUO, S.; ZHAO, Y.; JIANG, S.; MU, D.; ZHENG, Z. Formation of macromolecules in wheat gluten/starch mixtures during twin-screw extrusion: effect of different additives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 15, p. 5131–5138, 2017.

WANG, Y.; CHEN, H.; WANG, J.; XING, L. Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate–chitosan beads. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1682– 1690, 2014.

WONGNGAM, W.; HAMZEH, A.; TIAN, F.; ROYTRAKUL, S.; YONGSAWATDIGUL, J. Purification and molecular docking of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides derived from corn gluten meal hydrolysate and from in silico gastrointestinal digestion. **Process Biochemistry**, v. 129, p. 113-120, 2023.

- WU, J.; ZHANG, X.; WANG, R.; WANG, M.; HE, Z.; TAN, Z.; JIAO, J. Replacing corn grain with corn gluten feed: effects on the rumen microbial protein synthesis, functional bacterial groups and epithelial amino acid chemosensing in growing goats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 270, 114684, 2020.
- WU, Y. V. Emulsifying activity and emulsion stability of corn gluten meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 1223 – 1227, 2001.
- WU, Y.; PAN, X.; ZHANG, S.; WANG, W.; CAI, M.; LI, Y.; YANG, F.; GUO, H. Protective effect of corn peptides against alcoholic liver injury in men with chronic alcohol consumption: A randomized double-blind placebo-controlled study. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 1, p. 192–198, 2014.
- XUE, Y.; WARBURTON, M. L.; SAWKINS, M.; ZHANG, X.; SETTER, T.; XU, Y.; GRUDLOYMA, P.; GETHI, J.; RIBAUT, J.; LI, W.; ZHANG, X.; ZHENG, Y.; YAN, J. Genome-wide association analysis for nine agronomic traits in maize under well-watered and water-stressed conditions. **Theoretical and applied genetics**, v. 126, n. 10, p. 2587 – 2596, 2013.
- YAMAGUCHI, M.; NISHIKIORI, F.; ITO, M.; FURUKAWA, Y. The effects of corn peptide ingestion on facilitating alcohol metabolism in healthy men. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, v. 61, n. 9, p. 1474– 1481, 1997.
- YANG, Y.; TAO, G.; LIU, P.; LIU, J. Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7891–7895, 2007.
- YASUMATSU, K.; SAWADA, K.; MORITAKA, S.; MISAKI, M.; TODA, J.; WADA, T.; ISHII, K. Whipping and emulsifying properties of soybean products. **Journal Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, n. 5, p. 719-927, 1972.
- YOSHIDA, B. Y.; DA SILVA, P. R. C.; PRUDENCIO, S. H. Soybean residue (okara) modified by extrusion with different moisture contents: Physical, chemical, and techno-functional properties. **Food Science and Technology International**. 2022.
- YU, G. C.; HE, H.; LI, J.; HUANG, W. Ultrafiltration preparation of potent bioactive corn peptide as alcohol metabolism stimulator in vivo and study on its mechanism of action. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 161–167, 2013.
- YU, X.; CHEN, Y.; QI, Z.; CHEN, Q.; CAO, Y.; KONG, Q. Preparation and identification of a novel peptide with high antioxidant activity from corn gluten meal. **Food Chemistry**, v. 424, 136389, 2023.
- ZAHARI, I.; FERAWATI, F.; HELSTAD, A.; AHLSTRÖM, C.; ÖSTBRING, K.; RAYNER, M.; PURHAGEN, J. K. Development of high-moisture meat analogues with Hemp and Soy protein using extrusion cooking. **Foods**, v. 9, n. 6, p. 772, 2020.
- ZHANG, B.; KANG, X.; CHENG, Y.; CUI, B.; EL-ATY, A. M. A. Impact of high moisture contents on the structure and functional properties of pea protein isolate during extrusion. **Food Hydrocolloids**, v. 127, 107508, 2022.

ZHANG, J.; KANG, D.; ZHANG, W.; LORENZO, J. M. Recent advantage of interactions of protein-flavor in foods: perspective of theoretical models, protein properties and extrinsic factors. **Trends in Food Science & Technology**, v. 111, p. 405-425, 2021.

ZHANG, Y.; HE, Z.; XU, M.; ZHANG, X.; CAO, S.; HU, Y.; LUAN, G. Physicochemical properties and protein structure of extruded corn gluten meal: implication of temperature. **Food Chemistry**, v. 399, 133985, 2023.

ZHENG, X.; LIU, X.; YU, S.; WANG, X.; MA, Y.; YANG, S.; JING, S. Effects of extrusion and starch removal pretreatment on zein proteins extracted from corn gluten meal. **Cereal Chemistry**, v. 91, n. 5, p. 496 – 501, 2014.

ZHOU, C.; HU, J.; MA, H.; YAGOUB, A. E. A.; YU, X.; OWUSU, J.; MA, H.; QIN, X. Antioxidant peptides from corn gluten meal: orthogonal design evaluation. **Food Chemistry**, v. 187, p. 270 – 278, 2015.

ZHOU, Q. C.; LIU, N.; FENG, C. X. Research on the effects of papain co-extrusion on pea protein and enzymolysis antioxidant peptides. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 6, p. e13301, 2017.

ZHUANG, H.; TANG, N.; DONG, S.; SUN, B.; LIU, J. Optimisation of antioxidant peptide preparation from corn gluten meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 13, p. 3264 – 3270, 2013.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O material e métodos estão descritos nos três artigos científicos apresentados no próximo item, **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão foram redigidos na forma de três artigos científicos e estão apresentados nos subitens de 5. 1 a 5. 3.

## 5. 1 Artigo Científico 1

Apresentado conforme as normas da revista científica: Peptides.

### **Bioactive peptides from corn (*Zea mays* L.) with the potential to decrease the risk of developing chronic non-communicable diseases: *in silico* analysis**

#### **Abstract**

Studies have demonstrated that corn (*Zea mays* L.) proteins, mainly  $\alpha$ -zein, have the potential to act on therapeutic targets related to chronic non-communicable diseases, such as high blood pressure and type 2 diabetes mellitus. Enzymatic hydrolysis of proteins present in foods can result in a great diversity of peptides with different structures. In view of this scenario, this study aimed to identify, from *in silico* analysis, the possibility of obtaining peptides with potential biological activity from  $\alpha$ -zein, the major storage protein of corn, using the UniProtKB, BIOPEP, and PeptideRanker databases. A review of available research articles showing evidence of the bioactive properties of corn peptides through *in vitro* assays was also carried out. The highest number of occurrences identified through *in silico* analysis of peptide fragments was related to inhibition of angiotensin-converting enzyme, followed by inhibition of dipeptidyl peptidase IV and dipeptidyl peptidase III. Several drugs currently used for the treatment of hypertension and type 2 diabetes mellitus act by inhibiting these enzymes, suggesting that corn peptides might have potential as alternative agents. In scientific studies, bioactive peptides were most frequently evaluated for their antioxidative action.

**Keywords:** antioxidant, angiotensin-converting enzyme, biological activities, DPP IV, DPP III, zein.

#### **Introduction**

Proteins are molecules composed of amino acids linked by peptide bonds. Proteins can play physiological roles related to health maintenance, transmission of nerve impulses, muscle formation, and hormonal actions, among others (Akharume et al., 2021). From a food technology perspective, food proteins have different characteristics, such as water and oil absorption capacity, solubility, and foam formation, depending on different mechanisms and molecular characteristics that might be intrinsic or extrinsic to

the molecule itself. Extrinsic factors that affect protein functionality include pH, temperature, humidity, chemical additives, mechanical processing, ionic strength, and presence of enzymes. Intrinsic characteristics include molecular shape, size, composition, amino acid sequence, distribution of net charges, hydrophobicity/hydrophilicity ratio, folding structure (primary, secondary, tertiary, and quaternary), and ability to interact with other molecular components (Akharume et al., 2021).

Food proteins also have different roles in human health. Processes such as gastrointestinal digestion, microbiological hydrolysis, and chemical hydrolysis can break peptide bonds, releasing fragments called peptides. Biologically active peptides are defined as inactive fragments present in protein sequences that show bioactivity after hydrolysis and interaction with an appropriate receptor in the human organism (Okoye et al., 2022).

Peptides naturally present in corn, isolated from corn gluten or zein, are safe for consumption, can be easily absorbed, and have low molecular mass (<6 kDa) (Trinidad-Calderón et al., 2021). Numerous investigations reported that corn proteins possess bioactive properties, including antioxidant (Zhou et al., 2015), antihypertensive (Qu et al., 2022), hepatoprotective (Wu et al., 2014), anti-inflammatory (Mochizuki et al., 2010), anticancer (Ortiz-Martinez et al., 2017), antimicrobial (Liang et al., 2018), and dipeptidyl peptidase (DPP) IV (EC 3.4.14.5) inhibitory (Hira et al., 2009) activities.

Cereals that may help prevent chronic non-communicable diseases, such as corn, are an important part of a healthy diet. According to the World Health Organization (2023), 41 million of deaths worldwide was caused by non-communicable diseases (cardiovascular diseases, chronic respiratory diseases, cancers, and diabetes). Diabetes and hypertension are highly associated and are considered global public health problems because of their high incidence. Estimates from the International Diabetes Federation (IDF, 2023) indicate that there are 537 million people with diabetes worldwide, the most common being type 2 diabetes mellitus, which accounts for about 90% of cases. As for hypertension, the incidence is even higher, affecting 1.3 billion people in 2019 (DNT Risk Factor Collaboration (NCD-RisC), 2021).

Biologically active peptides isolated from natural sources may help reduce the risk of chronic diseases and reduce adverse drug actions, in addition to contributing to early treatment of diabetes and hypertension. Peptide sequences that are responsible for specific biological responses can be predicted by *in silico* tools, reducing the cost and time required for the development of novel compounds (Yeo and Shahidi, 2021). Recently,

databases such as UniProtKB (The UniProt Consortium 2019) and BIOPEP-UWM (Minkiewicz et al., 2019) have been used to confirm peptide sequences and predict bioactivity (Díaz-Gómez et al., 2020).

In this study, scientific predictions were made based on data available on UniProtKB, BIOPEP-UWM, and PeptideRanker databases to identify potentially active peptides in the corn (*Zea mays* L.) reserve protein prolamin by *in silico* approach. The biological activities identified *in silico* were compared with literature data published in the last 10 years in the Wiley, Medline/PubMed, and CAPES databases.

### **Corn proteins**

According to the National Corn Growers Association (2021), global corn production reached 1.21 billion tons in 2020-2021. Corn is the main source of industrial starch and used as a raw material in the production of several food products, such as cornmeal, corn flour, corn flakes, hominy, and polenta; this staple crop forms the basis of human and non-human animal diets in several countries (Revilla et al., 2021). The importance of corn in human diet is related to the nutritional properties of the grain: it contains 72.3% total carbohydrates (60% of which is starch), 11.2% proteins, 4.6% lipids, 1.5% total minerals, and 1.35% fibers (Budak and Aydemir, 2018).

Industrial processing of corn is carried out by dry or wet routes. Dry processing is used to obtain products such as corn flour, snacks, and breakfast cereals, whereas wet processing can be used to produce starch, corn syrup, glucose, dextrin, and corn gluten meal (Ribeiro et al., 2019). Corn gluten meal is the dehydrated residue resulting from separation of starch, having high protein content (about 68%). Zeins, proteins belonging to the group of prolamins, are a source of methionine and cysteine but have low amounts of lysine and tryptophan (Loy and Lundy, 2019; Zhuang et al., 2013). Corn gluten meal contains about 27% glutelin and 1.2% albumins and globulins (Zheng et al., 2015).

The protein fraction of corn gluten meal is formed by about 68% zein and 28% glutelin (Ortiz-Martinez et al., 2017). However, proximate composition may vary according to grain cultivar, crop system, and industrial processing. Zeins can be divided into  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -zeins, which differ in solubility and ability to form disulfide bonds (Li and Song, 2020; Coleman and Larkins, 1999). The major form found in corn is  $\alpha$ -zein, corresponding to 80% of total zeins in raw material. Corn  $\alpha$ -zeins can be divided into two classes with different molecular weights, 22 and 24 kDa, known as Z19 and Z22, respectively.  $\beta$ -Zein, which represents 10% of total zeins in corn, has a molecular mass

of 15 kDa.  $\gamma$ -Zein can have a molecular mass of 16, 27, or 50 kDa and  $\delta$ -zein can have a molecular mass of 10 or 18 kDa (Li and Song, 2020).

Commercially available zeins are poorly soluble in water but soluble in ethanol, acetone, and alkaline solutions (pH greater than 10), and their fractions have different solubilities in different solutions (Hudson, 1997).  $\alpha$ -Zein is soluble in 70–95% ethanol,  $\beta$ -zein is soluble in 60% ethanol and insoluble in 95% ethanol. Alcoholic solutions containing reducing agents are used for solubilization of  $\gamma$ -zein.  $\delta$ -Zein has a similar solubility to  $\alpha$ -zein (Shukla and Cheryan, 2001). Nonthanum et al. (2012) reported that the  $\gamma$ -zein fraction has a lower proportion of hydrophobic amino acids than the  $\alpha$ -zein fraction, with the ratio of hydrophilic to hydrophobic amino acids being 1.22 and 0.92, respectively. Kasaai (2018) described that the low solubility of zein in water is related to the globular structure of the protein and a relevant presence of non-polar amino acids (including leucine, alanine, and proline), which make up to 50% of the protein. Given its amino acid composition, zein is classified as a hydrophobic protein.

### **Bioactive peptides**

Bioactive peptides are generated mainly from food proteins and have between 2 to 20 amino acids and a molecular mass of less than 6 kDa (Zaky et al., 2021). Zaky et al. (2021) described that peptides exert a positive effect on several body functions, lowering blood pressure, inhibiting the enzymatic action of angiotensin-converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1), lowering blood glucose levels, and inhibiting DPP IV. According to Hou et al. (2023), bioactive peptides can also act as antioxidant, antibacterial, immunomodulatory, and antidiabetic agents.

The advantages of ingesting peptides, as compared to proteins, are related to their lower molecular mass, less complex structure, and increased digestibility by gastrointestinal enzymes (Hou et al., 2023; Kitts and Weiler, 2003; Yuan and Kitts, 1991). As stated by Kumar et al. (2010), peptides are non-toxic and safer and cause fewer side effects compared to synthetic inhibitors.

### ***Production of bioactive peptides***

Bioactive peptides can be produced by chemical processes based on acids and bases, enzymatic methods using proteolytic enzymes, and microbiological processes involving fermentation by proteolytic bacteria (Akbarian et al., 2022). Enzymatic processes for hydrolysis of proteins to peptide sequences require specific conditions, such

as controlled pH and temperature. Optimum parameters depend on the enzyme used. Enzymatic hydrolysis has the advantage of precluding the use of chemicals, which is not possible in chemical hydrolysis. Enzymatic routes can generate distinct peptide sequences with the ability to modulate different biological functions. Compared with enzymatic methods, microbiological methods are less versatile and require longer processing times (Akbarian et al., 2022).

Ulug et al. (2021) noticed that new methods are being developed to produce bioactive peptides, such as high hydrostatic pressure processing, ultrasound, microwave-assisted extraction, and subcritical water hydrolysis. The high hydrostatic pressure technique is particularly interesting because, by combining high pressures with low temperatures, it is possible to decrease the impact on protein and peptide conformation.

Tian et al. (2020) stated that ultrasound can increase the conversion of proteins to peptides and decrease the time required for hydrolysis because of the influence of mechanical waves on protein structure, mainly related to the breaking of non-covalent bonds. Peptide extraction by microwave techniques involves the transfer of energy from microwaves to molecular interactions by mechanisms of dipole rotation and ionic conduction (Ulug et al., 2021).

Ulug et al. (2021) reported that subcritical water hydrolysis at temperatures of 100 to 374 °C and pressures lower than 22 MPa (the critical point of water) is interesting method for extraction of peptides from food proteins because it does not generate waste. Zhang et al. (2018) demonstrated that zein protein treated by this method efficiently released peptides.

### ***Enzymatic hydrolysis of protein***

The production of bioactive peptides by enzymatic hydrolysis occurs in two steps. In the first step, enzymes are in their native state and bind to the protein complex. Enzymatic hydrolysis proceeds after interaction between enzymes and proteins. In the second step, the enzyme cleaves the protein at specific points (according to enzyme specificity) and releases peptide fragments with different molecular weights as well as some free amino acids (Saadi et al., 2015).

The degree of protein hydrolysis and the characteristics of the resulting peptides depend on enzyme specificity. According to Wang et al. (2018), the proteases most used in *in vitro* studies for simulation of gastrointestinal digestion are pepsin, pancreatin, and chymotrypsin. Trypsin is responsible for cleaving proteins and peptides from the carbon

side of arginine and lysine residues. Chymotrypsin cleaves proteins and peptides from the carboxyl side of aromatic and hydrophobic amino acids (phenylalanine, tyrosine, and tryptophan). Pepsin, present in the stomach mucosa of pigs, can be used to cleave bonds of peptides that contain phenylalanine, leucine, or glutamic acid at the carboxyl end (Nasri, 2017). Peterle et al. (2020) described that the enzyme subtilisin cleaves peptide bonds between large uncharged amino acid residues.

### **Type 2 diabetes mellitus, arterial hypertension, and oxidative stress**

Chronic hyperglycemia, diagnosed by a fasting glucose level above 126 mg/dL, can result in a metabolic disease known as type 2 diabetes mellitus, which is characterized by insulin resistance. In this case, muscle, fat, and liver cells do not respond adequately to insulin, resulting in difficulty absorbing glucose into the blood (ADA, American Diabetes Association, 2021; Takahashi et al., 2021). According to Saeedi et al. (2019), more than 370 million people worldwide have type 2 diabetes mellitus. Bioactive compounds present in drugs marketed for the control of diabetes, such as sitagliptin and alogliptin, act by inhibiting the enzyme DPP IV or mimicking incretins, which are hormones responsible for stimulating insulin secretion by pancreatic  $\beta$  cells in the presence of glucose. The most important incretins are glucagon-like peptide (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) (Berraquero-García et al., 2023; Mochida et al., 2010). Peptides with DPP IV inhibition properties can maintain incretin activity and promote insulin secretion, contributing to the management of diabetes (Takahashi et al., 2021).

The enzyme DPP III plays crucial roles in the endogenous system related to pain modulation and reduction of oxidative stress. Furthermore, DPP III was shown to contribute to the activation of transcription factor Nrf2, one of the importance factors to regulate the expression of molecules that have an anti-inflammatory and antioxidant role, such as NAD(P)H and NQO1 (Abramić and Agić, 2022).

High blood pressure, also known as hypertension, is defined as sustained elevation of systolic/diastolic blood pressure to levels above 140 and/or 90 mmHg. This condition must be managed closely to reduce the risk of cardiovascular diseases. Physiological control of blood pressure depends on ACE, which participates in the regulation of the renin–angiotensin–aldosterone system and the kallikrein–kinin system. The ACE enzyme is responsible for converting angiotensin I to angiotensin II, which promotes the release of aldosterone and reactive oxygen species, causing an increase in blood pressure.

Consequently, ACE inhibitors,  $\alpha$  and  $\beta$  receptor blockers, and angiotensin II receptor antagonists contribute to maintaining normal blood pressure and decreasing the risk for hypertension and cardiovascular disease (Heart Association, 2019; Xu et al., 2021).

Reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anions, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen, are naturally produced by the body under homeostasis. However, in excess, ROS can lead to the emergence of numerous degenerative diseases (e.g., cardiovascular diseases, chronic obstructive pulmonary disease, chronic kidney disease, neurodegenerative diseases, cancer, and diabetes) because of their strong interaction with essential regulatory components of cells (Liu et al., 2020; Garcia et al., 2020). Consumption of a diet rich in antioxidant compounds is recommended to minimize the deleterious effects of ROS (Tonin et al., 2020).

### ***In vitro* evidence of health benefits associated with corn bioactive peptides**

Díaz-Gómez et al. (2020) selected three peptide sequences based on the analysis of data available in BIOPEP-UWM. The sequences were named 19ZP1 (FNQLAALNSAAYLQQQQLLPFSQLA), 19ZP2 (QLADVSPAFLTQQQLLPFYLHAM), and 19ZP3 (AYLQAQQLLPFNQLVRSPAA). The authors conducted *in silico* study and found that the probability of the selected peptides exhibiting anticancer activities was below 0.01 because of limitations in cell penetration. Accordingly, no anticancer activity was detected in *in vitro* studies. On the other hand, antioxidant and ACE inhibitory activities were identified both in the *in silico* and in the *in vitro* study. Sharma et al. (2022) described an ACE inhibitory action of  $98.76 \pm 1.28\%$  on alcalase hydrolyzed corn peptides, with the amino acid sequences represented by DPANLPWG, FDFFDNIN, WNGPPGVF, and TPPFHLPPP.

Lin et al. (2011) analyzed the ACE inhibitory potential of corn gluten peptides produced using an enzyme mix (*Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*) and found an  $IC_{50}$  of 0.082 mg/mL in an *in vitro* assay after purification of the peptide fraction. The authors reported that purification of alanine–tyrosine dipeptide decreased the  $IC_{50}$  to 0.037 mg/mL. This value is close to the  $IC_{50}$  of captopril (0.036 mg/mL), a synthetic drug for ACE inhibition, as determined by Ibrahim et al. (2023).

Wu et al. (2022) observed that corn peptides contributed to prevent myocardial damage in rats during excessive swimming exercise. Huang et al. (2011) noted that the peptide fraction of corn gluten meal with a molecular mass lower than 3 kDa had

antihypertensive effects. A shorter peptide, A-Y, isolated from corn gluten meal, was shown to reduce blood pressure by 15 mmHg (Yang et al., 2007).

The antioxidant properties of peptides are related to hydrophobic amino acids, such as tyrosine, phenylalanine, leucine, and alanine, an effect stemming from the ability of these compounds to donate hydrogen (Zhou et al., 2015). Wang et al. (2014) analyzed corn peptides hydrolyzed using the commercial enzymes Alcalase<sup>®</sup> and Protamex<sup>®</sup>. The authors found that Alcalase<sup>®</sup> can release peptides with greater antioxidant capacity by the DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>+</sup>, and hydroxyl radical techniques as compared with peptides produced by Protamex<sup>®</sup>. Kristinsson and Rasco (2000) described that Alcalase<sup>®</sup>, a promising enzyme for peptide preparation, is produced by Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark) via *B. licheniformis* fermentation. Protamex<sup>®</sup> is a complex of proteases obtained from *B. licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens* by submerged fermentation for food protein hydrolysis applications (Novozymes, 2013). A study found that a combination of alcalase and trypsin immobilized on a calcium–quinine–alginate transporter was able to hydrolyze corn proteins to highly stable peptides (Wang et al., 2014).

Zhou et al. (2012) reported that corn peptides with a molecular mass of 1 to 3 kDa exhibited high antioxidant capacity. According to Wang et al. (2015), the sequence Y-F-C-L-T present in corn gluten meal exhibits excellent DPPH<sup>•</sup> scavenging activity. Some peptide sequences from corn gluten meal, such as FPLEMMPF, QQPQPW, CSQAPLA, and GLLLPH, have also been reported to be excellent antioxidants (Jin et al., 2016; Wang et al., 2016; Wang et al., 2014; Zheng et al., 2006). Hu et al. (2020) studied the hydrolysis of corn gluten proteins *in vitro* using three distinct enzymes, namely papain, ficin, and bromelain, and observed that the resulting peptides showed antioxidant potential. However, antioxidant action was dependent on the enzyme and hydrolysis conditions applied.

### ***In vivo* evidence of health benefits associated with corn bioactive peptides**

Li et al. (2019) described that the peptides hydrolyzed from corn silk (stigma) extract showed ACE inhibitory activity *in vivo*, reducing the blood pressure of rats by  $36.78 \pm 13.25$  mmHg after 1 h of injection. Guo et al. (2020) analyzed corn germ meal peptides hydrolyzed in an enzyme membrane reactor and observed that rats treated with the peptides had a decrease in blood pressure of 18.22 mmHg compared with the control group.

According to Liu et al. (2022) the bioactive peptides resulting from the degradation of zein present an angiogenic response in mice, contributing to tissue regeneration when applied to an injector biomaterial, contributing to confirming the biological activity of these compounds. Wang et al. (2022) reported that zein peptides exhibited liver enzyme activities including alcohol dehydrogenase, acetaldehyde dehydrogenase, and endogenous antioxidant enzymes, in addition to improving glutathione and triacylglycerol levels.

Hira et al. (2009) reported that papain-hydrolyzed zein induced strong secretion of GLP-1 in the ileum of anesthetized rats. Peptide administration decreased DPP IV activity by 26.8%, resulting in a reduction in plasma glucose levels through a 3.1-fold increase in GLP-1 release and a 6.3-fold increase in insulin secretion compared with the control.

### ***In silico* approach to investigating bioactive peptides**

Before carrying out *in vitro* and *in vivo* studies, it is possible to analyze peptide sequences and their biofunctions by using *in silico* approach. The advantages of *in silico* studies include economy of time and reagents and the possibility of determining which peptides have biological potential. Databases contain the following information on peptides: sequence (expressed in one-letter code), name, length of the peptide chain (expressed in number of amino acid residues), source of origin, molecular mass, and reference article (Iwaniak et al., 2019). Databases also allow searching for exact correspondence of a sequence of interest (Iwaniak et al., 2019).

BIOPEP-UWM (previously BIOPEP) is an important tool for investigating proteins as potential sources of bioactive peptides. BIOPEP-UWM comprises two peptide databases, one with over 3,700 peptides exhibiting various biological functions and a second with 480 sensory peptides, including amino acids with aromatic characteristics (Iwaniak et al., 2016). According to Iwaniak et al. (2016), sensory peptides are substances that have an experimentally verifiable flavor and, therefore, can influence food taste, as reported by Solms et al. (1965).

Another database of active peptide sequences is UniProt, which provides access to proteomes of more than 84,000 species with fully sequenced genomes (The UniProt Consortium, 2019). The bank extracts information from scientific publications and stores it in the UniProtKB/Swiss-Prot section of the UniProt Knowledgebase. The data describe functional information in the form of controllable syntax summaries and readable free

text, such as Gene Ontology (GO) and ChEBI (The UniProt Consortium, 2019). UniProt is simpler than BIOPEP-UWM, but the combined use of both databases can provide interesting results, given that a sequence of bioactive peptides may be reported in one database but not in the other.

As underscored by Minkiewicz et al. (2022), after obtaining amino acid sequences from the BIOPEP-UWM, it is possible to evaluate the probability of biological activity by using the PeptideRanker. Probability is estimated considering the charge distribution of the peptide and amino acid sequence. Determination of peptide bioactivity is based on enzyme specificity and the recognition sequence (Minkiewicz et al., 2022). These mathematical tools, therefore, help to determine what can be expected in *in vitro* and *in vivo* assays. Iwaniak et al. (2019) described that the *in silico* approach may also be used after *in vitro* protein hydrolysis to assist in the identification of hydrolyzed peptides and predict their bioactivity.

### **Scientific prediction of bioactive peptides from corn storage proteins**

Amino acid sequences of  $\alpha$ -zein-related corn storage proteins were acquired from the UniProtKB (The UniProt Consortium 2019). The database was accessed between April and December 2020. The protein name and its respective species were entered in UniProtKB (<https://www.uniprot.org/uniprot/>).

To verify all amino acid sequences of all  $\alpha$ -zein entries in the database, we performed a search using the terms “alpha zein *Zea mays*” and “alpha zein corn.” As per the classification system of the database, only protein sequences with an evident level of transcription were collected. In the case of more than one sequence with the same protein name, the BLAST tool (<https://www.uniprot.org/blast/>) was used to determine identity between sequences. If the sequence identity was equal to or greater than 90%, sequences were considered the same, but if identity was less than 90%, amino acid sequences were considered different.

The species, amino acid sequence, and identity of  $\alpha$ -zein proteins are shown in Table 1 (supplementary material). A total of 24 amino acid sequences were observed for  $\alpha$ -zein from *Z. mays*. Protein O48966 was considered equal to proteins Q94IM1, P04698, P04699, Q9AR71, P06679, and P05815 because sequence identity was greater than 90%. The Q94IM1 sequence showed more than 90% similarity with that of P04698, P04699, and P05815, with the last three showing an identity greater than 90% between themselves.

Given these findings, P04699 was considered equal to Q9AR71, K7TUP3, P06679, P04700, and P05815, and the last four were considered equal to each other.

The amino acid sequence of P06679 showed more than 90% identity with the P04700 sequence, which was equal to Q41896 and P05815 (Table 1 - supplementary material). The protein classified as P24449 was equal to P04704, P06674, P06675, P08416, P24450, and P02859. All these sequences were the same, except for the P24450 sequence. P06676, P04703, P06674, P04702, and P06677 sequences were considered equal to each other. Finally, amino acid sequences of P06674, P06675, P08416, P24450, and P02859 were considered equal to each other (>90% identity).

The different amino acid sequences representing  $\alpha$ -zein (Table 1 - supplementary material) were analyzed using BIOPEP-UWM (ID 7512 and ID 3169 (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) to identify possible bioactive peptides in proteins. For *in silico* bioactivity analysis, “Protein,” “Profiles of potential biological activity,” and “For your sequence” were selected; the amino acid sequence obtained from the UniProtKB was inserted; and the option “Report” was selected. Peptide activity was tabulated between April and December 2020.

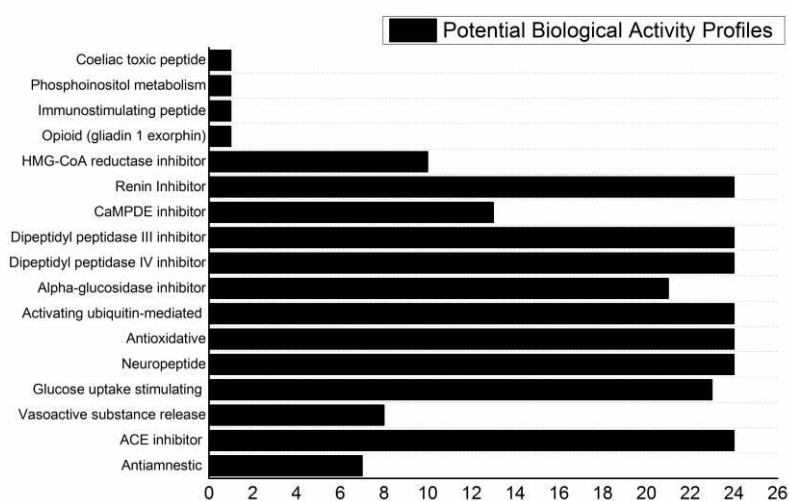
Subsequently, the BIOPEP-UWM was used for two simulations of gastrointestinal digestion. For the first simulation, the enzymes pepsin (EC 3.4.23.1), trypsin (EC 3.4.21.4), and chymotrypsin (EC 3.4.21.1) were selected. The second simulation was performed only with subtilisin (EC 3.4.21.1). For simulation, the following options were selected: “Protein,” “Analysis,” “Enzyme action,” and “For your sequence.” Sequences of amino acids obtained from UniProtKB were inserted, the enzymes were chosen, and the option “View the report with the results” was selected. Peptide fragments that were predicted to exhibit biological activity in the gastrointestinal simulation were tabulated. The frequency of occurrence of bioactive fragments (A) with some biological activity (e.g., antioxidant and ACE, DPP IV, and DPP III inhibition) was obtained from the database by clicking on “Calculations” and using the following equation:  $A = a/4N$ , where  $a$  is the number of fragments in the protein sequence with a given activity and  $N$  is the number of amino acid residues in the storage protein.

Given that several amino acid sequences showed differences, three sequences were selected: the first sequence used for comparison between proteins (O48966), the sequence with the highest frequency of biological activity (P06679), and the sequence with the lowest frequency of biological activity (K7TUP3). These amino acid sequences are described in Tables 1, 2 and 3. The results revealed that peptides derived from  $\alpha$ -zein

hydrolysis may exhibit numerous biological functions, such as antioxidant action and  $\alpha$ -glucosidase inhibition. As observed by Garcia, Barros, and Rocha (2020), BIOPEP-UWM can predict protein fragments that exhibit some biological activity because the database does not use a specific mechanism to simulate hydrolysis of protein chains. However, because numerous potential biological activities were identified, a low frequency of occurrence was observed, as indicated in Table 2. For instance, the probability of occurrence of a peptide with anti-amnesic action was 0.0038. High frequencies of occurrence were only observed for biological functions that result from numerous amino acid sequences, as was the case for DPP IV inhibition (Tables 1, 2 and 3).

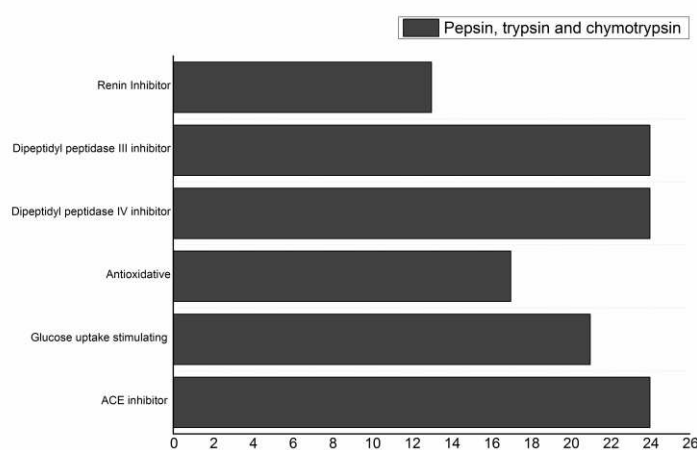
The presence of biological activity in the 24 amino acid sequences of  $\alpha$ -zein was assessed according to the number of biological actions that could be observed for these proteins (Fig. 1). Therefore, considering the potential biological profile of proteins, we identified 17 possible biological actions, including DPP IV and DPP III inhibition, ACE inhibition, vasodilator action, activation of ubiquitin (important regulator of misfolded proteins), and inhibition of HMG-CoA reductase (present in drugs for primary and secondary prevention of coronary heart disease), among others. All 24  $\alpha$ -zein sequences exhibited peptide sequences that might be related to neurological system modulation, antioxidant action, ubiquitin activation, and ACE, DPP IV, DPP III, and renin inhibition.

**Figure 1.** Biological activities of the 24  $\alpha$ -zein protein sequences analyzed using the BIOPEP-UWM database.



Simulation of gastrointestinal digestion using pepsin, trypsin, and chymotrypsin resulted in peptide sequences exhibiting six different biological actions (Fig. 2). All  $\alpha$ -zein sequences analyzed in this simulation showed activities related to ACE, DPP IV, and DPP III inhibition, as observed in the previous analysis. Furthermore, stimulation of glucose uptake was found for 21 different proteins, antioxidant activity was found for 17 protein sequences, and renin inhibition was described for 13 proteins.

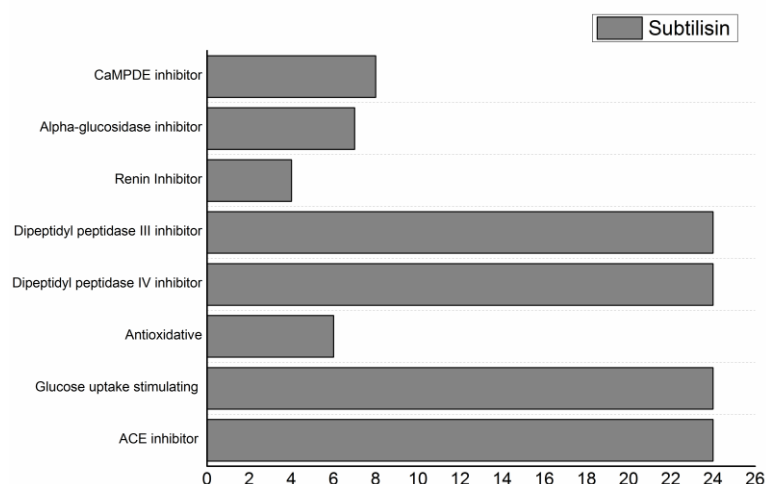
**Figure 2.** Biological activities of the 24  $\alpha$ -zein protein sequences analyzed using the BIOPEP-UWM database after simulated gastrointestinal digestion with pepsin, trypsin, and chymotrypsin.



Simulation of subtilisin digestion revealed peptides with eight possible biological actions. All hydrolyzed  $\alpha$ -zein sequences were found to contain peptides that can inhibit ACE, stimulate glucose uptake, and inhibit DPP IV and DPP III (Fig. 3). Peptides with antioxidant activity were observed in 6 of the 24 proteins analyzed, a lower proportion than that found by simulated digestion with pepsin, trypsin, and chymotrypsin. The same behavior was observed for renin inhibition; only four proteins were found to be related to this activity. However, simulation with subtilisin revealed peptides with  $\alpha$ -glucosidase and CaMPDE inhibitory activities, a result not observed in the first digestion simulation.

As described by Wang et al. (2018), enzymes cleave proteins at different points according to their specificity; thus, different peptides are obtained by digestion with different enzymes. Of note, simulated gastrointestinal digestion afforded fewer fragments with different biological activities than analysis of the potential biological profile of non-hydrolyzed proteins (Tables 1, 2 and 3) (Garcia et al., 2020).

**Figure 3.** Biological activities of the 24  $\alpha$ -zein protein sequences analyzed using the BIOPEP-UWM database after simulated digestion with subtilisin.



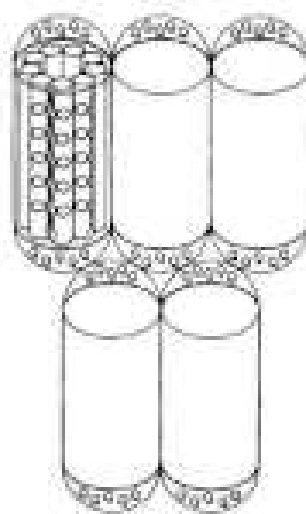
As described by Wang et al. (2018), enzymes cleave proteins at different points according to their specificity; thus, different peptides are obtained by digestion with different enzymes. Of note, simulated gastrointestinal digestion afforded fewer fragments with different biological activities than analysis of the potential biological profile of non-hydrolyzed proteins (Tables 2 and 3) (Garcia et al., 2020).

$\alpha$ -Zein is made up of homologous  $\alpha$ -helix structures, but its secondary structure depends on the solvent used to dilute the protein (Bicudo et al., 2008). Several models have been proposed, such as ribbon (Argos et al. 1982), hook, and superhelix formats (Zhang et al., 2016). The model proposed by Argos et al. (1982), still accepted today, indicates that  $\alpha$ -zein contains amino acid sequences and, given that it is highly hydrophobic, can aggregate and form fibers or associate with membranes, remaining in a helical configuration. The authors proposed that there is a cluster of  $\alpha$ -helices inside a distorted cylindrical surface covered by polar glutamine residues, which allow for hydrogen bonding, hydrophobic van der Waals interactions, and intermolecular packing, thereby maintaining the protein's compact structure (Fig. 4). The compact format of  $\alpha$ -zein confirms that each enzyme can hydrolyze only a part of its structure, explaining why the proportion of bioactive peptides was higher when analyzing the potential bioactivity profile of non-digested proteins than when assessing enzymatically digested proteins.

Active di- and tri-peptides related to  $\alpha$ -zein showed antioxidant and ACE inhibitory capabilities. Such peptides act by decreasing angiotensin II production and,

consequently, decreasing vasodilation and blood pressure (Li et al., 2019). Furthermore, peptides were found to be associated with inhibition of DPP IV, a serine protease responsible for stimulating insulin secretion (Jao et al., 2015), and DPP III, which is responsible for inhibiting chelating agents and thiol (Khaket et al., 2014). According to Khaket et al. (2014), dipeptides formed by aromatic pairs with large aliphatic or basic amino acids have the highest DPP III inhibitory potential.

**Figure 4.** Structure of  $\alpha$ -zein.



Source: Argos et al. (1982).

PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie>) was used to classify the probability of activity of peptides from the three sequences analyzed with BIOPEP-UWM (Tables 2 and 3) (Minkiewicz et al., 2022). PeptideRanker classifies peptides according to the probability of being bioactive using a score from 0 to 1. The closer to 1, the more likely that the amino acid sequence has biological activity. The database was accessed between April and October 2020. Any peptide predicted to have a score above 0.5 is labeled as bioactive by the database, but at a threshold of 0.8, false-positive rates for long and short peptides are reduced by 11% and 16%, respectively; at a threshold of 0.5, false-positive rates are reduced by 2% and 6%, respectively. Given this information, in the current study, only peptides with a score greater than 0.8 in PeptideRanker were considered and compared with peptides reported in the literature.

Table 5 describes peptides with scores above 0.8 according to PeptideRanker. Peptides were obtained from the BIOPEP-UWM considering the proteins O48966, P06679 and K7TUP3 before and after simulated digestion with a combination of enzymes

(pepsin, trypsin, and chymotrypsin) and subtilisin. We also report the possible identification of these peptides in scientific studies reporting DPP III, DPP IV, and ACE inhibitory activities and antioxidant action in *in vitro* assays. No scientific study identified peptide sequences of  $\alpha$ -zein, zein, or corn species with immunostimulant action or  $\alpha$ -glucosidase and renin inhibitory potential. Some peptide sequences with ACE, DPP III, and DPP IV inhibitory activity were not described in studies on corn proteins.

Fragments reported to promote ACE inhibition were composed of more than two or three peptides, and, in some cases (as for the tripeptide LPF), the isolated fragment had more than 20 amino acids (Table 5). Such a discrepancy can be attributed to differences in digestion conditions (hydrolysis time, temperature, and proteolytic enzymes). A peptide sequence with ACE inhibitory action and high occurrence (according to PeptideRanker) identified in a study on corn proteins was obtained by chemical isolation methods (Fmoc and Noc) (Li et al., 2019). There are no reports of the identification of this sequence in corn by enzymatic digestion. Yano et al. (1996) identified the second amino acid sequence (LF) with the highest frequency of ACE inhibition and were able to isolate it as a dipeptide via digestion with thermolysin at 37 °C for 3 h. The IF dipeptide with a possibility of occurrence of 0.9491, was identified by hydrolysis of corn with Alcalase<sup>®</sup> at 55 °C for 4 h (Wang et al., 2016). Miyoshi et al. (1991) and Puchalska et al. (2012) identified peptide sequences with ACE inhibitory activity via digestion of  $\alpha$ -zein with thermolysin.

Kaur et al. (2021) described that peptide structure, length, composition, and chain sequence are decisive for ACE inhibitory activity, as large peptides (>12 amino acids) may not bind to the active sites of the enzyme. Peptides with highly acidic amino acids, such as asparagine and glutamine, have a negatively charged network that is responsible for chelating zinc atoms and inactivating enzyme activity via chelation (Daskaya-Dikmen et al., 2017).

ACE inhibition results from interaction of the enzyme with three hydrophobic amino acids (proline, histidine, and phenylalanine) at the C-terminus of the protein. Furthermore, aromatic or alkaline amino acids such as arginine, glycine, valine, alanine, and isoleucine present at the N-terminus of inhibitory peptides may contribute to ACE inhibition (Li and Yu, 2015). Zhu et al. (2019) described that zein has a hydrophobic segment with a high proportion of non-polar amino acids, such as leucine (19.3%), proline (9.0%), and alanine (8.3%), explaining the high proportion of peptides with possible ACE

inhibitory action and the numerous studies reporting the efficacy of these isolated peptides.

Peptides with antioxidative potential were enzymatically hydrolyzed by alkaline proteases, such as Alcalase<sup>®</sup> and Flavourzyme<sup>®</sup>, and were found to contain few amino acid sequences (3 to 7) (Table 4). Díaz-Gómez et al. (2018) and Zhu et al. (2019) reported that the antioxidant capacity of corn peptides is related to the presence of amino acids such as lysine, histidine, tyrosine, phenylalanine, proline, leucine, cysteine, and tryptophan. Peptides that have amino acids with hydrophobic and aromatic side chains act as hydrogen donors, contributing to the interruption of the peroxidation chain reaction (Zhu et al., 2019).

Peptides with a frequency greater than 0.8 in PeptideRanker and potential DPP IV and DPP III inhibitory capacities were not identified in many studies, excepting LPP, VPL, YGGFM, and GGFL sequences. Mochida et al. (2010) described that the DPP IV inhibitory action of zein peptides might be related to the presence of proline and alanine at the N-terminus. However, according to Trinidad-Calderón et al. (2021), the plausible mechanisms of these effects have not yet been studied *in vitro*. This is mainly due to the short *in vivo* half-life (minutes) of incretins and the fact that a continuous presence of inhibitors in the blood is required for analysis (Duan et al., 2017).

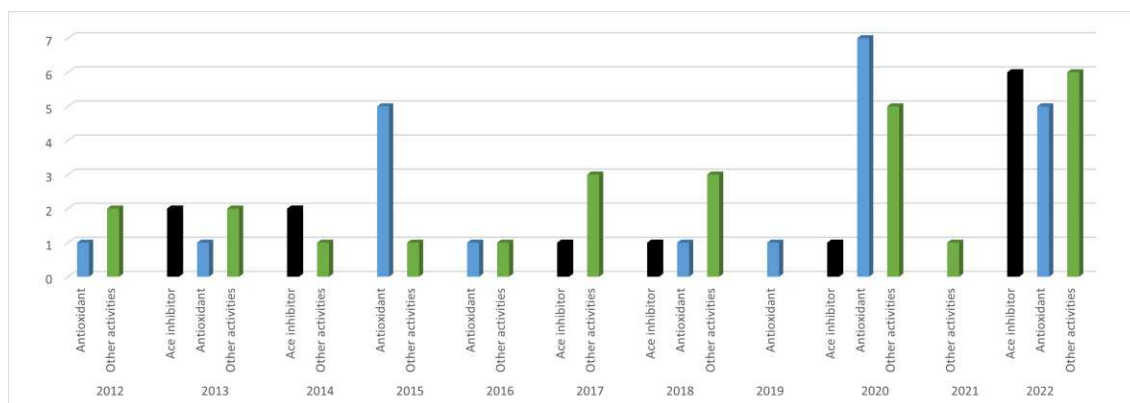
From the results of the current research, it can be understood that bioinformatics is an efficient, simple, economical tool for the synthesis, design, and selection of bioactive peptides before *in vitro* and *in vivo* studies, particularly for peptides with ACE inhibitory and antioxidative actions with high scores predicted by PeptideRanker. Furthermore, prediction of peptides by *in silico* analysis might contribute to the synthesis of peptides with DPP IV inhibitory action from zein sources.

### **Studies on corn bioactive peptides reported in the literature**

According to Wiley, Medline/PubMed, and CAPES databases, over the past 10 years, there was an increase in scientific studies related to biological activity of corn peptides in 2012 and 2022, indicating a possible increase in the characterization of these molecules (Fig. 5). All studies were performed on corn gluten or zein isolated from corn gluten. Currently, there are no studies identifying zeins according to their classification as  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , or  $\delta$ . Most studies performed enzymatic hydrolysis, although one study performed chemical hydrolysis (Fmoc method), identifying two peptides with antioxidant activity in Caco-2 cells (Ding et al., 2018), and another performed microbiological

hydrolysis (*B. subtilis* MTCC5480), detecting peptides with antioxidative action (Jiang et al. 2020).

**Figure 5.** Number of scientific studies in corn on bioactive peptides, in the last ten years, according to biological activity.



Legend. Other activities: hepatic protect (facilitating alcohol), anti-microbial, anti-cancer, cell-penetrating capability.

Corn peptides were mainly studied for their antioxidative potential. Other biological properties, such as liver protection, were reported. Corn peptides hydrolyzed with Alcalase<sup>®</sup> reduced the levels of alanine transaminase/aspartate transaminase, laminin, and collagen type IV and III in serum and increased albumin and antioxidant capacity in the liver of rats (Lv et al., 2013). Such biological activities were not reported in the BIOPEP-UWM database (Fig. 1). Another biological property not reported in the database was antimicrobial activity. Salouti et al. (2016) found that corn peptides acted against *Staphylococcus aureus* proliferation in wounds when applied with silver nanoparticles. Ortiz-Matinez et al. (2017) studied corn peptides hydrolyzed with Alcalase<sup>®</sup> and identified anticancer activity against HepG2 cells. Furthermore, the authors found that apoptosis induction rates increased 4-fold in cancer cells.

## Conclusions

Computational prediction of bioactive peptides is a useful, cost-effective tool for the design and synthesis of novel food-derived peptides for *in vitro* and *in vivo* studies. Biocomputational tools can contribute to the development of bioactive peptides isolated from corn zein proteins and subjected to enzymatic hydrolysis for nutraceutical

applications. The results suggest that prolamins present in corn, mainly the  $\alpha$ -zein fraction, are good sources of proteins for the release of potentially bioactive peptides (by gastrointestinal digestion) with ACE, DPP IV, and DPP III inhibitory potential and antioxidant action. Therefore, isolation and purification of corn peptides may contribute as a viable strategy to reduce the risk of type 2 diabetes mellitus, hypertension, and other diseases related to oxidative stress, such as cancer and inflammation.

### **Conflict of interest**

The authors confirm that they have no conflicts of interest with respect to the work described in this manuscript.

### **Acknowledgements**

Caroline Cagnin would like to thank the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for the PhD scholarship (Grant number: 88882.448235/2019-01). Sandra Helena Prudencio is grateful to the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the research fellowship (Grant number: 313830/2021-5).

### **References**

- Abramić, M., Agić, D (2022). Survey of dipeptidyl peptidase III inhibitors: from small molecules of microbial or synthetic origin to aprotinin. *Molecules*, 27, 3006.
- Abramic, M., Schleuder, D, Dolovcak, L, Schroder, W, Strupat, K, Sagi, D, Peter-Katalinic, J, Vitale, L (2000). Human and rat dipeptidyl peptidase III, biochemical and mass spectrometric arguments for similarities and differences. *Biological Chemistry*, 381, 1233-1243.
- Akbarian, M., Khani, A, Eghbalpour, S, Uversky, VN (2022). Bioactive peptides: synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 1445.
- Akharume, F. U., Aluko, RE, Adedeji, AA (2021). Modification of plant proteins for improved functionality: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 20, 198 – 224.
- American Diabetes Association (ADA) (2021). Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes.

- American Heart Association (2019). <https://www.heart.org/en/healthtopics/high-blood-pressure>.
- Argos, P., Pedersen, K, Marks, MD, Larkins, BA (1982). A structural model for maize zein proteins. *J. Biol. Chem.*, 257, 9984-9990.
- Berraquero-García, C., Rivero-Pino, F, Ospina, JL, Pérez-Gálvez, R, Espejo-Carpio, FJ, Guadix, A, García-Moreno, PJ, Guadix, EM (2023). Activity, structural features and in silico digestion of antidiabetic peptides. *Food Biosci.*, 55, 102954.
- Bicudo, T. C., Bicudo, RC, Forato, LA, Beltramini, LM, Batista, LAR, Bernardes Filho, R, Colnago, LA (2008). Gamma-zein secondary structure in solution by circular dichroism. *Biopolymers*, 89, 175-178.
- Budak, F., Aydemir, SK (2018). Grain yield and nutritional values of sweet corn (*Zea Mays* Var. *Saccharata*) in produced with good agricultural implementation. *Nutrition & Int. J. Food Sci.*, 7, 555710.
- Coleman, C. E., Larkins, BA (1999). The prolamins of maize. Springer, Dordrecht.
- Díaz-Gómez, J. L., Neundorf, I, López-Castillo, L, Castorena-Torres, F, Serna-Saldívar, SO, García-Lara, S (2020). In silico analysis and in vitro characterization of the bioactive profile of three novel peptides identified from 19 kDa  $\alpha$ -zein sequences of maize. *Molecules*, 25, 5450.
- Díaz-Gómez, J. L., Ortíz-Martínez, M, Aguilar, O, García-Lara, S, Castorena-Torres, F (2018). Antioxidant activity of zein hydrolysates from *Zea* Species and their cytotoxic effects in a hepatic cell culture. *Molecules*, 23.
- Ding, L., Wang, L, Zhang, T, Yu, Z, Liu, J (2018). Hydrolysis and transepithelial transport of two corn gluten derived bioactive peptides in human Caco-2 cell monolayers. *Food Res. Int.*, 106, 475-480.
- Duan, L., Rao, X, Braunstein, Z, Toomey, AC, Zhong, J (2017). Role of incretin axis in inflammatory bowel disease. *Front. Immunol.*, 8, 1734.
- Garcia, B. de F., Barros, Mde, Rocha, TdeS (2021). Bioactive peptides from beans with the potential to decrease the risk of developing noncommunicable chronic diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 61, 2003-2021.

- García, M., Puchalska, P, Esteve, C, Marina, M (2013). Vegetables foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106, 328-349.
- Guo, Y., Wang, K, Wu, B, Wu, P, Duan, Y, Ma, H (2020). Production of ACE inhibitory peptides from corn germ meal by an enzymatic membrane reactor with a novel gradient diafiltration feeding working-mode and in vivo evaluation of antihypertensive effect. *J. Funct. Foods*, 64, 103584.
- Hira, T., Mochida, T, Mijashita, K, Hara, H (2009). GLP-1 secretion is enhanced directly in the ileum but indirectly in the duodenum by a newly identified potent stimulator, zein hydrolysate, in rats. *Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol.*, 297, 663-671.
- Hou, D., Feng, Q, Niu, Z, Wang, L, Yan, Z., Sumei, Z (2023). Promising mung bean proteins and peptides: a comprehensive review of preparation technologies, biological activities, and their potential applications. *Food Biosci.*, v. 55, 102972.
- Hu, R., Chen, G, Li, Y (2020). Production and characterization of antioxidative hydrolysates and peptides from corn gluten meal using papain, ficin, and bromelain. *Molecules*, 25, 4091.
- Huang, WH, Sun, J, He, H, Dong, HW, Li, JT (2011). Antihypertensive effect of corn peptides, produced by a continuous production in enzymatic membrane reactor, in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.*, 128, 968-973.
- Hudson, S. M (1997). The spinning of silk-like proteins into fibers. Boston: Birkhause.
- Ibrahim, H. R., Ahmed, AS, Miyata, T (2017). Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *J. Adv. Res.*, 8(1), 63 – 71.
- Iwaniak, A., Darewicz, M, Mogut, D, Minkiewicz, P (2019). Elucidation of the role of *in silico* methodologies in approaches to studying bioactive peptides derived from foods. *J. Funct. Foods*, 61, 103486.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P, Darewicz, M, Sieniawski, K, Starowicz, P (2016). BIOPEP database of sensory peptides and amino acids. *Food Res. Int.*, 85, 155-161.
- Jao, C., Hung, C, Tung, Y, Lin, P, Chen, M, Hsu, K (2015). The development of bioactive peptides from dietary proteins as a dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the management of type 2 diabetes. *Biomedicine*, 5, 14.

- Jiang, X., Cui, Z, Wang, L, Xu, H, Zhang, Y (2020). Production of bioactive peptides from corn gluten meal by solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* MTCC5480 and evaluation of its antioxidant capacity *in vivo*. *LWT – Food Science and Technology*, 131, 109767.
- Jin, D., Liu, X, Zheng, X, Wang, X, He, J (2016). Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chem.*, 204, 427-436.
- Kaur, A., Kehinde, BA, Sharma, P, Sharma, D, Kaur, S (2021). Recently isolated food-derived antihypertensive hydrolysates and peptides: A review. *Food Chem.*, 346, 128719.
- Khaket, T. P., Redhu, D, Dhanda, S, Singh, J (2014). In silico evaluation of potential DPP-III inhibitor precursors from dietary proteins. *Int. J. Food Prop.*, 18, 499-507.
- Kitts, D. D., Weiler, K (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des.*, 9, 1309-1323.
- Kristinsson, H. G., Rasco, BA (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 40, 43-81.
- Kumar, R., Kumar, A, Sharma, RJ, Baruwa, A (2010). Pharmacological review on natural ACE inhibitors. *Der Pharmacia Lettre*, 2, 273-293.
- Li, C., Lee, Y, Lo, H, Huang, Y, Hsiang, C, Ho, T (2019). Antihypertensive effects of corn silk extract and its novel bioactive constituent in spontaneously hypertensive rats: the involvement of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Molecules*, 24, 1886.
- Li, C., Song, R (2020). The regulation of zein biosynthesis in maize endosperm. *Theor. Appl. Genet.*, 133, 1443-1453.
- Li, Y., Yu, J (2015). Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides. *J. Med. Food*, 18, 147-156.
- Liang, Q., Chalamaiah, M, Ren, X, Ma, H, Wu, J (2018). Identification of new anti-inflammatory peptides from zein hydrolysate after simulated gastrointestinal digestion and transport in CaCO-2 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 66, 1114-1120.

- Lin, F., Chen, L, Liang, R, Zhang, Z, Wang, J, Cai, M, Li, Y (2011). Pilot-scale production of low molecular weight peptides from corn wet milling byproducts and the antihypertensive effects in vivo and in vitro. *Food Chem.*, 124, 801-807.
- Liu, C., Hayat, U, Raza, A, Jia, C, Wang, J (2022). Zein-based injectable biomaterial and angiogenic activity through peptides produced by enzymatic degradation. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 78, 103937.
- Liu, W., Fang, L, Feng, X, Li, G, Gu, R (2020). In vitro antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory properties of peptides derived from corn gluten meal. *Eur. Food Res. Technol.*, 246, 2017-2027.
- Loy, D. D., Lundy, EL (2019). Nutritional properties and feeding value of corn and its coproducts. *Corn – Chemistry and Technology*, 3, 633-659.
- Lv, J., Nie, Z, Zhang, J, Liu, F, Wang, Z, Ma, Z, He, H (2013). Corn peptides protect against thioacetamide-induced hepatic fibrosis in rats. *J. Med. Food*, 16, 912-919.
- Ma, Z. L., Zhang, WJ, Yu, GC, He, H, Yang, Y (2012). The primary structure identification of a corn peptide facilitating alcohol metabolism by HPLC/MS/MS. *Peptides*, 37, 138-143.
- Maruyama, S., Miyoshi, S, Kaneko, T, Tanaka, H (1989). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 1077-1081.
- Minkiewicz, P., Iwaniak, A, Darewicz, M (2019). BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 5978.
- Minkiewicz, P., Iwaniak, P, Darewicz, M (2022). BIOPEP-UWM virtual – A novel database of food-derived peptides with in silico-predicted biological activity. *Applied Sciences*, 12, 7204.
- Miyoshi, S., Ishikawa, H, Kaneko, T, Fukui, F, Tanaka, H, Maruyama, S (1991). Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an  $\alpha$ -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 55(5), 1313-1318.
- Mochida, T., Hira, T, Hara, H (2010). The corn protein, zein hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats. *Endocrinology*, 151, 3095-3104.

- Mochizuki, M., Shigemura, H, Hasegawa, N (2010). Anti-inflammatory effect of enzymatic hydrolysate of corn gluten in an experimental model of colitis. *J. Pharm. Pharmacol.*, 62, 389-392.
- Nasri, M (2017). Protein hydrolysates and biopeptides: production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A Review. *Adv. Food Nutr. Res.*, 81, 109-159.
- Nonthanum, P., Lee, Y, Padua, GW (2012). Effect of  $\gamma$ -zein on the rheological behavior of concentrated zein solutions. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 1742-1747.
- Novozymes (2013). Protamex® Datasheet. Bagsvaerd Denmark.
- Okoye, C. O., Ezeorba, TPC, Okeke, ES, Okagu, IU (2022). Recent findings on the isolation, identification and quantification of bioactive peptides. *Appl. Food Res.*, 2, 100065.
- Ortiz-Martinez, M., Mejia, EGde, García-Lara, S, Aguilar, O, Lopez-Castillo, LM, Otero-Papatheodorou, JT (2017). Antiproliferative effect of peptide fractions isolated from a quality protein maize, a white hybrid maize, and their derived peptides on hepatocarcinoma human HepG2 cells. *J. Funct. Foods*, 34, 36-48.
- Peterle, D., Pontarollo, G, Spada, S, Brun, P, Palazzi, L, Sokolov, AV, Spolaore, B, Laureto, PPde, Vasiyev, VB, Castagliuolo, I, Filippis, Vde (2020). A serine protease secreted from *Bacillus subtilis* cleaves human plasma transthyretin to generate an amyloidogenic fragment. *Commun. Biol.*, 3, 764.
- Puchalska, P., Marina, ML, García, MC (2012). Development of a reversed-phase high-performance liquid chromatography analytical methodology for the determination of antihypertensive peptides in maize crops. *J. Chromatogr. A*, 1234, 64-71.
- Qu, W., Feng, Y, Xiong, T, Li, Y, Wahia, H, Ma, H (2022). Preparation of corn ACE inhibitory peptide-ferrous chelate by dual-frequency ultrasound and its structure and stability analyses. *Ultrason Sonochem.*, 83, 105937.
- Revilla, P., Alves, ML, Andelković, V, Balconi, C, Dinis, I, Mendes-Moreira, P, Redaelli, R, Galarreta, JIRde, Patto, MCV, Žilić, S, Malvar, RA (2021). Traditional foods from maize (*Zea mays* L.) in Europe. *Front. Nutr.*, 8, 683399.

- Ribeiro, K. de O., Garcia, MC, Oliveira, AR, Soares Júnior, MS, Caliri, M (2019). Characterization and proposal of potential use in foods of coproducts from waxy maize wet milling. *Food Sci. Technol.*, 39, 315-320.
- Rocha, T. de S.; Hernandez, LMR, Mojica, L, Johnson, MH, Chang, YK, Mejía, EGde (2015). Germination of *Phaseolus vulgaris* and alcalase hydrolysis of its proteins produced bioactive peptides capable of improving markers related to type-2diabetes in vitro. *Food Res. Int.*, 76, 150–9.
- Saadi, S., Saari, N, Anwar, F, Hamid, AA, Ghazali, HM (2015). Recent advances in food biopeptides: production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnol. Adv.*, 33, 80-116.
- Saeedi, P., Petersohn, I, Salpea, P, Malanda, B, Karuranga, S, Unwin, N, Colagiuri, S, Guariguata, L, Motala, AA, Ogurtsova, K, Shaw, JE, Bright, D, Williams, R, On behalf of the IDF Diabetes Atlas Committee (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation diabetes Atlas, 9<sup>th</sup> edition. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 157, 107843.
- Salouti, M., Mirzaei, F, Shapuri, R, Ahangari, A (2016). Synergistic antibacterial activity of plant peptide MBP-1 and silver nanoparticles combination on healing of infected wound due to staphylococcus aureus. *Jundishapur J. Microbiol.*, 9, e27997.
- Sharma, S., Pradhan, R, Manickavasagan, A, Thimmanagari, M, Dutta, A (2022). Corn distillers solubles as a novel bioresource of bioactive peptides with ACE and DPP IV inhibition activity: characterization, in silico evaluation, and molecular docking. *Food Funct.*, 13, 8179-8203.
- Shukla, R., Cheryan, M (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Ind. Crops Prod.*, 13, 171-192.
- Solms, J., Vuataz, L, Egli, RH (1965). The taste of L- and D-amino acids. *Experientia*, XXI, 21, 692-694.
- Takahashi, Y., Kamata, A, Konishi, T (2021). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides derived from salmon milt and their effects on postprandial blood glucose level. *Fish. Sci.*, 87, 619-626.
- The Uniprot Consortium (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.*, 47, D506-D515.

- Tian, R., Feng, J, Huang, G, Tian, B, Zhang, Y, Jiang, L, Sui, X (2020). Ultrasound driven conformational and physicochemical changes of soy protein hydrolysates. *Ultrason Sonochem.*, 68, 105202.
- Tonin, S., Borba, HH, Wiens, A, Fernandez-Llimos, F, Pontarolo, R (2020). Vitamins, antioxidants, and type 2 diabetes. *Diabetes*, 373-383.
- Trinidad-Calderón, P. A., Acosta-Cruz, E, Rivero-Massante, MN, Díaz-Gómez, JL, García-Lara, S, López-Castillo, LM (2021). Maize bioactive peptides: from structure to human health. *J. Cereal Sci.*, 100, 103232.
- Ulug, S. K., Jahandideh, F, Wu, J (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, 108, 27-39.
- UniProt Consortium (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.*, 47, D506-D515.
- Wang, C., He, H, Zhang, J, Li, X, Ma, Z (2016). High performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints and primary structure identification of corn peptides by HPLC-diode array detection and HPLC-electrospray ionization tandem mass. *J. Food Drug Anal.*, 24, 94-104.
- Wang, K., Wang, Y, Lin, S, Liu, X, Yang, S, Jones, GS (2015). Analysis of DPPH inhibition and structure change of corn peptides treated by pulsed electric field technology. *J. Food Sci. Technol.*, 52, 4342-4350.
- Wang, X., Codreanu, SG, Wen, B, Li, K, Chambers, MC, Liebler, DC, Zhang, B (2018). Detection of proteome diversity resulted from alternative splicing is limited by trypsin cleavage specificity. *Mol. Cell. Proteomics*, 17, 422–430.
- Wang, X., Liu, X, Zheng, X, Qu, Y (2022). Antagonistic effect of the glycopeptide from zein on acute alcohol-induced liver injury in mice. *J. Funct. Foods*, 92, 105062.
- Wang, Y., Chen, H, Wang, J, Xing, L (2014). Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate–chitosan beads. *Process Biochem.*, 49, 1682-1690.
- World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2023. 2023. Geneva: WHO.

- Wu, Y., Pan, X, Zhang, S, Wang, W, Cai, M, Li, Y, Yang, F, Guo, H (2014). Protective effect of corn peptides against alcoholic liver injury in men with chronic alcohol consumption: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Lipids Health Dis.*, 13, 192-201.
- Xu, Z., Wu, C, Sun-Waterhouse, D, Zhao, T, Waterhouse, GIN, Zhao, M, Su, G (2021). Identification of post-digestion angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean protein isolate: their production conditions and in silico molecular docking with ACE. *Food Chem.*, 345, 12885.
- Yang, Y., Tao, G, Liu, P, Liu, J (2007). Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7891-7895.
- Yano, S., Suzuki, K, Funatsu, G (1996). Isolation from  $\alpha$ -Zein of thermolysin peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitor activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 661-663.
- Yeo, J., Shahidi, F (2021). Bioactive peptides in health and disease: an overview. *Biologically Active Peptides*, 1, 1-26.
- Yuan, Y. V., Kitts, DD (1991). Confirmation of calcium absorption and femoral utilization in spontaneously hypertensive rats fed casein phosphopeptide supplemented diets. *Nutr. Res.*, 11, 1257-1272.
- Zaky, A. A., Simal-Gandara, J, Eun, J, Shim, J, el-Aty, AMA (2021). Bioactivities, applications, safety, and health benefits of bioactive peptides from food and by-products: a review. *Front. Nutr.*, 8, 815640.
- Zhang, J., Wen, C, Zhang, H, Zandile, M, Luo, X, Duan, Y, Ma, H (2018). Structure of the zein protein as treated with subcritical water. *Int. J. Food Prop.*, 21, 128-138.
- Zhang, Y., Cui, L, Li, F, Shi, N, Li, C, Yu, X, Chen, Y, Kong, W (2016). Design, fabrication and biomedical applications of zein-based nano/microcarrier system. *Int. J. Pharm.*, 513, 191-210.
- Zheng, X., Li, L, Liu, X, Wang, X, Lin, J, Li, D (2006). Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 763-770.

Zheng, X., Wang, J, Liu, X, Sun, Y, Zheng, Y, Wang, X, Liu, Y (2015). Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by protamex hydrolysis. *Food Chem.*, 172, 407-15.

Zhou, C., Hu, J, Ma, H, Yagoub, AEA, Yu, X, Owusu, J, Ma, H, Qin, X (2015). Antioxidant peptides from corn gluten meal: orthogonal design evaluation. *Food Chem.*, 187, 270-278.

Zhou, K., Sun, S, Canning, C (2012). Production and functional characterization of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Food Chem.*, 135, 1192-1197.

Zhu, B., He, H, Hou, T (2019). A comprehensive review of corn protein-derived bioactive peptides: production, characterization, bioactivities, and transport pathways. *CRFSFS*, 18, 329-345.

Zhuang, H., Tang, N, Dong, S, Sun, B, Liu, J (2013). Optimization of antioxidant peptide preparation from corn gluten meal. *J. Sci. Food Agric.*, 93, 3264-3270.

Table 2 - Predicted potential for obtaining bioactive peptides for Alpha zein O48966.

<b>Alpha Zein - O48966</b>						
<b>MATKILSLLALLALFASATNAFIIPQCSLAPSSIITQFLPPVTSMGFEHPAVQAYRLQQAIAASVLQQPISQLQQQSLAHLTIQTI ATQQQQQFLPALSHLAMVNPAAAYLQQQLLASNPLALANVVANQPQQQLQQFLPALSQLAMVNPAAAYLQQQQLSSSPLAVA NAPTYLQQQLLQQIVPALTQLVVANPAAAYLQQLLPFNQLTMSNSAAAYLQQRQQLLNPLAVANPLVAAFLQQQQLLPYNQFSL INPVLSRQQPIVGGAIIF</b>						
Profiles of potential biological activity			GI: pepsine, trypsin, chymotrypsin		Subtilisin	
<b>Activity</b>	Bioactive fragment	A	Bioactive fragment	A	Bioactive fragment	A
<b>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</b>	PP, VA, MA, LA, FA, AP, PA, LP, VP, LL, VV, IP, SP, HP, GA, IA, NP, QP, FL, HL, AL, SL, AA, PL, AF, AH, AS, AT, AV, AY, EH, FN, GF, GG, II, IL, IN, IQ, KI, LI, LN, LT, LV, MG, MV, NA, NQ, NV, PF, PI, PQ, PS, PT, PV, PY, QA, QF, QI, QL, QQ, QS, QT, RL, SH, SI, SV, TI, TK, TM, TN, TQ,	0.8008	AL, SL, PL, AF, AH, EH, GF, IL, IN, PF, PY, QF, QL, SH, TM, VN	0.0827	PP, HL, AL, PL, AS, PF, PY, QL, RL, VL	0.0564

	TS, TY, VG, VL, VN, VQ, VT, YL, YN, YR					
<b>ACE inhibitor</b>	RL, LPP, VAA, LNP, LF, FNQ, AY, LLP, LQQ, PL, IA, LAP, IP, AF, AP, VA, VP, AA, GF, IF, VG, GA, HL, MG, GG, LQ, LN, PT, TQ, AH, PP, PQ, HP, AI, VNP, AV, LPF, AFL, IL, YN, QP	0.3647	PL, AF, GF, AH, IL	0.0263	RL, PL, HL, PP	0.015
<b>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</b>	YL, YR, GF, HL, HP, LA, FA, FL, PF, SM	0.1053	GF, PF	0.0712	HL, PF	0.075
<b>Stimulating (stimulating vasoactive substance release)</b>	SSS	0.0714				
<b>Stimulating (glucose uptake)</b>	VL, LV, IV, IL, LI, II, LL	0.0714	IL	0.0038	VL	0.0075

<b>stimulating peptide)</b>						
<b>Activating</b>	LA	0.0414				
<b>ubiquitin-mediated proteolysis</b>						
<b>Antioxidative</b>	HL, AY, AH, TY, LLPF	0.0376	AH	0.0038	HL	0.0038
<b>Neuropeptide</b>	YL, YR	0.0226				
<b>Antiamnestic (prolyl endopeptidase inhibitor)</b>	LPPV	0.0038				
<b>Alpha-glucosidase inhibitor</b>	PP	0.0038			PP	0.0038
<b>HMG-CoA reductase inhibitor</b>	IVG	0.0038				
<b>Renin Inhibitor</b>	QF	0.015	QF	0.0038		

Table 3 - Predicted potential for obtaining bioactive peptides for Alpha zein P06679.

<b>Alpha Zein - P06679</b>						
<b>LALLALLALFVSATNAFIIPQCCLAPSAIIPQFLPPVTSMGFEHLAVQAYRLQQALAAASVLQQPINQLQQQSLAHLTIQTIATQQ QQQFLPSVSQLDVVNPVAYLQQQLLASNPLALANVAAYQQQQQLQQFLPALSQLAMVNPAAYLQQQQLSSSPLAVGNAPT YLQQQLLQQIVPALTQLAVANPAAYLQQLLPFNQLTVSNSAAYLQQRQQLLNPLEVPNPLVAGFLQQQQLLPYSQFSLMNPA LSWQQPIVGGAIIF</b>						
Profiles of potential biological activity			GI: pepsine, trypsin, chymotrypsin		Subtilisin	
<b>Activity</b>	Bioactive fragment	A	Bioactive fragment	A	Bioactive fragment	A
<b>Dipeptidyl peptidase inhibitor</b>	<b>IV</b> PP, VA, LA, AP, PA, LP, VP, LL, VV, IP, SP, GA, IA, NP, QP, FL, HL, AL, SL, AA, PL, WQ, AF, AG, AH, AS, AT, AV, AY, EH, EV, FN, GF, GG, II, IN, IQ, LM, LN, LT, LV, MG, MN, MV, NA, NQ, NV, PF, PI, PN, PQ, PS, PT, PV, PY, QA, QF, QI, QL, QQ, QS, QT, RL, SV, SW, TI, TN, TQ, TS, TV, TY, VG, VL, VN,	0.7906	AL, GL, SL, PL, AF, AH, EH, GF, PF, PY, QL, SW, VN	0.0687	PP, AL, PL, AS, PF, PS, PY, QF, QL, RL, VL, VS	0.0687

	VQ, VS, VT, YL, YQ, YR, YS					
<b>ACE inhibitor</b>	RL, LPP, VAA, LAA, LNP, VAY, LF, FNQ, AY, LLP, LQQ, PL, IA, LAP, IP, AF, AP, LA, VP, AA, GF, IF, VG, GA, AG, HL, MG, GG, MNP, EV, LQ, LN, PT, TQ, AH, PP, PQ, AI, VNP, LSW, AV, LPF, QP	0.4573	PL, AF, GF, AH	0.0229	RL, VAY, PL, PP, VNP	0.0191
<b>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</b>	YL, YR, GF, HL, LA, FL, PF, SM, GFL	0.094	GF, PF	0.0076	PF	0.0038
<b>Stimulating (vasoactive substance release)</b>	SSS	0.0641				
<b>Stimulating (glucose uptake stimulating peptide)</b>	VL, LV, IV, II, LL	0.0641			VL	0.0038

<b>Immunostimulatin g peptide</b>	GFL	0.0575		
<b>Antioxidative</b>	HL, AY, AH, TY, LLPF	0.0385	AH	0.0038
<b>Activating ubiquitin-mediated proteolysis</b>	LA	0.0299		
<b>Neuropeptide</b>	YL, YR	0.0171		
<b>Renin Inhibitor</b>	QF	0.0171		QF 0.0038
<b>Regulating (peptide regulating phosphoinositol metabolism)</b>	GFL	0.0153		
<b>Alpha-glucosidase inhibitor</b>	PP	0.0085		PP 0.0038
<b>Antiamnestic (prolyl endopeptidase inhibitor)</b>	LPPV	0.0038		
<b>HMG-CoA reductase inhibitor</b>	IVG	0.0038		

Table 4 - Predicted potential for obtaining bioactive peptides for Alpha zein K7TUP3.

<b>Alpha Zein - K7TUP3</b>						
<b>MATKILALLALLALFVSATNAFIIPQCSLAPSAIIPQFLRPVTSMGFEHLAVQAYKLQQALAASVLQQPINQLQQQLAH</b>						
<b>LTIQTIATQQQQQFLPALSQLDVVNPVAYLQQQVLASNPLALANVAAYQQQQQLQQFLPALSQLAMVNPAAAYLQQQQLLSSS</b>						
<b>PLVVGNAPTYLQQLLQQIVPALTQLAVANPAAYLQQLLPFNQLTVSNSAAYLQQRQQLLNPLAVPNPLVTAFLQQQQLLPY</b>						
<b>SQFSLMNPALSWQQPIVGAIF</b>						
	Profiles of potential biological activity		GI: pepsine, trypsin, chymotrypsin		Subtilisin	
<b>Activity</b>	Bioactive fragment	A	Bioactive fragment	A	Bioactive fragment	A
<b>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</b>	VA, MA, LA, AP, PA, LP, VP, LL, VV, IP, SP, RP, GA, IA, NP, TA, QP, FL, HL, AL, SL, AA, PL, WQ, AF, AH, AS, AT, AV, AY, EH, FN, GF, GG, II, IL, IN, IQ, KI, LM, LN, LT, LV, MG, MN, MV, NA, NQ, NV, PF, PI, PN, PQ, PS, PT, PV, PY, QA, QF, QI, QL, QQ, QS, QT, QV, SV, SW, TI, TK, TN, TQ, TS, TV,	0.812	AL, SL, PL, AF, AH, EH, GF, IL, PF, PY, QL, SW, VN	0.0712	RP, AL, PL, AS, PF, PY, QF, QL, VL, VS	0.0599

	TY, VG, VL, VN, VQ, VS, VT, YK, YL, YQ, YS					
<b>ACE inhibitor</b>	AVP, VAA, LAA, LRP, LNP, VAY, LF, FNQ, AY, LLP, LQQ, PL, IA, LAP, IP, RP, AF, AP, LA, VP, AA, GF, IF, VG, GA, HL, MG, GG, MNP, KL, YK, LQ, LN, PT, TQ, AH, PQ, AI, VNP, LSW, AV, LPF, AFL, IL, LR, QP	0.391	PL, AF, GF, AH, IL	0.0262	VAY, PL, RP, KL, VNP	0.0187
<b>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</b>	YL, YK, GF, HL, LA, FL, PF, SM	0.109	GF, PF	0.0075	PF	0.0037
<b>Stimulating (stimulating vasoactive substance release)</b>	SSS	0.0639				
<b>Stimulating (glucose</b>	VL, LV, IV, IL, II, LL	0.0639	IL	0.0037	VL	0.0075

---

<b>uptake stimulating peptide)</b>				
<b>Activating ubiquitin- mediated proteolysis</b>	LA	0.0489		
<b>Antioxidative</b>	HL, AY, AH, TY, LLPF	0.0414	AH	0.0037
<b>Renin Inhibitor</b>	LR, QF	0.0188		QF 0.0037
<b>Neuropeptide</b>	YL	0.0188		
<b>HMG-CoA reductase inhibitor</b>	IVG	0.0038		

---

Table 5 - Scores at PeptideRanker of the bioactive peptide fragments with biological potential obtained from BIOPEP-UWM and peptide sequences with the same bioactive fragment identified in scientific studies at the literature.

Score <sup>a</sup>	Bioactive fragment	Biological Activity	Corn specie	Peptide sequence <sup>b</sup>	Reference
<b>0.9947</b>	GF	ACE inhibitor	Corn silk	CGFPPAGYLRR	Li et al. (2019)
<b>0.9869</b>	LF	ACE inhibitor	$\alpha$ -zein	<b>LF</b>	Yano, Suzuki e Funatsu (1996)
<b>0.9749</b>	LPF	ACE inhibitor	$\alpha$ -zein	FNQLAALNSAAYLQQQLLPFSQLA; QLADVSPAFLTQQQLLPFYLHAM; AYLQAQQLLPFNQLVRSPAA; CFFNQLAALNSAAYLQQQLLPFSQLA; CFAYLQAQQLLPFNQLVRSPAA; CFQLADVSPAFLTQQQLLPFYLHAM	Díaz-Gómez et al. (2020)
<b>0.9732</b>	AF	ACE inhibitor	$\alpha$ -zein	<b>AF</b> , QLADVSPAFLTQQQLLPFYLHAM, CFQLADVSPAFLTQQQLLPFYLHAM	Yano, Suzuki e Funatsu (1996); Díaz-Gómez et al. (2020)
<b>0.9491</b>	IF	ACE inhibitor	Corn	<b>TIFPQ</b>	Wang et al. (2016)
<b>0.9439</b>	MG	ACE inhibitor			
<b>0.9285</b>	AFL	ACE inhibitor	$\alpha$ -zein	QLADVSPAFLTQQQLLPFYLHAM, CFQLADVSPAFLTQQQLLPFYLHAM	Yano, Suzuki e Funatsu (1996); Díaz-Gómez et al. (2020)

<b>0.8873</b>	GG	ACE inhibitor			
<b>0.8869</b>	PP	ACE inhibitor	$\gamma$ -zein	VHLPPP; OGLPPGPPIPP; SLLPPYLSPA	Maruyama et al. (1989)
<b>0.8282</b>	LSW	ACE inhibitor			
<b>0.8280</b>	LPP	ACE inhibitor	$\alpha$ -zein, corn gluten meal	VHLPPP	Maruyama et al. (1989); García et al. (2013); Yano, Suzuki and Funatsu, 1996.
<b>0.8222</b>	RP	ACE inhibitor	$\alpha$ -zein	LRP	Puchalska, Marina e García (2012)
<b>0.8111</b>	PL	ACE inhibitor	$\alpha$ -zein	PPIPPGPLOG	Miyoshi et al. (1991)
<b>0.9802</b>	GFL	Immunostimulating peptide			
<b>0.9464</b>	LLPF	Antioxidant	corn gluten meal; $\alpha$ -zein	LLPF; QQLLPF, QQILLPF, QILLPF; QLLPF	Zhuang et al. (2013); Liang et al. (2017); Wang et al. (2016); Ma et al. (2012)
<b>0.8869</b>	PP	Alpha glucosidase			
<b>0.9947</b>	GF	DPP-IV			
<b>0.9934</b>	PF	DPP-IV			
<b>0.9896</b>	FL	DPP-IV			
<b>0.9732</b>	AF	DPP-IV			
<b>0.9558</b>	FA	DPP-IV			

<b>0.9512</b>	FN	DPP-IV			
<b>0.9461</b>	QF	DPP-IV			
<b>0.9439</b>	MG	DPP-IV			
<b>0.9339</b>	SW	DPP-IV			
<b>0.9099</b>	WQ	DPP-IV			
<b>0.8873</b>	GG	DPP-IV			
<b>0.8869</b>	PP	DPP-IV	$\alpha$ -zein	<b>LPP</b>	Hira et al. (2009)
<b>0.8642</b>	LM	DPP-IV			
<b>0.8222</b>	RP	DPP-IV			
<b>0.8111</b>	PL	DPP-IV	Zein	<b>VPL</b>	Mochida, Hira e Hara (2010)
<b>0.9947</b>	GF	DPP-III	Corn	<b>YGGFM</b>	Abramic et al. (2000)
<b>0.9934</b>	PF	DPP-III			
<b>0.9895</b>	FL	DPP-III			
<b>0.9802</b>	GFL	DPP-III	Corn	<b>GGFL</b>	Abramic et al. (2000)
<b>0.9558</b>	FA	DPP-III			
<b>0.9461</b>	QF	RENIN			

<sup>a</sup> It was presented only the fragments with score above 0.8;

<sup>b</sup> Bold: bioactive fragment. A, Alanine; R, Arginine; N, Asparagine; D, Aspartic acid; C, Cysteine; Q, Glutamine; E, Glutamic acid; G, Glycine; H, Histidine; I, Isoleucine; L, Leucine; K, Lysine; M, Methionine; F, Phenylalanine; P, Proline; S, Serine; T, Threonine; W, Tryptophan; Y, Tyrosine; V, Valine.



## 5. 2 Artigo Científico 2

### **Propriedades físicas, químicas e tecnofuncionais de farelo de glúten de milho modificado por extrusão**

#### **Resumo**

O objetivo do estudo foi avaliar a influência das condições de extrusão, umidade da amostra, temperatura e velocidade de rotação do parafuso do extrusor, sobre as propriedades de hidratação do farelo de glúten de milho (GM), extrusado visando a sua otimização; e avaliar o efeito da extrusão, na condição otimizada, sobre outras propriedades tecnofuncionais, químicas, físicas e estruturais das proteínas do GM. A extrusão foi efetuada em diferentes umidades (20 – 40%), temperaturas (120 – 160°C) e velocidades do parafuso (33 – 117 rpm) empregando-se um planejamento fatorial completo, com dois pontos centrais. Observou-se que a extrusão a 20% de umidade, 120°C e 117 rpm foi a condição otimizada e resultou nas maiores capacidade de absorção de água e solubilidade de proteínas em pH 7. Ademais, aumentou a atividade e capacidade emulsificante e alterou a cor do GM, que se tornou mais escuro e. Após a extrusão, as proteínas do GM tiveram redução da solubilidade em água e houve alterações nas suas solubilidades em soluções de tampão fosfato contendo ureia e/ou SDS, indicando modificações na conformação nativa das moléculas, o que foi corroborado pela intensificação da conformação folha  $\beta$  e agregação das proteínas devido a extrusão.

**Palavras-chave:** absorção de água, eletroforese, infravermelho com transformada de Fourier, proteínas, solubilidade, zeínas.

#### **1. INTRODUÇÃO**

O milho é um cereal extremamente consumido mundialmente, consumido in natura e utilizado para alimentação animal, matéria-prima industrial e para produção de etanol (ZHANG et al., 2021). Durante o processamento dos grãos, na etapa de moagem úmida, há a separação de dois produtos, o amido e uma fração proteica, que após a secagem, é chamada de farelo de glúten de milho (GM) e contém em torno de 60% de proteínas (SANTOS, 2004; ZHUANG et al., 2013). O

GM tem sido utilizado como suplemento na alimentação animal (TAYLOR; LEMENAGER; STEWART, 2017; BICUDO et al., 2012), mas também pode ser utilizado na produção de alimentos para humanos, como em pães sem glúten de trigo, devido às baixas solubilidade e capacidade de absorção de água das suas proteínas (OZTURK; MERT, 2018), apesar de não formar uma rede de glúten como no trigo e levar um pequeno prejuízo do volume e textura do produto.

A fração proteica do GM é formada principalmente por zeínas (~68%) e glutelinas (28%), que são altamente hidrofóbicas, o que afeta suas propriedades tecnofuncionais (ORTIZ-MARTINEZ et al., 2017). A alta hidrofobicidade dessas proteínas, além de causar a reduzida hidratação, afeta suas capacidades emulsificantes e espumantes, pois ambas as propriedades dependem tanto da presença de grupos hidrofílicos como hidrofóbicos na superfície da molécula (OZTURK; MERT, 2019).

Muitas propriedades tecnofuncionais de proteínas podem ser alteradas e melhoradas por meio de modificações físicas (LIU et al., 2020; MOZAFARPOUR, 2019). Dentre elas, a extrusão destaca-se por sua versatilidade (pode-se empregá-la em diferentes matérias-primas) e flexibilidade (pode-se diversificar as condições de extrusão). É uma técnica eficiente, que consome pouca energia em relação a sua alta produtividade, e não gera efluente (FERNANDES et al., 2016).

A modificação das proteínas por extrusão relaciona-se principalmente a três parâmetros, umidade da amostra, temperatura e velocidade do parafuso do extrusor. Este último parâmetro gera alta pressão e forças de cisalhamento que causam mudanças físicas na amostra e moleculares nas proteínas (ZHANG et al. 2022). As mudanças estruturais ocorrem em duas etapas sucessivas, a desnaturação das proteínas e o alinhamento das moléculas desnaturadas com a formação de novas interações cruzadas não covalentes (interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio) e covalentes (ligações dissulfeto, quando a proteína possui cisteína em sua estrutura) (LI et al., 2018; PIETSCH; EMIN; SCHUCHMANN, 2017; PRUDÊNCIO-FERREIRA; ARÊAS, 1993). A partir da formação das interações proteína-proteína há a formação de agregados proteicos, que podem ser solúveis ou não em água, conforme a composição de aminoácidos e a organização estrutural do agregado, sendo que os não solúveis podem ser hidratados e reterem água (WANG et al., 2017).

Após a extrusão de isolado proteico de ervilha, Zhang et al. (2022) observaram aumento do índice de absorção de água e redução da solubilidade proteica e da capacidade de formação de espuma, mas melhora em sua estabilidade. Yoshida, da Silva e Prudencio (2022) também notaram que a solubilidade proteica em água das proteínas da okara foi reduzida após extrusão, que foi justificada por alterações estruturais nas moléculas de proteínas e a formação de agregados proteicos insolúveis, como resultado da ação de alta temperatura e compressão do parafuso durante a extrusão. Em glúten de milho, Zhang et al. (2023) notaram aumento da agregação proteica, como resultado do aumento das ligações covalentes com aumento da temperatura de extrusão. Zheng et al. (2020) encontraram que blendas (1:1) de isolado proteico de soja e fubá de milho após a extrusão, tiveram maior capacidade de absorção de água como consequência da redução da proporção de  $\alpha$ -hélice e aumento de folhas  $\beta$  nas proteínas presentes no fubá de milho devido ao processamento.

Para empregar um subproduto proteico como ingrediente alimentar é essencial conhecer suas propriedades tecnofuncionais. As propriedades de hidratação são de grande interesse, uma vez que ingredientes secos, na maioria das vezes, devem ser hidratados para serem aplicados numa formulação alimentar. Muitas propriedades tecnofuncionais de preparados proteicos, tais como capacidade de absorção e retenção de água, solubilidade em água, umidificação, expansão, e outras, estão relacionadas a sua hidratação. Do ponto de vista prático, a solubilidade da proteína é um bom índice do potencial para aplicação do ingrediente num alimento (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Considerando que o processo de extrusão acarreta modificação na estrutura molecular das proteínas e, como consequência, as suas propriedades físico-químicas e tecnofuncionais são alteradas, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da umidade da amostra, temperatura e velocidade de rotação do parafuso durante a extrusão do GM sobre as propriedades de hidratação das proteínas (solubilidade e absorção de água), visando a otimização para os maiores valores dessas propriedades dentre os extrusados, uma vez que o material de partida possui baixa solubilidade e absorção de água. O efeito da extrusão, na condição otimizada, sobre outras propriedades tecnofuncionais, físicas e químicas do GM também foi avaliado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2. 1 Material

O GM, marca Protenose BB1100, lote 0001618698 foi adquirido da Cooperativa COMIGO (Rio Verde, GO, Brasil). A matéria-prima foi mantida em câmara fria (4 °C) até a extrusão e execução das análises. Os reagentes e soluções utilizados apresentavam nível analítico.

### 2. 2 Efeito e otimização da extrusão sobre as propriedades de hidratação do GM

#### 2. 2. 1 Extrusão

A extrusão do GM foi feita em um extrusor de parafuso único (AX Plásticos, modelo LAB-16/40, São Paulo, Brasil), com diâmetro (D) = 16 mm, comprimento (L) = 40D, temperaturas de 90 °C e 135 °C na primeira e segunda zona de aquecimento, respectivamente, e 145 °C na zona de saída. Os níveis de umidade da amostra, temperatura da terceira zona de aquecimento e velocidade de rotação do parafuso variaram conforme o planejamento experimental (Tabela 1). As amostras (umidade = 8,94 g/100 g) foram preparadas para umidades requeridas para extrusão (Tabela 1), acondicionadas em sacos de polietileno e mantidas em câmara fria (4 °C) por 24 horas. Após, foram deixadas em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C) por, aproximadamente, duas horas e submetidas a extrusão. As amostras extrusadas foram secas em estufa a 70 °C durante 2 horas, moídas em moinho de faca (Tecnal, modelo R-TE-650/1, Brasil), classificadas em malha fina (0,15 mm) (MURATE; PRUDÊNCIO-FERREIRA, 1999; DA COSTA et al., 2010), e mantidas em câmara fria (4 °C) até análises. Você pôs

#### 2. 2. 2 Planejamento experimental para otimização da extrusão do GM

Um delineamento experimental fatorial completo, com dois pontos centrais (CCD)  $2^3$  foi empregado para investigar o efeito da extrusão sobre a capacidade de absorção de água (CAA) e solubilidade das proteínas em pH 7,0 (PS7). As três variáveis independentes (umidade da amostra, temperatura da terceira zona de aquecimento da extrusora e a velocidade de rotação do parafuso) em dois níveis extremos, selecionadas a partir de testes preliminares e dados da literatura (DA COSTA et al., 2010), resultaram em 16 ensaios (Tabela 1). Os ensaios foram realizados em ordem aleatorizada.

### 2. 2. 3 Capacidade de absorção de água (CAA)

Para medir a CAA, a amostra foi suspensa em água destilada ( $0,02 \text{ g mL}^{-1}$ ), agitada em mesa agitadora (SOLAB, modelo SL-180/A, Piracicaba, Brasil) (250 rpm) e centrifugada (Centrífuga 5804 R Eppendorf, Alemanha) a 3000 g por 10 minutos (BENJARANO-LUJÁN; NETO, 2010). Ela foi calculada pela razão entre as massas do sedimento úmido e da amostra inicial seca, e expressa em g de água absorvida/g de matéria seca.

**Tabela 1** – Planejamento fatorial completo com dois pontos centrais ( $2^3$ ), três variáveis independentes e dois níveis para extrusão do farelo de glúten de milho.

Ensaio	U (X <sub>1</sub> )	T (X <sub>2</sub> )	VP (X <sub>3</sub> )	Variáveis resposta	
				CAA <sup>a</sup>	PS7 <sup>a</sup>
1	-1 (24)	-1 (127)	-1 (50)	1,49	8,56
2	-1 (24)	-1 (127)	+1 (100)	2,07	7,12
3	-1 (24)	+1 (153)	-1 (50)	2,18	7,74
4	-1 (24)	+1 (153)	+1 (100)	1,48	7,48
5	+1 (36)	-1 (127)	-1 (50)	1,77	5,32
6	+1 (36)	-1 (127)	+1 (100)	2,71	6,04
7	+1 (36)	+1 (153)	-1 (50)	2,00	10,05
8	+1 (36)	+1 (153)	+1 (100)	1,87	7,58
9	-1,68 (20)	0 (140)	0 (75)	1,98	9,38
10	+1,68 (40)	0 (140)	0 (75)	1,62	7,48
11	0 (30)	-1,68 (120)	0 (75)	3,25	5,16
12	0 (30)	+1,68 (160)	0 (75)	1,68	6,55
13	0 (30)	0 (140)	-1,68 (33)	1,98	10,15
14	0 (30)	0 (140)	+1,68 (117)	2,08	9,90
15 (C)	0 (30)	0 (140)	0 (75)	2,08	8,71
16 (C)	0 (30)	0 (140)	0 (75)	1,92	8,20
<b>Controle</b>	-	-	-	3,27	19,05

<sup>a</sup> Média de três repetições.

U = umidade da amostra (% bs). T = temperatura da terceira zona de extrusão (°C). VP = velocidade de rotação do parafuso (rpm). CAA = capacidade de absorção de água (g de água absorvida/g de matéria seca<sup>-1</sup>). PS7 = proteína solúvel em pH = 7,0 (g 100g<sup>-1</sup>). C = ponto central. Controle = não extrusado.

#### 2. 2. 4 Solubilidade proteica em pH 7,0 (SP7)

Suspensões aquosas da amostra com concentrações proteicas de 18,2 a 20,5 mg mL<sup>-1</sup> foram preparadas e pH ajustado para 7,0 com auxílio de solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> (CANELLA, 1978, com algumas modificações). Durante o ajuste do pH, as suspensões de amostras foram mantidas a 30°C sob agitação em mesa agitadora (SOLAB, modelo SL-180/A, Piracicaba, Brasil) a 250 rpm por 120 minutos, e o pH monitorado a cada 30 minutos por método potenciométrico (pHmetro Microprocessado, modelo de bancada, Bel Engineering, Itália). As suspensões foram centrifugadas a 4°C (Centrífuga refrigerada 5804 R Eppendorf, Alemanha) a 10.000 g por 25 minutos e as proteínas foram determinadas no sobrenadante pelo método espectrofotométrico de Lowry como descrito por Peterson (1979) (espectrofotômetro Libra S22, Biochrom, Inglaterra, UK). A curva analítica foi de albumina de soro bovino (0,02 – 0,2 mg mL<sup>-1</sup>) ( $y = 0,06383x + 0,0181$ ,  $R^2 = 0,9932$ ,  $p < 0,05$ ). O resultado foi expresso em grama de proteína solúvel/100g de proteína total na amostra.

#### 2. 2. 5 Análise estatística dos dados

Os dados experimentais foram submetidos à análise de regressão e de variância (ANOVA). Os termos lineares e quadráticos das variáveis independentes e suas interações foram avaliados. Os modelos de resposta foram expressos de acordo com a equação  $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_2X_2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_3X_3 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3$ , onde Y é a variável resposta e  $\beta$  é o coeficiente de variação estimado para cada termo. Curvas de contorno foram geradas para os modelos ajustados. Empregou-se o programa Statistica 7.0 (STATSOFT, Inc., 2011) e  $p < 0,05$ .

As propriedades de hidratação do GM extrusado foram otimizadas (considerando as maiores CAA e PS7 após o processamento) a partir da maximização simultânea das duas variáveis resposta e da função de desejabilidade geral do software Statistica 7.0 (STATSOFT, Inc., 2011). Os experimentos foram realizados em três réplicas e os modelos validados por comparação entre os valores previstos e os resultados experimentais (teste t de Student,  $p < 0,05$ ).

#### 2.3 Propriedades estruturais das proteínas do farelo de glúten de milho controle (GM) e extrusado otimizado (EGMO)

### 2.3.1 Perfil eletroforético das proteínas

Suspensões de GM (1,5 m/v) e EGMO (3,0 m/v) foram preparadas e, posteriormente, dissociadas em tampão redutor (Tris-HCl 62,5 mmol L<sup>-1</sup>, 20% de glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, pH 6,8) à 0,4% e, então, aquecidas a 95 °C por 4 minutos (LAMMLI, 1970). O perfil eletroforético das proteínas foi determinado em dois géis de poliacrilamida (de separação a 20% e de empacotamento a 4%) contendo SDS (SDS-PAGE). A esses géis foram aplicadas alíquotas de 10 µL das soluções de amostra (0,4% de proteínas) e de padrão de massa molecular de 20 – 250 kDa (Precision Plus Protein, cód. 161-0373, Bio-Rad) e o sistema foi conectado a corrente elétrica a 90 V e 30 mA por 5 horas para separação das proteínas. O tampão de corrida utilizado para a separação foi Tris-HCl 0,52 mol L<sup>-1</sup>, glicina 0,53 mol L<sup>-1</sup> e SDS 1% (pH 8,9). As bandas das proteínas separadas foram coradas com solução de Coomassie Blue G-250 0,1% e descoradas em solução de ácido acético/metanol/água (1:4:5) (LAMMLI, 1970).

### 2.3.2 Interações não-covalentes proteína-proteína

A estimativa das alterações nas interações não-covalentes foi feita a partir da solubilidade das proteínas em diferentes soluções de tampão fosfato com e sem os reagentes ureia e ou SDS. A solubilidade foi medida a partir da suspensão das amostras (19,2 – 21,3 mg de proteína mL<sup>-1</sup>) em diferentes soluções: (I) tampão fosfato pH 7,6; (II) tampão fosfato pH 7,6 e ureia 8 M; (III) tampão fosfato pH 7,6 e SDS 1,5%; e (IV) tampão fosfato pH 7,6, ureia 8M e SDS 1,5% conforme descrito por Burgess e Stanley (1976) e Prudêncio-Ferreira e Arêas (1993). As proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A curva analítica consistiu em albumina de soro bovino (0,1 – 0,9 mg mL<sup>-1</sup>) ( $y = 18,017x + 0,0755$ ,  $R^2 = 0,9939$ ,  $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em mg de proteína mL<sup>-1</sup>. A solubilidade proteica em cada solvente indicou as interações não-covalentes (interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) responsáveis pela estabilidade das estruturas nativa e desnaturada.

### 2.3.3 Teores de grupos sulfidrilas e ligações dissulfeto das proteínas

Os teores de grupos sulfidrilas (-SH) e ligações dissulfeto (SS) das proteínas foram determinados com o reativo de Ellman, DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) conforme descrito por Beveridge et al. (1974) e Prudêncio-Ferreira e Arêas (1993).

O conteúdo de SH<sub>T</sub> ou SH<sub>L</sub> foi calculado usando a equação 1 (HU et al., 2010):

$$SH_T \text{ ou } SH_L = \frac{73,53 \times (Abs_{am} - Abs_{bco}) \times D}{C} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: SH<sub>T</sub> = teor de grupos sulfidrila total; SH<sub>L</sub> = teor de grupos sulfidrila livre; Abs<sub>am</sub> = absorvância das amostras; Abs<sub>bco</sub> = absorvância do branco; D = fator de diluição e C = concentração de proteína da amostra (mg mL<sup>-1</sup>), determinada pelo método Kjeldahl.

A proporção de ligações dissulfeto (S-S) foi calculada pela equação 2:

$$SS = \frac{(SH_T - SH_L)}{2} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: SH<sub>T</sub> = teor de grupos sulfidrila total; SH<sub>L</sub> = teor de grupos sulfidrila livre.

Os resultados foram expressos em μmol SH<sub>L</sub> ou SS g proteína total<sup>-1</sup> do GM e EGMO.

### 2.3.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

As amostras foram previamente condicionadas em dessecador com cloreto de cálcio (umidade relativa de 0%), por 48 horas a 25°C para retirada da umidade. As análises foram realizadas na região do infravermelho médio com transformada de Fourier, atingindo número de onda de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> e resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup>, com auxílio do espectrofotômetro FT-IR 8300 da marca Shimadzu (Kyoto, Japão). Foram realizadas 200 varreduras em cada amostra.

## 2. 4 Caracterização física, química e tecnofuncional do GM e EGMO.

### 2. 4. 1 Cor e composição química

Os parâmetros de cor L\* (luminosidade, onde 0 = preto e 100 = branco), a\* (vermelho/verde), b\* (azul/amarelo) (HUNTERLAB, 2008) foram obtidos em colorímetro (Konica Minolta, modelo CR-400, Japão). Foram calculados o ângulo Hue (h, onde 0° = vermelho puro, 90° = amarelo puro, 180° = verde puro e 270° = azul puro) e cromaticidade (C\*) (MCGUIRE, 1992), conforme as equações 3 e 4.

$$h = \tan^{-1} b^*/a^* \quad \text{Equação 3}$$

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{Equação 4}$$

A umidade, cinzas, proteínas (N x 6,25) e lipídios foram determinadas conforme a AOAC (1995) e carboidratos obtidos por diferença. Fibras solúvel e insolúvel foram determinadas por

método enzimático, utilizando as enzimas  $\alpha$ -amilase, amiloglicosidase e protease da marca Sigma, conforme descrito na AOAC (2012).

#### 2. 4. 2 Propriedades tecnofuncionais

##### 2. 4. 2. 1 Solubilidade proteica em diferentes pHs

Suspensões aquosas das amostras com concentrações proteicas de 18,2 a 20,5 mg mL<sup>-1</sup> foram preparadas e o pH ajustado para 2 até 12 com auxílio de soluções de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e a solubilidade determinada conforme o item 2.2.4. O resultado foi expresso em grama de proteína solúvel por 100g de proteína total na amostra.

##### 2. 4. 2. 2 Capacidade de absorção de água (CAA) ou óleo (CAO)

Empregou-se a metodologia descrita no item 2.2.3. Para CAO substituiu-se a água por óleo de soja (BENJARANO-LUJÁN; NETO, 2010).

##### 2. 4. 2. 3 Propriedades espumantes

A amostra suspendida em água (0,03 g mL<sup>-1</sup>) foi agitada (agitador de haste, TE 102, Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 5.000 rpm por 2 minutos. A capacidade de formação de espuma foi medida como a porcentagem do aumento de volume após a formação da espuma. A estabilidade da espuma foi determinada como a porcentagem de redução do volume após a proveta com a espuma permanecer em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos (CANELLA, 1978).

##### 2. 4. 2. 4 Propriedades emulsificantes

Para a capacidade emulsificante, em uma suspensão de 1:25 (m/v) de amostra e água, sob agitação constante a 5.000 rpm (Ultra-turrax IKA – Tube drive control, EUA), foi adicionado óleo de soja comercial a uma taxa de 10 mL min<sup>-1</sup> e o ponto de inversão registrado visualmente pela liquefação da emulsão. A capacidade emulsificante foi expressa como o volume (mL) de óleo emulsificado por grama de amostra (SEIBEL; BELÉIA, 2009).

Para a atividade emulsificante e estabilidade da emulsão preparou-se uma emulsão com amostra, água destilada e óleo de soja comercial (1:10:10 m/v/v) com auxílio de agitador de haste (TE-102 TURRACTEC, Brasil) a 16.000 rpm por 1 min. Posteriormente, a emulsão foi

centrifugada (Centrífuga 5804R Eppendorf, Alemanha) a 1.500 g por 5 minutos. O resultado foi expresso como a relação do volume de camada emulsificada e o volume total da amostra, em porcentagem (SEIBEL; BELÉIA, 2009).

A estabilidade da emulsão foi determinada conforme Donadel e Prudencio-Ferreira (1999) a partir da emulsão descrita anteriormente, sendo aquecida em banho-maria (Ma 127, MARCONI, Brasil) a 80°C por 30 min e resfriada em água corrente por 15 min, sendo centrifugada e calculada como a relação do volume remanescente da camada emulsionada e o volume total da camada emulsionada, em porcentagem.

2. 4. 3 Análise estatística dos dados do efeito da extrusão, na condição otimizada, sobre propriedades tecnofuncionais, físicas e químicas do GM

As determinações das características físicas, químicas e tecnofuncionais do GM e EGMO foram repetidas três vezes; e a medida de cor foi repetida seis vezes. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA, one way) e teste de comparação de médias t de Student e nível de significância de 5% com auxílio do Software Statistica 7.0 (STATSOFT, Inc., 2011).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3. 1 Efeito da extrusão nas propriedades de hidratação do GM**

Os parâmetros de extrusão influenciaram as propriedades de hidratação (CAA e PS7) do GM (ensaios 1 – 16, Tabela 1). A CAA variou de 1,01 (ensaio 4, menor umidade, maior temperatura, e velocidade de rotação do parafuso intermediária) a 3,00 g de água absorvida g de matéria seca<sup>-1</sup>, (ensaio 11, umidade e velocidade intermediárias, e menor temperatura) e a PS7 de 5,16 (ensaio 11) a 10,15 g de proteína solúvel 100 g<sup>-1</sup> (ensaio 13, umidade e temperatura intermediárias, e menor velocidade). A análise de regressão e ANOVA indicaram diferenças significativas para os efeitos lineares, quadráticos e suas interações ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). Alguns termos não significativos foram mantidos na equação devido a sua contribuição para o ajuste matemático do modelo. Assim, os modelos apresentaram  $R^2 \geq 0,7$  e a falta de ajuste não foi significativa ( $p > 0,05$ ), o que confirma um ajuste desejável aos dados (GRANATO; CALADO; JARVIS, 2014).

**Tabela 2** – Coeficientes de regressão e ANOVA dos modelos matemáticos das funções respostas.

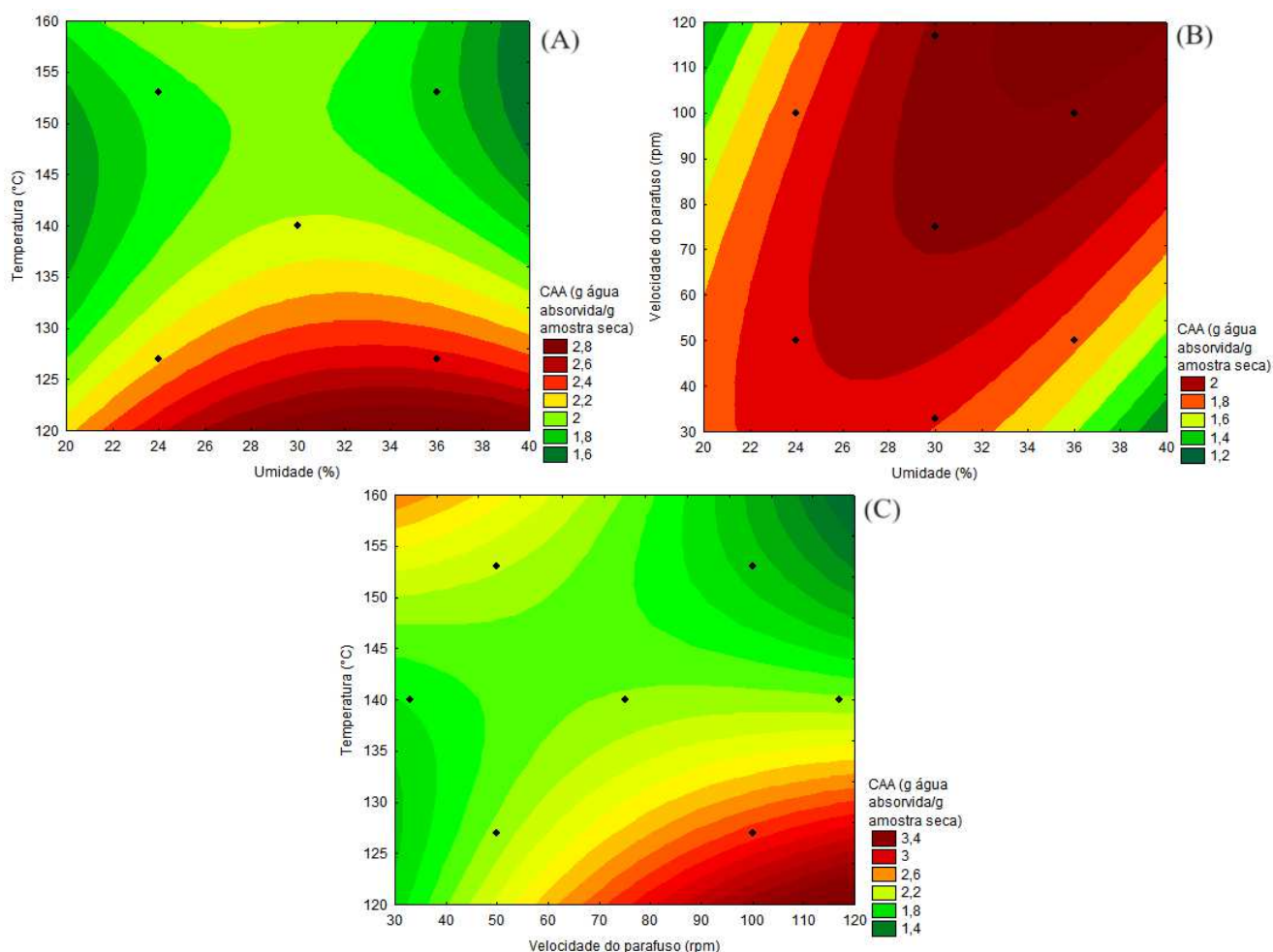
Parâmetros	Coeficiente de regressão ( $\beta$ )	
	CAA	PS7
<b>Intercepto</b>		
$\beta_0$	1,963 <sup>a</sup>	8,519 <sup>a</sup>
<b>Linear</b>		
$\beta_1$	0,038	-0,374
$\beta_2$	-0,256 <sup>a</sup>	0,597 <sup>a</sup>
$\beta_3$	0,062	-0,284
<b>Quadrático</b>		
$\beta_{11}$	-0,100	-0,148
$\beta_{22}$	0,170	-1,058 <sup>a</sup>
$\beta_{33}$	ns	0,415
<b>Interação</b>		
$\beta_{12}$	ns	0,843 <sup>a</sup>
$\beta_{13}$	0,116	-0,006
$\beta_{23}$	-0,294	-0,251
<b>R<sup>2</sup></b>	0,675	0,873
<b>R<sup>2</sup>ajustado</b>	0,392	0,683
<b>Lack of fit (p-value)</b>	0,115	0,793

ns = termos não significativos removidos do modelo; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação. <sup>a</sup>parâmetro significativo (p < 0,05). Números subscritos 1, 2 e 3 representam a umidade, temperatura e velocidade do parafuso, respectivamente. CAA = capacidade de absorção de água (g de água absorvida g de matéria seca<sup>-1</sup>) e PS7 = proteína solúvel em pH = 7,0 (g de proteína 100 g<sup>-1</sup>).

A CAA foi afetada negativamente pelo efeito linear da temperatura ( $\beta_2$ ) (p < 0,05) (Tabela 2). As curvas de contorno demonstraram que as melhores condições (associação da temperatura e umidade) de extrusão, para se obter as maiores CAA, estão em aproximadamente 120°C (temperatura baixa) e umidade entre 24 e 40% (Figura 1A). Associação de umidades superiores a 34% a velocidades intermediárias a alta do parafuso contribuiu para maiores CAA. Melhores

respostas de CAA também podem ser obtidas considerando alta velocidade do parafuso, acima de 70 rpm, e baixa umidade da amostra, em torno de 20% (Figura 1B). As melhores condições de processamento, considerando CAA elevada, são alcançadas pela associação de alta velocidade do parafuso com baixa temperatura (Figura 1C).

**Figura 1** – Curvas de contorno do efeito da umidade (%), temperatura (°C) e velocidade do parafuso (rpm) sobre a capacidade de absorção de água (CAA) (g de água absorvida/g de amostra seca<sup>-1</sup>)



CAA = capacidade de absorção de água.

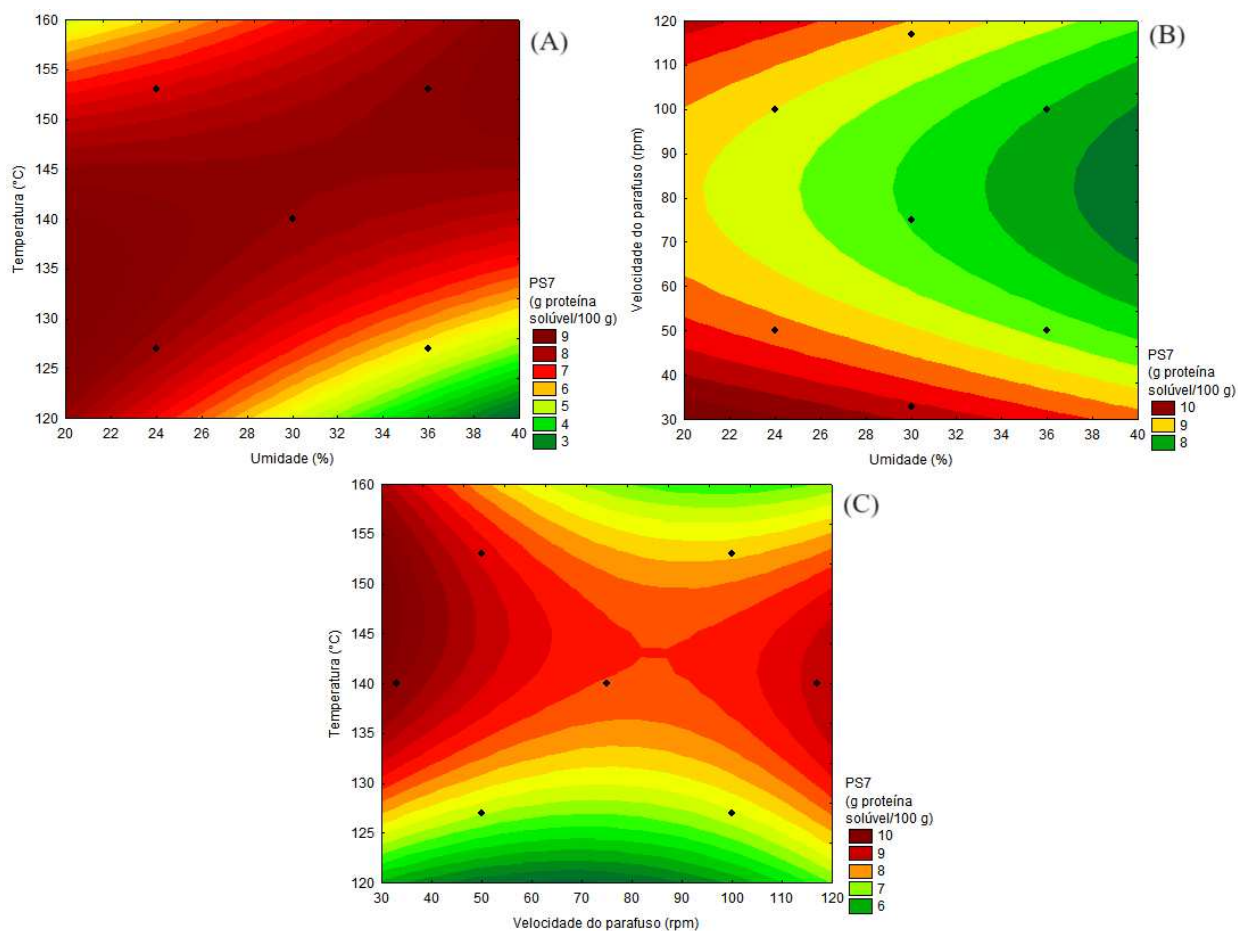
As maiores CAA foram observadas nos ensaios 6 e 11 (Tabela 1), quando a temperatura era mais branda, em torno de 120 e 127°C, umidade em torno de 30 a 36% e velocidade de rotação do parafuso intermediária-alta (75 a 100 rpm). Houve diminuição de 0,61 a 54,75% da CAA dos

GMs extrusados em relação ao controle (GM) (Tabela 1). Conforme observado neste estudo, Neuman, Jasberg e Wall (1984), Chaidez-Laguna et al. (2016) e Zhang et al. (2023) relataram menores CAA após o processo de extrusão, e esse resultado foi justificado pela natureza hidrofóbica das proteínas de milho e pelas mudanças estruturais das moléculas de proteínas durante o processamento, formando agregados com menor disponibilidade de grupamentos funcionais e de poros para ligação e retenção das moléculas de água (ZHANG et al., 2023).

A PS7 foi afetada positivamente pelo efeito linear da temperatura ( $\beta_2$ ) e pela interação da umidade e temperatura ( $\beta_{12}$ ) e negativamente pelo efeito quadrático da temperatura ( $\beta_{22}$ ) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). As curvas de contorno demonstraram que a associação da temperatura com a umidade expressa valores superiores a 6% de proteína solúvel se forem aplicadas temperaturas entre 120-145°C, e umidade entre 20 e 40% (Figura 2A). Uma solubilidade proteica superior a 10% é possível pela combinação de velocidades do parafuso entre 70 e 90 rpm com a umidade de 40% (Figura 2B) ou pela associação de temperaturas entre 130-160°C à baixa rotação do parafuso (20 rpm) (Figura 2C).

A maior SP7 das amostras extrusadas foi encontrada nas condições de extrusão mais brandas, como menores umidade da amostra, temperatura e velocidade do parafuso (ensaios 1, 9, 13, 15 e 16, Tabela 1). A combinação da alta velocidade do parafuso com umidade e temperatura médias também contribuíram para aumento da solubilidade da proteína do GM extrusado (ensaio 14) (Tabela 1), assim como, a combinação de altas umidades e temperaturas com baixa velocidade do parafuso durante a extrusão (ensaio 7) (Tabela 1). Entretanto, destaca-se que a extrusão causou redução da solubilidade das proteínas em relação ao controle de 46,72 a 72,91%, evidenciando que as condições de processamento afetam a solubilidade das proteínas. Resultado semelhante foi relatado por Yoshida, Silva e Prudencio (2022) que observaram que quanto maior a umidade da amostra de okara menor a diminuição da solubilidade proteica. De acordo com estudos anteriores a alteração na solubilidade das proteínas está relacionada com alterações estruturais e formação de agregados proteicos pouco solúveis (YOSHIDA; SILVA; PRUDENCIO, 2022; MURATE; PRUDENCIO-FERREIRA, 1999; MOZAFARPOUR et al., 2019; GULATI; BRAHMA; ROSE, 2020).

**Figura 2** – Curvas de contorno do efeito da umidade (%), temperatura (°C) e velocidade do parafuso (rpm) sobre a solubilidade proteica em pH 7,0 (SP7) (g de proteína solúvel 100 g<sup>-1</sup>)



PS7 = proteína solúvel em pH = 7,0

Os resultados observados para CAA e PS7 relacionaram-se com as alterações ocorridas nas moléculas de proteínas devido à extrusão nas diferentes condições. Conforme Mosibo et al. (2020), essas alterações envolvem mecanismos complexos relacionados às interações intermoleculares e intramoleculares, sendo que quanto maior a umidade (aproximadamente, 40%) do material proteico maior o rearranjo molecular durante o resfriamento. Entretanto, não foi possível observar a influência da umidade nas propriedades de hidratação do GM, sendo significativa a influência da temperatura de extrusão, que em conjunto com o cisalhamento do parafuso da extrusora é responsável por modificar a conformação estrutural das proteínas. A modificação estrutural das proteínas envolve desnaturação com desdobramento, realinhamento, reestruturação, incluindo a associação, agregação, coagulação conduzidas por reticulação covalente, interação eletrostática e

hidrofóbica (CHEN et al., 2021, MOSIBO et al., 2020, SCHMID et al., 2022; WANG et al., 2022; LI et al., 2018; PIETSCH; EMIN; SCHUCHMANN, 2017; PRUDÊNCIO-FERREIRA; ARÊAS, 1993). As alterações da CAA no GM extrusado podem, também, ser resultado da gelatinização do amido presente na amostra (aproximadamente 15%) (GIANNENAS et al., 2017) durante o processo de extrusão (WANG et al., 2023).

### 3. 2 Otimização das variáveis da extrusão sobre as respostas de hidratação e validação experimental

Sabendo-se que o GM possui baixas CAA e PS7, a otimização das condições de extrusão para alcançar os maiores valores dessas propriedades, dentre as amostras extrusadas, visou comprometer pouco as outras propriedades tecnofuncionais que dependem da hidratação das proteínas e ampliar o seu emprego nos produtos alimentares.

As condições de extrusão, obtidas a partir da deseabilidade e otimização, para obter, simultaneamente, as maiores CAA e PS7, foram 20% de umidade da amostra, 120°C de temperatura na zona de aquecimento e 117 rpm para a velocidade do parafuso. Em relação ao controle, a extrusão nestas condições, resultou em diminuição de 15,29% para CAA e de 45,88% para SP7 do GM (Tabela 3). Entretanto, essa redução é menor quando comparada com outras condições de extrusão. Além disso, para essas condições, as respostas previstas não difeririam dos resultados experimentais ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3), permitindo a utilização dos modelos propostos para propósitos preditivos.

**Tabela 3** – Validação das funções respostas utilizando a condição desejável<sup>1</sup> de extrusão de farelo de glúten de milho.

Variável	Resposta preditiva <sup>2</sup>	Resposta experimental <sup>2</sup>
CAA	3,13 ± 0,25 <sup>a</sup>	2,74 ± 0,15 <sup>a</sup>
PS7	9,85 ± 4,33 <sup>a</sup>	10,31 ± 2,63 <sup>a</sup>

CAA, capacidade de absorção de água (g de água absorvida/g de amostra); PS7, proteína solúvel em pH 7 (g de proteína 100 g<sup>-1</sup>). <sup>1</sup>Condições de extrusão: umidade da amostra = 20%, temperatura = 120°C, velocidade do parafuso = 117 rpm. <sup>2</sup>Valores de média ± desvio padrão com três repetições. Médias na mesma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ).

O GM é um subproduto com potencialidade para aplicação em produtos de panificação visando a substituição parcial ou total da farinha de trigo, porque as proteínas desse cereal são formadas por gliadinas e gluteninas (ZHUANG et al., 2013; OZTURK; MERT, 2018). Nestes produtos de trigo, deseja-se baixa solubilidade das proteínas para que haja a formação da rede de glúten, além de CAA suficiente para reter algumas moléculas de água na massa, mantendo-a hidratada (FLAMBEAU; REDL; RESPONDEK, 2017). A PS7 do glúten de trigo é de aproximadamente 8 - 11% (DENG et al., 2016; ARNOLD; CHOUDHURY; EDANGORIA, 1964) valor próximo ao encontrado neste estudo para o GM extrusado e otimizado.

### 3.3 Alterações estruturais das proteínas após extrusão do GM

A partir da solubilidade proteica em solventes de diferentes modos de ação (Tabela 4) foram investigadas as alterações nas principais interações não-covalentes estabilizantes das moléculas de proteínas após a extrusão.

A solução tampão fosfato extrai proteínas em seu estado conformacional natural ou nativo e a adição de SDS pode romper as interações hidrofóbicas das proteínas (ZHANG et al., 2022), enquanto o acréscimo de ureia contribui para o rompimento das ligações de hidrogênio das proteínas (DOU et al., 2022).

A solubilidade proteica de EGMO nas diferentes soluções foi menor ( $p < 0,05$ ) que no GM, indicando alterações na estrutura das proteínas, com exceção na solução II (fosfato e ureia) que não variou (Tabela 4). Menor solubilidade proteica de extrusados em soluções com fosfato, fosfato e ureia, fosfato e SDS e a combinação dos três foram relatados por diversos autores que analisaram proteínas de soja (DOU et al., 2022; PRUDÊNCIO-FERREIRA; ARÊAS, 1993) e isolado proteico de ervilha (ZHANG et al., 2022).

Em tampão fosfato (solução I), a solubilidade proteica reduziu quase a metade (1,97 vezes) após a extrusão do GM, indicando a saída do estado nativo, ou seja, houve desnaturação e/ou agregação das proteínas, como resultado da extrusão (ZHANG et al., 2022). Quando a ureia foi acrescentada ao tampão fosfato (solução II), a solubilidade aumentou 3,37 vezes no EGMO e apenas 1,72 vezes no GM, indicando a importância das ligações de hidrogênio na nova estrutura da proteína extrusada (DOU et al., 2022). No caso do acréscimo de SDS (solução III) o aumento foi de 3,22 vezes no extrusado e de 2,59 vezes para o controle, mostrando a relevância das

interações hidrofóbicas na estabilidade da conformação da proteína após a extrusão (ZHANG et al., 2022). Com o acréscimo da ureia juntamente com SDS (solução IV), o aumento da solubilidade foi de 5,03 vezes e de 2,85 vezes para extrusado e controle, respectivamente, confirmando que as interações não covalentes estabilizam a conformação das proteínas após a extrusão do material.

**Tabela 4** – Solubilidade proteica ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) em diferentes soluções e teores ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) de sulfidrilas livres total ( $\text{SH}_L$ ), sulfidrilas total ( $\text{SH}_T$ ) e ligações dissulfeto (SS) de farelo de glúten de milho controle (GM) e extrusado (EGMO).

<b>Solubilidade ou teor</b>	<b>GM</b>	<b>EGMO</b>
<b>Solução I</b>	29,23 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup>	14,83 $\pm$ 1,91 <sup>b</sup>
<b>Solução II</b>	50,42 $\pm$ 2,07 <sup>a</sup>	49,95 $\pm$ 2,08 <sup>a</sup>
<b>Solução III</b>	75,67 $\pm$ 2,07 <sup>a</sup>	48,22 $\pm$ 1,26 <sup>b</sup>
<b>Solução IV</b>	83,39 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>	74,56 $\pm$ 1,50 <sup>b</sup>
<b>SH<sub>L</sub></b>	8,61 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	6,49 $\pm$ 0,66 <sup>b</sup>
<b>SH<sub>T</sub></b>	27,89 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	29,42 $\pm$ 1,69 <sup>a</sup>
<b>SS</b>	9,63 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>	11,46 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>

Médias na mesma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ). Solução I (Tampão fosfato pH 7,6), solução II (Solução I e ureia), solução III (Solução I e SDS), solução IV (Solução I, ureia e SDS).

Notou-se redução (1,33 vezes) do teor dos grupos SH livres em favor da formação de ligações dissulfeto (aumento de 1,19 vezes) ( $p < 0,05$ ), sem haver alterações no total de grupos  $\text{SH}_T$  nas proteínas após a extrusão do GM (Tabela 4), estando em conformidade com estudos com extrusão de isolados proteicos de soja (PRUDÊNCIO-FERREIRA; ARÊAS, 1993), de ervilha (OSEN et al., 2015) e de feijão (ALONSO et al., 2000). Estes autores descreveram que as modificações nos grupos  $\text{SH}_L$  e  $\text{SH}_T$  são resultados da oxidação da cisteína e/ou à formação de novas ligações cruzadas intermoleculares e intramolecular após a redução da cistina como um rearranjo de reticulação dissulfeto intermolecular durante o processamento. Zhang et al. (2022) relataram que a extrusão em baixas temperaturas causa pouca mudança conformacional das proteínas, resultando em pouco aumento nas ligações dissulfeto, devido ao menor atrito entre o material e o barril quando associado a alta velocidade do parafuso, diminuindo assim os teores de sulfidrilas livres totais nas proteínas.

Pode-se inferir que, no presente estudo, as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, seguidas das ligações dissulfeto foram as principais forças estabilizantes dos agregados proteicos formados após a extrusão de GM. Enquanto para Zhang et al. (2023), estudando GM extrusado em temperaturas de 80, 100, 120 e 140°C, as interações hidrofóbicas e as ligações dissulfeto foram as principais forças estabilizantes da nova estrutura, independente da temperatura da extrusão.

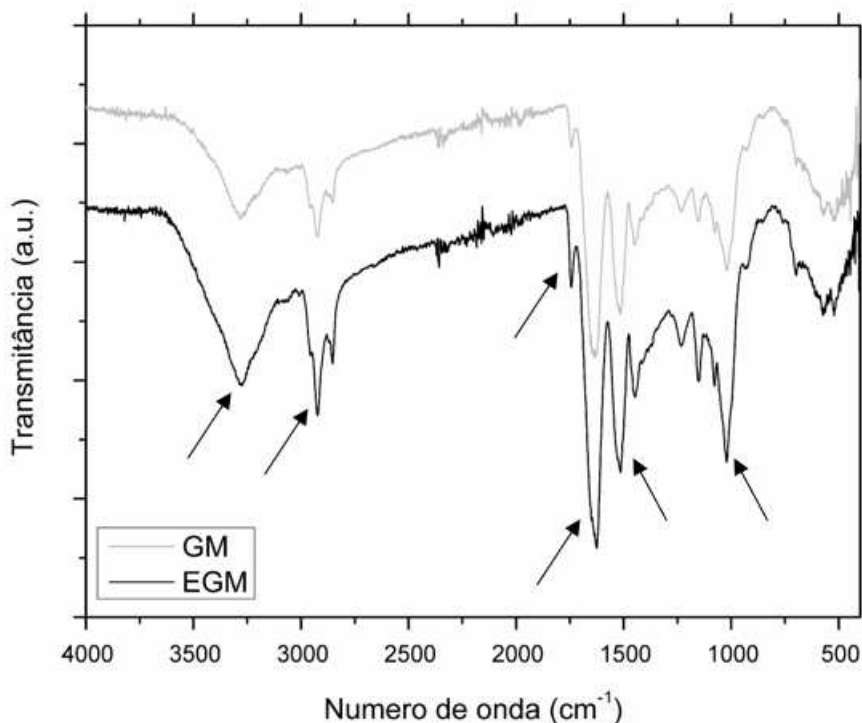
A análise de FTIR indicou aumento na intensidade de algumas bandas no EGMO (Figura 3). Observou-se a presença de uma banda em, aproximadamente, 1000  $\text{cm}^{-1}$  relacionada a ligações amida. Em amostras de farinha de milho extrusadas, Cueto et al. (2018) relataram a presença dessa banda e a atribuíram a  $\alpha$ -zeína. Para GM e EGMO foi possível visualizar a presença de bandas características de amida I (em, aproximadamente, 1636  $\text{cm}^{-1}$ ) e amida II (em 1520  $\text{cm}^{-1}$ ) sendo mais intensa para EGMO, o que pode indicar maior dobramento na estrutura ou agregação destas proteínas. Prudêncio-Ferreira e Arêas (1993) relataram que a banda amida I corresponde ao estiramento de C=O (80%), estiramento C-N (10%) e deformação angular N-H no plano de ligação peptídica (10%), enquanto a amida II corresponde a deformação angular N-H no plano de ligação peptídica (60%) e alongamento C-N (40%).

A presença de duas bandas em, aproximadamente, 1730 e 1636  $\text{cm}^{-1}$  tem sido atribuída à organização proteica do tipo  $\beta$ -folha (JIANG et al., 2019). Dessa forma, pode-se sugerir que a extrusão contribuiu para a intensificação dessa conformação estrutural. Resultado semelhante foi relatado por Zhang et al. (2023) na extrusão de GM em diferentes temperaturas. Zheng et al. (2020) relataram aumento de folhas  $\beta$  em relação a  $\alpha$ -hélice em blendas de milho e soja após a extrusão. Conforme Carbonaro et al. (2012) e Herrero et al. (2008) a formação da estrutura  $\beta$  durante a extrusão é um sinal da presença de agregados proteicos estáveis, contribuindo para os resultados de baixa solubilidade descritos anteriormente.

Prudêncio-Ferreira e Arêas (1993) relataram que a ureia é um solvente capaz de desestabilizar a conformação  $\beta$ -folha, o que foi confirmado pelo aumento da solubilidade do GM e EGMO em soluções com ureia (Tabela 4). A formação da estrutura  $\beta$ -folha necessita de alta energia e alto cisalhamento que induzem a desnaturação e cisão da estrutura secundária. Entretanto, a extrusão favorece a justaposição de proteínas permitindo uma estrutura tridimensional com folhas antiparalelas (PRUDÊNCIO-FERREIRA; ARÊAS, 1993).

A banda em  $3280\text{ cm}^{-1}$  relaciona-se com a vibração de alongamento de -OH, -NH e -CH. Em proteínas essa banda é alargada devido à presença dos três grupos funcionais (ácido carboxílico, amida e amina), conforme descrito por Zhang et al. (2022) para proteínas de ervilhas isoladas. O pico agudo próximo a  $2017\text{ cm}^{-1}$  (Figura 3) relaciona-se com a vibração de estiramento-CH em carbono saturado, conforme descrito por Chen et al. (2011).

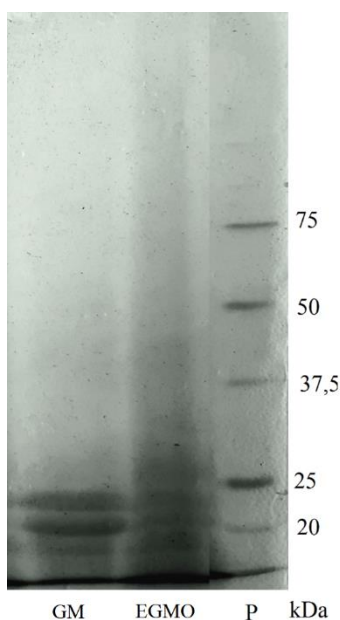
**Figura 3** – FTIR do farelo de glúten de milho controle (GM) e extrusado (EGMO)



A eletroforese das proteínas do GM e EGMO (Figura 4) mostrou a presença de bandas características de alfa-zeínas (em torno de 22 e 24 kDa) e dímeros de zeína ou  $\gamma$ -zeína (em torno de 36 kDa), estando de acordo com o observado por Montoya-Rodríguez et al. (2020) em milho azul e Uan-on, Baibang e Shuwisitkul (2018) em zeína isolada. Assim como, relatado por outros autores não foram identificadas bandas características de glutelina (próximo de 40-45 kDa) (SINGH et al., 2022; ZHENG et al., 2006). No EGMO observou-se uma banda maior que 25 kDa, o que pode indicar agregação das  $\alpha$ -zeínas devido a extrusão, conforme descrito por Federici et al. (2020), que encontraram bandas em, aproximadamente, 30 kDa em GM extrusado. Conforme

Selling (2010), quanto menor a velocidade do parafuso (principalmente abaixo de 25 rpm) maior a agregação proteica, podendo justificar a ausência de bandas molecular que 25 kDa no estudo presente.

**Figura 4** – Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas do GM e EGMO



### 3. 4 Caracterização física, química e tecnofuncional do GM e EGMO

Os GM e EGMO diferiram ( $p < 0,05$ ) em relação aos teores de lipídios, fibras insolúveis e umidade, mas não diferiram quanto a proteínas, cinzas e carboidratos (Tabela 5). O aumento de lipídios deve-se, principalmente, a ação física das elevadas pressão e temperatura durante a extrusão, que causa a ruptura da parede celular, libera os lipídios do interior da célula e facilita a sua extração pelo solvente orgânico, considerando a técnica de Soxhlet (HAYTHORNTHWAITE, 1986). A redução das fibras insolúveis pode ser em decorrência de sua conversão para fibras solúveis, conforme demonstrado por Yoshida, Silva e Prudencio (2022) em extrusão de okara. Composição química semelhante, exceto as fibras, foi relatada por Gioia, Cud e Guilbert (1999), nos quais os GMs comercial e nativo apresentaram 67-71% de proteínas, 21-26% de carboidratos, dos quais 12-15% são amido, 3-7% de lipídeos, 1-2% de fibras e 1-2% de cinzas, em base seca (b.s.).

Os parâmetros de cor  $L^*$ ,  $h$  e  $C^*$  do GM e EGMO foram diferentes ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5). A extrusão diminuiu a  $L^*$ , tornando o material mais escuro, mas aumentou a  $C^*$ . Yoshida, Silva e Prudencio (2022) observaram resultado semelhante em extrusão de okara e relataram que quanto menor a umidade da amostra maior a redução de  $L^*$ . Para Yu, Ramaswamy e Boye (2013) a redução de  $L^*$  em blendas de proteína de soja e farinha de milho após a extrusão foi resultado da reação de Maillard durante o processamento, principalmente em condições de baixa umidade e alta temperatura. O valor de  $h$  ( $79,68 \pm 0,14$  para GM e  $79,28 \pm 0,36$  para EGMO) indicou que as amostras apresentavam tonalidade vermelho-amarelo, porém com forte tendência à cor alaranjada. Segundo Loy e Lundy (2019) o GM apresenta cor alaranjada devido à alta proporção de carotenos (49-73 mg/kg) e xantofilas (244-550 mg/kg).

Em todos os pHs avaliados, as proteínas do GM apresentaram baixa solubilidade (Figura 5), uma vez que as zeínas são mais abundantes (~ 47% b.s.), e possuem estrutura globular e cerca de 50% de aminoácidos não polares (incluindo leucina, alanina e prolina), e as glutelinas (~39% b.s.) (KASAAI, 2018; FLORES et al., 2010). O ponto isoelétrico foi, aproximadamente, 6 e 5 para GM e EGMO, respectivamente. Flores et al. (2010) relataram ponto isoelétrico para o GM entre 4,08 e 6,58, valores semelhantes aos notados neste estudo. Segundo Anderson e Lamsal (2011) a proporção de glutelinas, que são solúveis em soluções ácidas e básicas, no GM podem explicar a solubilidade em pHs extremos.

Após a extrusão do GM, houve redução da solubilidade proteica ( $p < 0,05$ ) em todos os pHs analisados (Figura 5). Zhang et al. (2023) também notaram redução na solubilidade de GM conforme o aumento da temperatura de extrusão, considerando temperaturas de 80, 100, 120 e 140°C, devido a desnaturação proteica e formação de agregados, como ocorrido na extrusão do GM otimizado (Tabela 4 e Figura 3 e 4). Ainda como resultado da extrusão, as modificações na conformação e a formação de agregados estabilizados por interações não covalentes e covalentes (dissulfeto) são responsáveis pela redução da solubilidade das proteínas, conforme relatado por outros autores (PRUDÊNCIO-FERREIRA; ARÊAS, 1993; OSEN et al., 2015; ALONSO et al., 2000; ZHANG et al. 2022; ZHANG et al., 2023).

**Tabela 5** – Composição química, cor e características tecnofuncionais do farelo de glúten de milho controle (GM) e extrusado (EGMO).

<b>Parâmetros</b>	<b>GM</b>	<b>EGMO</b>
<b>Umidade (g/100 g)</b>	8,94 ± 0,09 <sup>a</sup>	5,49 ± 0,08 <sup>b</sup>
<b>Lipídios (g/100 g)</b>	2,08 ± 0,51 <sup>b</sup>	3,81 ± 0,48 <sup>a</sup>
<b>Proteínas (g/100 g)</b>	68,28 ± 1,41 <sup>a</sup>	67,56 ± 1,76 <sup>a</sup>
<b>Fibras insolúveis (g/100 g)</b>	6,59 ± 0,38 <sup>a</sup>	4,84 ± 0,47 <sup>b</sup>
<b>Fibras solúveis (g/100 g)</b>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,08 <sup>b</sup>
<b>Cinzas (g/100 g)</b>	1,33 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,09 <sup>a</sup>
<b>Carboidratos (g/100 g)</b>	22,23 ± 1,21 <sup>a</sup>	21,80 ± 0,99 <sup>a</sup>
<b>L*</b>	70,91 ± 0,24 <sup>a</sup>	66,12 ± 0,36 <sup>b</sup>
<b>h</b>	79,68 ± 0,14 <sup>a</sup>	79,28 ± 0,36 <sup>b</sup>
<b>C*</b>	53,81 ± 1,01 <sup>b</sup>	55,13 ± 0,40 <sup>a</sup>
<b>CAO (g/g amostra)</b>	3,32 ± 0,11 <sup>a</sup>	3,34 ± 0,17 <sup>a</sup>
<b>Capacidade de formação de espuma (%)</b>	12,73 ± 1,48 <sup>a</sup>	7,43 ± 0,50 <sup>b</sup>
<b>Estabilidade da espuma (%)</b>	se	se
<b>Capacidade emulsificante (mL/g amostra)</b>	2,59 ± 0,20 <sup>b</sup>	3,12 ± 0,12 <sup>a</sup>
<b>Atividade emulsificante (%)</b>	57,79 ± 3,88 <sup>b</sup>	65,28 ± 0,05 <sup>a</sup>
<b>Estabilidade da emulsão (%)</b>	81,97 ± 2,73 <sup>a</sup>	88,26 ± 4,88 <sup>a</sup>

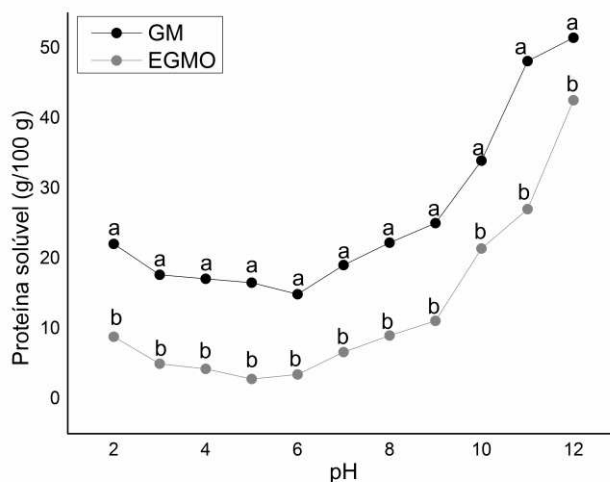
Médias na mesma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ). Resultados em base seca (b.s), exceto umidade. se = sem estabilidade. CAO = capacidade de absorção de óleo.

GM e EGMO não apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) para CAO (Tabela 5). Batista, Prudêncio e Fernandes (2010) notaram aumento ( $p < 0,05$ ) dessa propriedade após a extrusão de proteína de feijão, justificado pela formação de agregados proteicos com alta hidrofobicidade no seu interior que contribuiu para o aprisionamento de óleo.

A capacidade de formação de espuma diminuiu ( $p < 0,05$ ) após a extrusão (Tabela 5). A formação de espuma tem relação direta com a solubilidade da proteína (SHEVKANI et al. 2015), que foi reduzida após a extrusão do GM (Figura 5). O processamento térmico pode ter alterado a

conformação das proteínas de GM (Tabela 4, Figuras 3 e 4) provocando uma maior exposição de grupos hidrofóbicos, o que diminuiu a tensão superficial ar-líquido e a velocidade de adsorção das proteínas na interface e consequentemente, reduziu a capacidade de formação de espuma (ZHANG et al., 2022). Zhang et al. (2022) também relataram menor capacidade de formação de espuma após a extrusão de proteínas de ervilha. As espumas formadas tanto pelo GM como pelo EGMO não apresentaram estabilidade.

**Figura 5** – Solubilidade das proteínas do GM e EGMO em diferentes pHs



Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras em um mesmo pH.

As propriedades emulsificantes foram maiores ( $p < 0,05$ ) no EGMO do que no GM, com exceção da estabilidade da emulsão, que não variou (Tabela 5). Ma et al. (2018) relataram que a extrusão e hidrólise enzimática, usadas para liberação de grupos hidrofóbicos, de proteínas de soja contribuíram para a formação da emulsão e a sua estabilização. O aumento da capacidade e atividade emulsificante pode ser resultado da exposição de grupos hidrofóbicos das proteínas devido a extrusão (TANG; MA, 2009).

#### 4. CONCLUSÃO

A extrusão do farelo glúten de milho nas diferentes condições de umidade, temperatura e rotação do parafuso provocou redução da CAA e a PS7, mas foi possível otimizar a menor redução

dessas propriedades na condição de 20% de umidade da amostra, 120°C de temperatura na zona de aquecimento e 117 rpm. O farelo de glúten de milho extrusado otimizado apresentou aumento na capacidade e atividade emulsificante.

A extrusão diminuiu a solubilidade das proteínas em água e em diferentes pHs, devido a alterações na estrutura/conformação e agregação das moléculas de proteínas por meio do aumento de interações não covalentes e ligações dissulfetos e intensificação da estrutura do tipo folha  $\beta$  das proteínas do farelo de glúten de milho.

O farelo de glúten de milho extrusado tem potencial para ser utilizado como ingrediente em produtos de panificação e em produtos alimentícios emulsionados.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALONSO, R.; ORÚE, E.; ZABALZA, M. J.; GRANT, G.; MARZO, F. Effect of extrusion cooking on structure and functional properties of pea and kidney bean proteins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 3, p. 397 – 403, 2000.
- ANDERSON, T. J.; LAMSAL, B. P. Development of new method for extraction of  $\alpha$ -zein from corn gluten meal using different solvents. **Cereal Chemistry**, v. 88, n. 4, p. 356 - 362, 2011.
- AOAC. **Métodos oficiais de análise da AOAC International**. 16 ed. Gaithersburg, 1995.
- AOAC. **Official Method of Analysis**: Association of Analytical Chemists. 19th Edition, Washington DC, 121-130, 2012.
- ARNOLD, L. K; CHOUDHURY, R. B. R; DANGORIA, D. C. The solubility of wheat gluten in various aqueous solutions. **Proceedings of the Iowa Academy of Science**, v. 72, p. 1-4, 1964.
- BATISTA, K. A.; PRUDENCIO, S. H.; FERNANDES, K. F. Changes in the Functional Properties and Antinutritional Factors of Extruded Hard-to-Cook Common Beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 286 – 290, 2010.
- BENJARANO-LUJÁN, D. L.; NETTO, F. M. Effect of alternative processes on the yield and physicochemical characterization of protein concentrates from *Amaranthus cruentus*. **Food Science and Technology**, v. 43, n. 5, p. 736-743, 2010.
- BEVERIDGE, T.; TOMA, S. J.; NAKAI, S. Determination of SH- and –SS groups in some food protein using Ellman’s reagent. **Journal of Food Science**, v. 39, n. 1, p. 49-51, 1974.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BURGESS, L. D.; STANLEY, D. W. A. A possible mechanism for thermal texturization of soybean protein. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 9, p. 228 – 231, 1976.

CANELLA, M. Whipping properties of sunflower proteins dispersions. **LWT – Food Science and Technology**, v. 11, n. 5, p. 259 – 263, 1978.

CARBONARO, M.; MASELLI, P.; NUCARA, A. Relação entre digestibilidade e estrutura secundária de proteínas de leguminosas cruas e tratadas termicamente: Um estudo espectroscópico de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). **Aminoácidos**, v. 43, p. 911-921, 2012.

CHAIDEZ-LAGUNA, L. D.; TORRES-CHAVEZ, P.; RAMÍREZ-WONG, B.; MARQUEZ-RÍOS, E.; ISLAS-RUBIO, A. R.; CARVAJAL-MILLAN, E. Corn proteins solubility changes during extrusion and traditional nixtamalization for tortilla processing: A study using size exclusion chromatography. **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 351–357, 2016.  
characteristics of textured wheat protein. **Food Chemistry**, v. 239, p. 579–587, 2018.

CHEN, F. L.; WEI, Y. M.; ZHANG, B. Chemical cross-linking and molecular aggregation of soybean protein during extrusion cooking at low and high moisture content. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 957 – 962, 2011.

CHEN, Y.; LIANG, Y.; JIA, F.; CHEN, D.; ZHANG, X.; WANG, Q.; WANG, J. Effect of extrusion temperature on the protein aggregation of wheat gluten with the addition of peanut oil during extrusion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1377 – 1386, 2021.

CUETO, M.; FARRONI, A.; RODRIGUEZ, S. D.; SCHOENLECHNER, R.; SCHLEINING, G.; BUERA, M. D. P. Assessing changes in enriched maize flour formulations after extrusion by means of FTIR, XRD, and Chemometric analysis. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, p. 1586-1595, 2018.

DA COSTA, P. F. P.; FERRAZ, M. B. M.; ROS-POLSKI, V.; QUAST, E.; COLLARES QUEIROZ, F. P.; STEEL, C. J. Functional extruded snacks with lycopene and soy protein. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 143-151, 2010.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas. 2010. *In*: Fennema, O. R.; Damodaran, S.; Parkin, K. L. Química de Alimentos de Fennema, 4º ed. Editora Artmed. 2010.

DENG, L.; WANG, Z.; YANG, S.; SONG, J.; QUE, F.; ZHANG, H.; FENG, F. Improvement of functional properties of wheat gluten using acid protease from *Aspergillus usamii*. **PLoS One**, v. 11, n. 7, e0160101. 2016.

DONADEL, M. E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de concentrado proteico de feijão envelhecido. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, 1999.

DOU, W.; ZHANG, X.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y.; JIANG, L.; SUI, X. High moisture extrusion cooking on soy proteins: importance influence of gums on promoting the fiber formation. **Food Research International**, v. 156, 111189, 2022.

FEDERICI, E.; JONES, O. G.; SELLING, G. W.; TAGLIASCO, M.; CAMPANELLA, O. H. Effect of zein extrusion and starch type on the rheological behavior of gluten-free dough. **Journal of Cereal Science**, v. 91, 102866, 2020.

FERNANDES, A. F.; MADEIRA, R. A. V.; CARVALHO, C. W. P.; PEREIRA, J. Physical and sensory characteristics of pellets elaborated with different levels of corn grits and whey protein concentrate. **Ciência e Agrotecnologica**, v. 40, n. 2, p. 235 – 243, 2016.

FLAMBEAU, M.; REDL, A.; RESPONDEK, F. Proteins from wheat: sustainable production and new developments in nutrition-based and functional applications. **Sustainable Protein Sources**, p. 67 – 78, 2017.

FLORES, I.; CABRA, V.; QUIRASCO, M. C.; FARRES, A.; GALVEZ, A. Emulsifying properties of chemically deamidated corn (*Zea mays*) gluten meal. **Food Science and Technology International**, v. 16, n. 3, p. 241 – 250, 2010.

GIANNENAS, I.; BONOS, E.; ANESTIS, V.; FILIOUSSIS, G.; PAPANASTASIOU, D. K.; BARTZANAS, T.; PAPAIOANNOU, N.; TZORA, A.; SKOUFOS, I. Effects of protease addition and replacement of soybean meal by corn gluten meal on the growth of broilers and on the environmental performances of a broiler production system in Greece. **PloS One**, v. 12, n. 1, e0169511, 2017.

GIOIA, D. L.; CUQ, B.; GUILBERT, S. Thermal properties of corn gluten meal and its proteic componentes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 24, n. 4, p. 341 – 350, 1999.

GRANATO, D.; CALADO, V. M. de. A.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137-149, 2014.

GULATI, P.; BRAHMA, S.; ROSE, D. J. Chapter 13 – Impacts of extrusion processing on nutritional components in cereals and legumes: carbohydrates, proteins, lipids, vitamins, and minerals. **Extrusion Cooking (Second Edition)**, p. 415 – 443, 2020.

HAYTHORNTHWAITE, A. Extrusion: as a toll for improved nutritional vallue of feeds. **Reading: Creative Press**, 1986.

HERRERO, A. M.; CAMBERO, M. I.; ORDÓÑEZ, J. A.; DE LA HOZ, L.; CARMONA, P. Estudo por espectroscopia Raman do efeito estrutural da transglutaminase microbiana em sistemas cárneos e sua relação com características de textura. **Food Chemistry**, v. 109, p. 25-32, 2008.

HUNTERLAB. Hunter L, a, b color scale. Hunter Associates Laboratory, Inc., Virginia, USA. **Applications Note**, v. 8, n. 9, 2008.

JIANG, L.; LIU, Y.; LI, L.; QI, B.; JU, M.; XU, Y.; SUI, X. Conjugados covalentes de antocianinas para proteína de soja: revelando suas características de estrutura e destino da digestão gastrointestinal in vitro. **Food Research International**, v. 120, p. 603-609, 2019.

KASAAI, M. R. Review – Zein and zein-based nano-materials for food and nutrition applications: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, p. 184 – 197, 2018.

LAMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 - 685, 1970.

LI, T.; GUO, X.; ZHU, K.; ZHOU, H. Effects of alkali on protein polymerization and textural characteristics of textured wheat protein. **Food Chemistry**, v. 239, p. 579-587, 2018.

LIU, Y.; WANG, D.; WANG, J.; YANG, Y.; ZHANG, L.; LI, J.; WANG, S. Functional properties and structural characteristics of phosphorylated pea protein isolate. **International Journal of Food Science + Technology**, v. 55, n. 5, p. 2002-2010, 2020.

LOY, D. D.; LUNDY, E. L. Chapter 23 – Nutritional properties and feeding value of corn and its coproducts. **Corn – Chemistry and Technology**, n. 3, p. 633- 659, 2019.

MA, W.; QI, B.; SAMI, R.; JIANG, L.; LI, Y.; WANG, H. Conformational and functional properties of soybean proteins produced by extrusion-hydrolysis approach. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2018, e9182508, 2018.

MCGUIRE, R. G. Reporting of Objective Color Measurements. **HortScience**, v. 27, n. 12, p. 1254- 1255, 1992.

MONTOYA-RODRÍGUEZ, A.; OSUNA-GALLARDO, E.I.; CABRERA-CHÁVEZ, F.; MILÁN-CARRILLO, J.; REYES-MORENO, C.; MILÁN-NORIS, E.M.; CUEVAS-RODRÍGUEZ, E.O.; MORA-ROCHÍN, S. Evaluation of the in vitro and in vivo antihypertensive effect and antioxidant activity of blue corn hydrolysates derived from wet-milling. **Biotechnia**, v. 22, p. 155–162, 2020.

MOSIBO, O. K.; FERRENTINO, G.; ALAM, M. R.; MOROZOVA, K.; SCAMPICCHIO, M. Extrusion cooking of protein-based products: potentials and challenges. **Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 9, p. 2526-2547, 2020.

MOZAFARPOUR, R.; KOOCHEKI, A.; MILANI, E.; VARIDI, M. Extruded soy protein as a novel emulsifier: Structure, interfacial activity and emulsifying property. **Food Hydrocolloids**, v. 93, p. 361–73, 2019.

MURATE, E. H.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de concentrado protéico extrusado de sementes de girassol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 2, 1999.

NEUMANN, P. E.; JASBERG, B. K.; WALL, J. S. Uniquely textured products obtained by coextrusion of corn gluten meal and soy flour. **Cereal Chemistry**, v. 61, n. 5, p. 439 – 445, 1984.

ORTIZ-MARTINEZ, M.; MEJIA, E. G. de.; GARCÍA-LARA, S.; AGUILAR, O.; LOPEZ-CASTILHO, L. M.; OTERO-PAPPATHEODOROU, J. T. Antiproliferative effect of peptide fractions isolated from a quality protein maize, a white hybrid maize, and their derived peptides on hepatocarcinoma human HepG2 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 36–48, 2017.

OSEN, R.; TOELSTEDDE, S.; EISNER, P.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U. Effect of high moisture extrusion cooking on protein-protein interactions of pea (*Pisum sativum* L.) protein isolates. **International Journal of Food Science + Technology**, v. 50, n. 6, p. 1390-1396, 2015.

OZTURK, O. K.; MERT, B. Characterization and evaluation of emulsifying properties of high pressure microfluidized and pH shifted corn gluten meal. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 52, p. 179-188, 2019.

PETERSON, G. L. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**, v. 100, p. 201-220, 1979.

PIETSCH, V. L.; EMIN, M. A.; SCHUCHMANN, H. P. Process conditions influencing heat gluten polymerization during high moisture extrusion of meat analog products. **Journal of Food Engineering**, v. 198, p. 28–35, 2017.

PRUDENCIO-FERREIRA, S. H.; ARÊAS, J. A. G. Protein-protein interactions in the extrusion of soya at various temperatures and moisture contents. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 2, p. 378 – 381, 1993.

SANTOS, F. A. Glúten de milho na alimentação de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, n. 3, p. 79-100, 2004.

SCHMID, E.; FARAHAKEY, A.; ADHIKARI, B.; TORLEY, P. J. High moisture extrusion cooking of meat analogs: a review of mechanisms of protein texturization. **Comprehensive Review**, p. 1 – 37, 2022.

SEIBEL, N. F.; BELÉIA, A. D. P. Características químicas e funcionalidade tecnológica de ingredientes de soja [*Glycine Max* (L.) Merrill]: carboidratos e proteínas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 113 – 122, 2009.

SELLING, G. W. The effect of extrusion processing on zein. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 12, p. 2241-2249, 2010.

SHEVKANI, K.; KAUR, A.; KUMAR, S.; SINGH, N. Cowpea protein isolates: functional properties and applications in gluten-free rice muffins. **LWT – Food science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 927 – 933, 2015.

SINGH, U.; KAUR, D.; MISHRA, V.; KRISHANIA, M. Combinatorial approach to prepare antioxidative protein hydrolysate from corn gluten meal with dairy whey: preparation, kinetics, nutritional study and cost analysis. **LWT – Food Science and Technology**, v. 153, 112437, 2022.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (Data Analysis Software System), Version 7.0. 2011.

TANG, C.-H.; MA, C.-Y. Heat-induced modifications in the functional and structural properties of vicilin-rich protein isolate from kidney (*Phaseolus vulgaris*, L.) bean. **Food Chemistry**, v. 115, p. 859–866, 2009.

TAYLOR, E. G.; LEMENAGER, R. P.; STEWART, K. R. Using corn gluten feed in postpartum diets of young beef cows to optimize reproductive performance. **Translational animal Science**, v.1, n. 3, p. 296 – 303, 2017.

UAN-ON, T.; BAIBANG, C.; SHUWISITKUL, D. Extraction and characterization of zein protein from corn for controlled drug release. **Current Applied Science and Technology**, v. 18, n. 3, p. 167 – 178, 2018.

WANG, H.; VAN DEN BERG, F. W. J.; ZHANG, W.; CZAJA, T. P.; ZHANG, L.; JESPERSEBM B. M.; LAMETSCH, R. Differences in physicochemical properties of high-moisture extrudates prepared from soy and pea protein isolates. **Food Hydrocolloids**, v. 128, 107540, 2022.

WANG, K; LI, C.; WANG, B.; YANG, W.; LUO, S.; ZHAO, Y.; JIANG, S.; MU, D.; ZHENG, Z. Formation of macromolecules in wheat gluten/starch mixtures during twin-screw extrusion: effect of different additives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 15, p. 5131–5138, 2017.

WANG, N.; DAI, J.; MIAO, D.; LI, C.; YANG, X.; SHU, Q.; ZHANG, Y.; DAI, Y.; HOU, H.; XU, S. Influence of enzymatic modification on the basis of improved extrusion cooking technology (IECT) on the structure and properties of corn starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, 127274, 2023.

YOSHIDA, B. Y.; DA SILVA, P. R. C.; PRUDENCIO, S. H. Soybean residue (okara) modified by extrusion with different moisture contents: Physical, chemical, and techno-functional properties. **Food Science and Technology International**. 2022.

YU, L.; RAMASWAMY, H. S.; BOYE, J. Protein rich extruded products prepared from soy protein isolate-corn flour blends. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 279 – 289, 2013.

ZHANG, B.; KANG, X.; CHENG, Y.; CUI, B.; EL-ATY, A. M. A. Impact of high moisture contents on the structure and functional properties of pea protein isolate during extrusion. **Food Hydrocolloids**, v. 127, 107508, 2022.

ZHANG, R.; MA, S.; LI, L.; ZHANG, M.; TIAN, S.; WANG, D.; LIU, K.; LIU, H.; ZHU, W.; WANG, X. Comprehensive utilization of corn starch processing by-products: a review. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 4, p. 89 – 107, 2021.

ZHANG, Y.; HE, Z.; XU, M.; ZHANG, X.; CAO, S.; HU, Y.; LUAN, G. Physicochemical properties and protein structure of extruded corn gluten meal: implication of temperature. **Food Chemistry**, v. 399, 133985, 2023.

ZHENG, H.; YAN, G.; LEE, Y.; ALCARAZ, C.; MARQUEZ, S.; MEJIA, E. G. de. Effect of the extrusion process on allergen reduction and the texture change of soybean protein isolate-corn and soybean flour-corn mixture. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 64, 102421, 2020.

ZHENG, X.; LI, L.; LIU, X.; WANG, X.; LIN, J.; LI, D. Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 4, p. 763 – 770, 2006.

ZHUANG, H.; TANG, N.; DONG, S.; SUN, B.; LIU, J. Optimization of antioxidant peptide preparation from corn gluten meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 13, p. 3264 – 3270, 2013.

### 5. 3 Artigo Científico 3

#### **Propriedades biológicas de farelo de glúten de milho extrusado após digestão gastrointestinal simulada**

##### **Resumo**

O objetivo do estudo foi extrusar o farelo de glúten de milho para aumentar o rendimento da digestão gastrointestinal simulada, a partir da otimização dos parâmetros umidade da amostra, temperatura e velocidade de rotação do parafuso do extrusor. As propriedades biológicas do glúten de milho extrusado na condição otimizada também foram avaliadas. Empregou-se um extrusor de parafuso único e um planejamento fatorial completo, com dois pontos centrais e variação da umidade de amostra (20 – 40%), temperatura (120 – 160°C) e velocidade do parafuso (33 – 117 rpm). A condição de extrusão otimizada foi 40% de umidade, 140°C e 54 rpm. As amostras de farelo de glúten de milho controle (não extrusado e não digerido), farelo de glúten de milho não extrusado-digerido, farelo de glúten de milho extrusado otimizado e farelo de glúten de milho extrusado otimizado-digerido foram comparados em relação a atividade biológica. O farelo de glúten de milho extrusado otimizado-digerido apresentou maiores teor de nitrogênio, grau de hidrólise, digestibilidade e potencial de ação biológica (atividade antioxidante/ABTS, capacidade redutora e atividade de inibição de ECA) em relação as demais amostras.

**Palavras-chave:** antioxidante, digestibilidade, eletroforese de proteína, inibição de ECA, hidrólise enzimática.

## **1. INTRODUÇÃO**

Conforme a CONAB (2023), estima-se que o Brasil produzirá 38 milhões toneladas de milho na safra 2023/2024. O milho é a principal fonte de amido industrial e é utilizado como matéria-prima na produção de diversos produtos alimentícios, como fubá, farinha de milho, flocos de milho, canjica e polenta (REVILLA et al., 2021). O processamento industrial do milho é realizado por via seca ou úmida. O processamento úmido pode ser usado para produzir amido, xarope de milho, glicose, dextrina e farelo de glúten de milho (GM) (RIBEIRO et al., 2019). O farelo de glúten de milho (GM) é o resíduo desidratado, com alto teor de proteína (cerca de 68%),

resultante da separação do amido. As principais proteínas do GM são as zeínas (~68%) e glutelinas (~22%) (ORTIZ-MARTINEZ et al., 2017).

As proteínas vegetais apresentam menor biodisponibilidade de aminoácidos em relação às proteínas animais, por isso a capacidade do organismo humano para digeri-las é menor (ZHENG et al., 2006). Uma forma de melhorar a digestão das proteínas vegetais é alterar a sua conformação molecular através de extrusão (BRENNAN et al., 2013). A extrusão é um processo físico que modifica as proteínas, sendo os parâmetros umidade do material, temperatura e velocidade do parafuso do extrusor os mais importantes (ZHANG et al. 2022). As mudanças estruturais nas proteínas provocadas pela extrusão ocorrem em duas etapas sucessivas, primeiro a desnaturação e, o posterior alinhamento das moléculas desnaturadas na forma de fibras mantidas por novas interações cruzadas não covalentes (interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio) e covalentes (ligações dissulfeto) (CHEN et al., 2021; MOSIBO et al., 2020; SCHMID et al., 2022; WANG et al., 2022; LI et al., 2018; PIETSCH; EMIN; SCHUCHMANN, 2017; PRUDÊNCIO-FERREIRA; ARÊAS, 1993). Essas alterações moleculares nas proteínas envolvem a exposição de ligações peptídicas entre aminoácidos específicos para os sítios ativos das enzimas proteolíticas digestivas e assim contribuem para hidrólise, melhora da digestibilidade e liberação de peptídeos ativos (FISCHER et al. 2004).

Os peptídeos ativos têm recebido atenção científica nos últimos anos devido às suas propriedades medicinais, cosméticas e nutricionais (AKBARIAN et al., 2022). Os peptídeos ativos são obtidos, principalmente, de proteínas alimentares por hidrólise enzimática, possuem entre 2 e 20 aminoácidos e massa molecular inferior a 6 kDa (ZAKY et al., 2021). Os peptídeos provenientes da hidrólise enzimática do GM também apresentam massa molecular <6 kDa e podem ser facilmente absorvidos, além de serem seguros para consumo (TRINIDAD-CALDERÓN et al., 2021). Muitos estudos evidenciaram que os peptídeos liberados a partir da hidrólise enzimática do GM possuem propriedades ativas, que incluem as ações antioxidante (HU et al., 2022), anti-inflamatória (MOCHIZUKI; SHIGEMURA; HASEGAWA, 2010), inibição de agentes relacionados à distúrbio neurocognitivo (prolil oligopeptidase) (CHANAJON et al., 2023) e anti-hipertensiva (WONGNGAM et al., 2023).

Considerando que durante o processo de extrusão ocorrem alterações na conformação molecular das proteínas que podem facilitar a ação hidrolítica de enzimas e alterar características

biológicas dos peptídeos gerados, este estudo teve como objetivo empregar a extrusão como um processamento visando o aumento do rendimento da hidrólise enzimática sequencial com pepsina e pancreatina (simulação da digestão gastrointestinal) do GM a partir da otimização dos parâmetros de extrusão (umidade da amostra, temperatura e velocidade de rotação do parafuso). As propriedades bioativas do GM extrusado na condição otimizada também foram avaliadas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

O GM, marca Protenose BB1100, lote 0001618698, com 62% de proteínas (base seca, b.s.) e 9% de umidade, foi adquirido da Cooperativa COMIGO (Rio Verde – GO – Brasil) e permaneceu em câmara fria (4 °C) até a extrusão e execução das análises. Pepsina suína (EC 3.4.23.1), pancreatina (EC 232-468-9), enzima conversora de angiotensina I de pulmão de coelho (EC 3.4.15.1, 0,25 U, Sigma A-6778) e albumina de soro bovino (BSA > 98% puro) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os reagentes e soluções utilizados apresentavam grau analítico.

### 2.2 Efeito e otimização da extrusão sobre o rendimento de amostra digerida de GM

#### 2.2.1 Extrusão

Um extrusor de parafuso único (AX Plásticos, modelo LAB-16/40, São Paulo, Brasil), com diâmetro (D) = 16 mm, comprimento (L) = 40D, foi utilizado para a extrusão do GM. As temperaturas na primeira e segunda zona de aquecimento foram 90 °C e 135 °C, respectivamente, e 145 °C na zona de saída. Foi empregado um planejamento experimental com variação da umidade da amostra, temperatura de aquecimento da terceira zona do extrusor e velocidade de rotação do parafuso (Tabela 1). As amostras preparadas nas umidades requeridas para extrusão (Tabela 1) foram acondicionadas em sacos de polietileno e mantidas em câmara fria (4 °C) por 24 horas. Após, foram deixadas em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C) por, aproximadamente, duas horas e, então extrusadas. Posteriormente foram secas em estufa (Marconi, modelo MA035/5, Brasil) a 70 °C durante 2 horas, moídas em moinho de faca (Tecnal, modelo R-TE-650/1, Brasil), classificadas em malha fina (0,15 mm) (MURATE; PRUDÊNCIO-FERREIRA, 1999; DA COSTA et al., 2010) e mantidas em câmara fria (4°C) até as análises.

### 2. 2. 2 Planejamento experimental para otimização da extrusão do GM

Para investigar o efeito da extrusão sobre o rendimento de amostra digerida (RAD, %) de GM foi empregado um delineamento experimental fatorial completo, com dois pontos centrais (CCD) 2<sup>3</sup>. As três variáveis independentes (umidade da amostra, temperatura da terceira zona de aquecimento do extrusor e a velocidade de rotação do parafuso), em dois níveis extremos, selecionados a partir de testes preliminares e dados da literatura (DA COSTA et al., 2010), resultaram em 16 ensaios (Tabela 1). Os ensaios foram realizados em ordem aleatorizada.

### 2. 2. 3 Digestão gastrointestinal simulada e rendimento de amostra digerida (RAD)

Amostras de GM controle e extrusados foram suspensos em água ultrapura (1:20 m/v) e submetidos à hidrólise enzimática sequencial com pepsina suína (enzima:substrato 1:20, m/m) a 37°C por 2 h e posteriormente com pancreatina suína (1:20, m/m) a 37°C por 2 h, conforme Rocha et al. (2014). Após a hidrólise, as enzimas foram inativadas a 75°C por 20 min, e as amostras centrifugadas a 14.000 g e 4°C por 15 min (Centrífuga refrigerada 5804 R Eppendorf, Alemanha). Os sobrenadantes foram liofilizados (Liofilizador Alpha 1-2 LSCbasic, Brasil) e congelados a -20°C. O RAD foi calculado conforme a eq. 1.

$$RAD (\%) = \frac{\text{massa da amostra digerida (g)}}{\text{massa da amostra inicial (g)}} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

### 2. 2. 4 Análise estatística dos dados

Os dados experimentais foram submetidos à análise de regressão e de variância (ANOVA). Os termos lineares e quadráticos das variáveis independentes e suas interações foram avaliados. Os modelos de resposta foram expressos conforme a eq. 2. Curvas de contorno foram geradas para os modelos ajustados. Empregou-se o programa Statistica 7.0 (STATSOFT, Inc., 2011) e  $p < 0,05$ .

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_2x_2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_3x_3 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: Y = variável de resposta e  $\beta$  = coeficiente de variação estimado para cada termo.

A extrusão foi otimizada a partir da maior RAD e pela função de desejabilidade geral do software Statistica 7.0 (STATSOFT, Inc., 2011) obtendo-se o GME0 (GM extrusado-otimizado).

Os experimentos foram realizados em três réplicas e os modelos validados por comparação entre os valores previstos e os resultados experimentais (teste t de Student,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 1** – Planejamento fatorial completo com dois pontos centrais ( $2^3$ ), três variáveis independentes e dois níveis para extrusão do farelo de glúten de milho.

Ensaio	U	T	VP	Variável resposta
	(X <sub>1</sub> )	(X <sub>2</sub> )	(X <sub>3</sub> )	RAD <sup>a</sup>
1	-1 (24)	-1 (127)	-1 (50)	13,86
2	-1 (24)	-1 (127)	+1 (100)	27,22
3	-1 (24)	+1 (153)	-1 (50)	12,35
4	-1 (24)	+1 (153)	+1 (100)	26,70
5	+1 (36)	-1 (127)	-1 (50)	29,54
6	+1 (36)	-1 (127)	+1 (100)	28,90
7	+1 (36)	+1 (153)	-1 (50)	28,20
8	+1 (36)	+1 (153)	+1 (100)	26,13
9	-1,68 (20)	0 (140)	0 (75)	20,94
10	+1,68 (40)	0 (140)	0 (75)	30,93
11	0 (30)	-1,68 (120)	0 (75)	29,07
12	0 (30)	+1,68 (160)	0 (75)	12,77
13	0 (30)	0 (140)	-1,68 (33)	16,13
14	0 (30)	0 (140)	+1,68 (117)	32,27
15 (C)	0 (30)	0 (140)	0 (75)	30,14
16 (C)	0 (30)	0 (140)	0 (75)	34,27
<b>Controle</b>	-	-	-	23,79

<sup>a</sup> Média de três repetições.

U = umidade da amostra (%), T = temperatura da terceira zona de extrusão (°C), VP = velocidade de rotação do parafuso (rpm), RAD = rendimento de amostra digerida (%). (C) = ponto central. Controle = não extrusado.

### 2.3 Caracterização química e biológica do GM e GMEO antes e após a digestão gastrointestinal simulada

O GM e o GMEO foram submetidos à digestão gastrointestinal simulada, conforme descrito no item 2.2.3 e as características químicas e a atividade biológica das amostras foram analisadas.

#### 2.3.1 Teor de nitrogênio

O teor de nitrogênio das amostras [GM, GMEO, GMD (GM digerido) e GMEOD (GMEO digerido)] foi quantificado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995). Os resultados foram expressos em g de nitrogênio por 100 g de amostra de cada amostra. Para as amostras digeridas também foram apresentadas a relação (em %) entre a massa de nitrogênio na amostra digerida e na respectiva amostra antes da digestão para indicar a proporção de nitrogênio recuperada após a digestão.

Para medida de alguns parâmetros químicos e biológicos o teor de Nitrogênio nas amostras foi convertido para proteínas ( $N \times 6,25$ ) (AOAC, 1995).

#### 2.3.2 Grau de hidrólise (GH) das proteínas

Para medir o GH das proteínas após a digestão das amostras, procedeu-se a reação do reagente o-ftaldialdeído (OPA) com os terminais  $-NH_2$  livres do aminoácido serina dos peptídeos gerados após a hidrólise das ligações peptídicas das proteínas (NIELSEN; PETERSEN; DAMBMANN, 2001; BOUGATEF et al., 2009). Foram adicionados 400  $\mu$ L de amostra diluída em água (1,2 mg/mL) à 3 mL da solução de OPA e a mistura foi armazenada em temperatura ambiente por 2 min. A absorbância foi lida a 340 nm (espectrofotômetro Libra S22, Biochrom, Inglaterra). Uma solução aquosa de serina (0,9515 mM) foi utilizada como padrão.

O GH foi calculado pela eq. 3. (Adler-Nissen, 1986).

$$GH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} * 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde  $h$  = número de ligações peptídicas hidrolisadas e  $h_{tot}$  = número total de ligações peptídicas no substrato proteico, neste estudo  $h_{tot} = 7,75$  meq/g. O valor de  $h$  foi calculado pelas eq. 4 e 5.

$$h = \frac{\text{Serina-NH}_2 - 0,342}{0,970} \quad \text{Equação 4}$$

$$Serina - NH_2 = \frac{A_{amostra} - A_{branco}}{A_{padrão} - A_{branco}} * \frac{0,9516}{massa_{amostra}(g) * proteina_{amostra}(\%)} \quad \text{Equação 5}$$

Onde A = absorvância

### 2.3.3 Digestibilidade proteica

As proteínas das amostras foram quantificadas pelo método de Kjeldahl (N x 6,25) (AOAC, 1995). A proporção de proteína digerida ou a digestibilidade da proteína (%) de GMD e GMEOD foi calculada pela eq. 6, conforme Tran et al (2021).

$$Digestibilidade (\%) = \frac{massa \ de \ proteina \ na \ amostra \ digerida}{massa \ de \ proteina \ na \ amostra \ não \ digerida} * 100 \quad \text{Equação 6}$$

### 2.3.4 Perfil eletroforético das proteínas

Em soluções aquosas de GM, GMD e GMEOD (1,5 m/v) e GMEO (3,0 m/v) foram adicionados o tampão redutor (Tris-HCl 62,5 mmol L<sup>-1</sup>, 20% de glicerol P.A., 2% solução de SDS 10%, 5% β-mercaptoetanol P.A., pH 6,8) em volume suficiente para resultar em 0,4% de proteínas e as misturas aquecidas a 95 °C por 4 minutos (LAMMLI, 1970). O perfil eletroforético das proteínas foi determinado em dois géis de poliacrilamida (de separação a 20% e de empacotamento a 4%) contendo SDS (SDS-PAGE). A esses géis foram aplicadas alíquotas de 10 µL das soluções de amostras e de padrões de massa molecular entre 10 e 250 kDa (Precision Plus Protein, código 161-0374, Bio-Rad) e o sistema foi conectado a corrente elétrica a 90 V e 30 mA por 5 horas para separação das proteínas. O tampão de corrida utilizado para a separação foi Tris-HCl 0,52 mol L<sup>-1</sup>, glicina 0,53 mol L<sup>-1</sup> e SDS 1% (pH 8,9). As bandas das proteínas separadas foram coradas com solução de Coomassie Blue G-250 0,1% e descoradas em solução de ácido acético/metanol/água (1:4:5) (LAMMLI, 1970).

### 2.3.5 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante das amostras foi determinada por diferentes métodos.

#### 2.3.5.1 Método de Folin-Ciocalteu

A capacidade redutora foi avaliada pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Adicionaram-se 1,25 mL de carbonato de sódio 7,5% e 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (0,9 mol L<sup>-1</sup>) a 250 µL de extratos etanólico das

amostras (0,8 mg/mL). A mistura foi agitada brevemente e mantida à temperatura ambiente ao abrigo de luz por 2 h, e a absorbância lida a 749 nm (espectrofotômetro Libra S22, Biochrom, Inglaterra). Para o controle, amostra foi substituída por etanol. A curva analítica foi preparada com ácido gálico (0,04 a 0,20 mg/mL) ( $y = 4,195x - 0,0177$ ;  $R^2 = 0,99$ ) e os resultados expressos em  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de amostra.

#### 2.3.5.2 Método FRAP

Para medir poder de redução férrico (FRAP), o reagente FRAP foi preparado com 2,5 mL de solução de TPTZ  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  (diluída em HCl  $40 \text{ mmol L}^{-1}$ ), adicionado de 2,5 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 25 mL de tampão acetato  $300 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 3,6 em erlenmeyer de 100 mL. Uma alíquota (30  $\mu\text{L}$ ) das amostras diluídas em etanol (1,0 mg/mL) foram adicionadas a 900  $\mu\text{L}$  de reagente FRAP e 90  $\mu\text{L}$  de etanol e posterior incubação a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min. A absorbância (espectrofotômetro Libra S22, Biochrom, Inglaterra) foi lida a 595 nm (BENZIE; STRAIN, 1996). Para o controle, amostra foi substituída por etanol. A curva analítica de Trolox ( $10$  a  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi preparada ( $y = 0,0034x + 0,1011$ ;  $R^2 = 0,99$ ) e os resultados expressos em equivalentes  $\mu\text{mol}$  de Trolox (TE) por mg de amostra.

#### 2.3.5.3 Método ABTS

A atividade antioxidante utilizando o radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfonato) (ABTS) foi avaliada conforme Ngoh e Gan (2016). O radical ABTS 7mM foi preparado em persulfato de potássio  $140 \text{ mmol L}^{-1}$  e armazenado em frasco escuro à temperatura ambiente por 12 h. O radical ABTS foi diluído em etanol (1:100 v/v). As amostras foram suspensas em água destilada (4,8 mg/mL) e diluídas em etanol (2,4 mg/mL). Para reação, 30  $\mu\text{L}$  de amostra foram misturados a 3,0 mL de solução de ABTS, aguardado dez minutos em temperatura ambiente e ausência de luz, e a absorbância lida a 734 nm (espectrofotômetro Libra S22, Biochrom, Inglaterra). Para o controle, amostra foi substituída por etanol. A curva analítica de Trolox descrita para FRAP foi utilizada. O resultado foi expresso em TE por mg de amostra.

#### 2.3.5.4 Método DPPH

Para determinar a atividade sequestradora de radicais livres (método DPPH) (ZHENG et al., 2015), as amostras foram diluídas em etanol P.A (1:5 m/v) e 200 µL destas foram adicionadas a 1,8 mL de solução etanólica de DPPH (74 µmol L<sup>-1</sup>), agitadas vagarosamente e deixadas reagir por 40 min em temperatura ambiente ao abrigo de luz. A absorbância foi lida a 515 nm (espectrofotômetro Libra S22, Biochrom, Inglaterra) Para o controle, amostra foi substituída por etanol. A curva analítica de Trolox descrita para FRAP foi utilizada. O resultado foi expresso em TE por mg de amostra.

### 2.3.6 Inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA)

A medida da inibição de ECA foi determinada conforme Cruz (2014) e Lahogue et al. (2010), com adaptações. Empregou-se método espectrofotométrico (espectrofotômetro Libra S22, Biochrom, Inglaterra) baseado na hidrólise do substrato N-hippuril-L-histidil-L-leucina (HHL) pela enzima ECA e formação do ácido hipúrico. Uma solução de HHL 5 mmol L<sup>-1</sup> foi preparada em tampão (pH 8,3) de fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> e NaCl 0,3 mol L<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 250 µL da solução de HHL foi adicionada a amostra diluída em água destilada (2,50 mg/mL) e acrescentaram-se 40 µL de ECA (dissolvida em 1,0 mL de água destilada) e incubada a 37°C por 30 min para ocorrer a reação.

A reação foi interrompida pela adição de 70 µL de HCl 1 mol L<sup>-1</sup> e o ácido hipúrico formado foi extraído em 1,5 mL de acetato de etila P.A. e evaporado a 120°C com posterior adição de 1,0 mL de água destilada. A absorbância da amostra foi lida a 228 nm (espectrofotômetro Libra S22, Biochrom, Inglaterra). O controle foi preparado com todos os reagentes e substituindo-se a amostra por tampão e um branco contendo apenas tampão e substrato. A inibição de ECA (%) foi calculada conforme a eq. 7.

$$\text{Inibição de ECA (\%)} = \frac{C-(A-B)}{C-B} * 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde: A = absorbância da amostra; B = absorbância do branco; e C = absorbância do controle.

### 2.3.7 Inibição de alfa-amilase

A inibição de alfa-amilase foi determinada conforme Alu'datt et al. (2012) e Karimi, Azizi e Gavlighi (2020), com algumas modificações. Foram incubadas, a 37°C por 5 min, 100 µL de

amostra diluída em tampão fosfato pH 6,0 (10 mg/mL) com 100 µL de alfa-amilase diluída no mesmo tampão (0,5 U/mL). Após, foram adicionados 100 µL de solução de amido em água destilada (0,5:100 m/v) e levado para incubação a 37°C por 20 min. A mistura foi aquecida a 100°C por 10 min, resfriada em temperatura ambiente e centrifugada (Centrífuga 5804 R Eppendorf, Alemanha) a 16000 g por 2 min. Para reação de cor, 20 µL do sobrenadante foram misturados com 1 mL de hidrazida 4-hidroxibenzoico (PAHBAH) e aquecidos a 70°C por 10 min. A solução foi resfriada em temperatura ambiente e a absorbância (espectrofotômetro Libra S22, Biochrom, Inglaterra) lida a 410 nm. O branco foi preparado com todos os reagentes, exceto o amido que foi substituído por tampão fosfato. Para o controle empregaram-se todos os reagentes e a amostra foi substituída por tampão fosfato. O IC<sub>50</sub> de acarbose foi utilizado como controle positivo e a inibição de alfa-amilase calculada pela eq. 8.

$$\text{Inibição de alfa – amilase (\%)} = \frac{1-(A_s-A_b)}{A_c} * 100 \quad \text{Equação 8}$$

Onde: A<sub>s</sub> = absorbância da amostra; A<sub>b</sub> = absorbância do branco; e A<sub>c</sub> = absorbância do controle.

### 2.3.8 Inibição de alfa-glucosidase

A inibição de alfa-glucosidade foi determinada conforme Connolly et al. (2014) e Karimi, Azizi e Gavlighi (2020), com algumas modificações. Amostras em diferentes diluições em tampão fosfato pH 6,0 (20 mg/mL; 40 mg/mL; 60 mg/mL) foram misturadas, na proporção de 1:2, a solução aquosa de alfa-glucosidase (90 mU/mL) e incubadas a 37°C por 30 min. Depois, foram adicionados 100 µL de solução de 4-nitrofenil β-D-glucopiranosido (PNPG) em tampão fosfato (5 mmol L<sup>-1</sup>) e incubou-se novamente a 37°C por 30 min e a absorbância foi lida a cada 2 min a 405 nm (espectrofotômetro Libra S22, Biochrom, Inglaterra). Para o controle, substituiu-se a amostra pelo tampão fosfato. As absorbâncias de cada amostra diluída ou controle foram utilizadas para determinar a inclinação das curvas analíticas. O IC<sub>50</sub> de acarbose foi utilizado como controle positivo, e a inibição de alfa-glucosidase foi calculada pela eq. 9.

$$\text{Inibição de alfa – glucosidase (\%)} = \frac{(A_c-A_s)}{A_c} * 100 \quad \text{Equação 9}$$

Onde: A<sub>s</sub> = inclinação da curva analítica da amostra; e A<sub>c</sub> = inclinação da curva analítica do controle.

### 2.3.9 Análise estatística dos dados

As determinações das características químicas e biológicas do GM, GMD, GMEO e GMEOD foram repetidas três vezes e os dados submetidos à ANOVA (one way) e ao teste de comparação de médias de Tukey, empregando-se o software Statistica 7.0 (STATSOFT, Inc., 2011). O nível de significância foi de 5%.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Efeito da extrusão do GM sobre o RAD

A extrusão influenciou o RAD do GM (ensaios 1 a 16, Tabela 1), cujos valores variaram de 12,35% (ensaio 3, menor umidade e velocidade do parafuso, e temperatura alta) a 34,27% (ensaio 16, condições intermediárias de umidade, temperatura e velocidade do parafuso).

É interessante notar que dependendo das condições, a extrusão resultou em aumento ou redução do RAD do GM. Os ensaios 1, 3, 9, 12 e 13 resultaram em redução do rendimento, enquanto os ensaios 2, 4 a 8, 10, 11, 14 a 16 favoreceram a digestão (Tabela 1) e atendem ao objetivo do estudo. Yanqing et al. (2022) demonstraram, assim como alguns ensaios desse estudo, que a extrusão (velocidade do parafuso de 130 rpm, umidade de 22% e temperatura de 150°C) de proteína de soja contribuiu para elevar o RAD. Estudos indicaram que a desestabilização das ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, ou expansão da estrutura proteica, e/ou redução da interação de fatores antinutricionais às proteínas durante a extrusão contribuíram para a exposição do sítio ativo das proteínas para enzimas utilizadas na digestão (YANQING et al., 2022; SÁ; MORENO; CARCIOFI, 2020).

### 3.2 Otimização da variável resposta (RAD) e validação experimental

A análise de regressão e ANOVA indicaram diferenças significativas para os efeitos lineares, quadráticos e suas interações ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). O modelo apresentou  $R^2 \geq 0,8$  e a falta de ajuste não foi significativa ( $p > 0,05$ ), o que confirma um ajuste desejável dos dados (GRANATO; CALADO; JARVIS, 2014).

O RAD foi influenciado positivamente pelo efeito linear da umidade ( $\beta_1$ ) e efeito linear da velocidade do parafuso ( $\beta_3$ ). Houve influência negativa do efeito quadrático da temperatura ( $\beta_{22}$ ) e da interação da umidade com a velocidade do parafuso ( $\beta_{13}$ ) (Tabela 2). As curvas de contorno

indicaram que a associação da temperatura com a umidade expressou valores próximos a 30% para o RAD se forem aplicadas temperaturas entre 120 e 150°C e umidades superiores a 28% (Figura 1A). A combinação da velocidade do parafuso com a umidade indicou que RAD superior a 30% é possível em velocidades acima de 100 rpm e umidade entre 20 e 40% (Figura 1B). Considerando a associação da temperatura e a velocidade do parafuso, RAD superior a 30% pode ser observada em temperaturas entre 125-155°C, associadas à alta velocidade do parafuso (80 - 110 rpm) (Figura 1C).

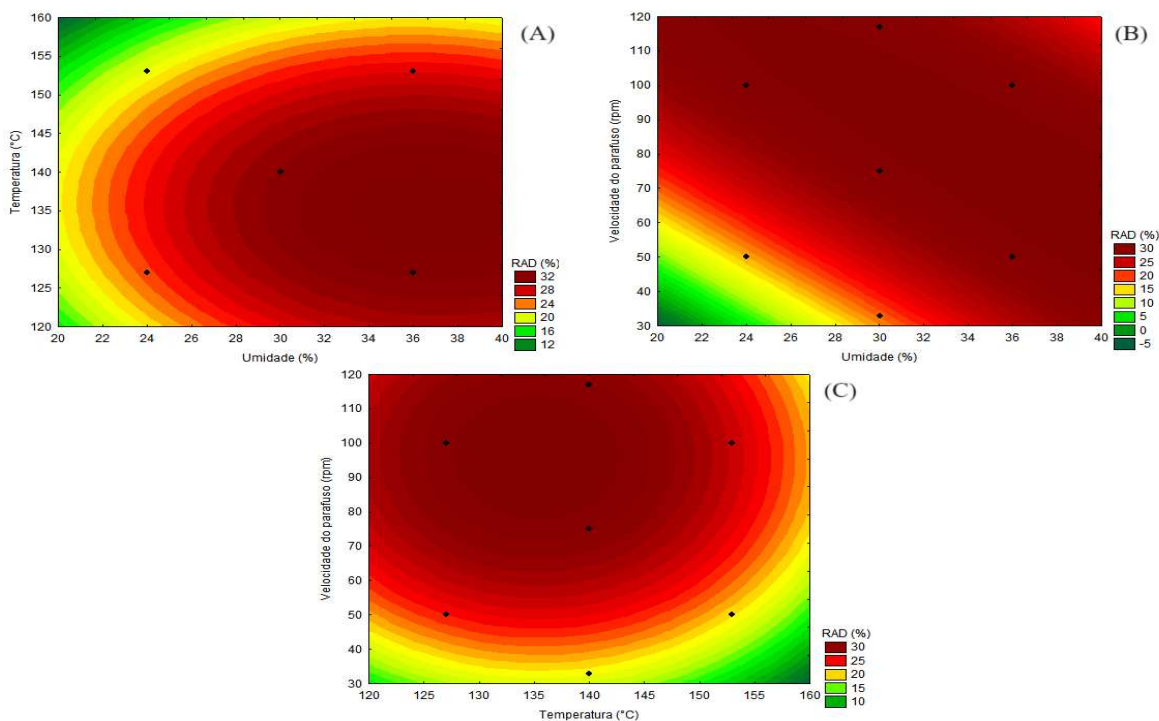
**Tabela 2** – Coeficientes de regressão e ANOVA do modelo matemático da função resposta.

Parâmetros	Coeficiente de regressão ( $\beta$ )
	RAD (%)
<b>Intercepto</b>	
$\beta_0$	31,121 <sup>a</sup>
<b>Linear</b>	
$\beta_1$	3,621 <sup>a</sup>
$\beta_2$	-2,456
$\beta_3$	3,818 <sup>a</sup>
<b>Quadrático</b>	
$\beta_{11}$	-1,657
$\beta_{22}$	-3,431 <sup>a</sup>
$\beta_{33}$	-2,273
<b>Interação</b>	
$\beta_{12}$	-0,258
$\beta_{13}$	-3,802 <sup>a</sup>
$\beta_{23}$	-0,054
<b>R<sup>2</sup></b>	0,884
<b>R<sup>2</sup><sub>ajustado</sub></b>	0,711
<b>Lack of fit (p-value)</b>	0,141

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação. <sup>a</sup>parâmetro significativo (p < 0,05). Números subscritos 1, 2 e 3 representam a umidade da amostra, temperatura e velocidade do parafuso na extrusão, respectivamente. RAD = rendimento de amostra digerida (%).

Os ensaios que resultaram na redução do RAD sugerem que a extrusão acarretou maior dobramento e agregação das proteínas, o que pode dificultar o acesso dos sítios ativos das enzimas proteolíticas às ligações peptídicas específicas das proteínas (ZHANG et al., 2022). Resultado semelhante foi relatado por Atukuri et al. (2019) para extrusão de farinha de lentilha, em que a menor velocidade do parafuso contribuiu menos para a desnaturação proteica e, conseqüentemente, menor desdobramento molecular dificultando a ação da enzima na hidrólise, além da menor umidade da amostra que diminuiu a expansão e flexibilidade das moléculas de proteínas decrescendo a taxa de hidrólise. Não há relatos na literatura relacionados à análise de RAD em extrusados de GM em diferentes condições de umidade da amostra, temperatura e velocidade do parafuso do extrusor.

**Figura 1** – Curvas de contorno do efeito da umidade da amostra (%), temperatura (°C) e velocidade do parafuso do extrusor (rpm) sobre o rendimento de amostra digerida (%) de farelo de glúten de milho extrusado



RAD = rendimento de amostra digerida.

As condições de extrusão do GM, obtidas a partir do teste de desejabilidade e otimização (Tabela 3), para obter o maior RAD foram 40% de umidade da amostra, 140°C de temperatura na

zona de aquecimento e 54 rpm para a velocidade do parafuso do extrusor. Em relação ao GM controle (não extrusado), o extrusado nessas condições, mostrou 56,79% de aumento no RAD (Tabela 1). Além disso, para essas condições, as respostas previstas não difeririam dos resultados experimentais ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3), permitindo a utilização dos modelos propostos para propósitos preditivos.

**Tabela 3** – Validação da função resposta utilizando a condição desejável de extrusão<sup>1</sup> para maior digestão enzimática de farelo de glúten de milho.

Variável	Resposta preditiva	Resposta experimental <sup>2</sup>
RAD	33,08 ± 15,15 <sup>a</sup>	37,30 ± 4,43 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Condição desejável de extrusão: umidade da amostra = 40%, temperatura de extrusão = 140°C, velocidade do parafuso = 54 rpm. <sup>2</sup>Valores médios ± desvio padrão com três repetições. Médias na mesma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ). RAD = rendimento de amostra digerida (%)

### 3.3 Caracterização química e biológica dos GM e GMEO antes e após a digestão gastrointestinal simulada

Considerando 100 gramas de cada amostra, o teor de nitrogênio foi maior naquelas digeridas (Tabela 4), confirmando que a digestão do material contribuiu para a liberação de compostos nitrogenados, como os aminoácidos, peptídeos e proteínas pequenas. Além disso, o teor de nitrogênio foi maior nas amostras extrusadas, uma vez que o processamento contribui para o desdobramento parcial e desnaturação das moléculas de proteínas e possibilita maior acesso das enzimas ao sítio ativo das proteínas (FRANCA-OLIVEIRA; FORNARI; HERNÁNDEZ-LEDESMA, 2021; FISCHER et al., 2004).

Comparando-se as amostras digeridas, o teor de nitrogênio foi maior em GMEOD do que em GMD. Também quando se compara a relação, em %, da massa de nitrogênio nas amostras após e antes da digestão, no GMEOD a proporção de nitrogênio recuperado após a digestão foi maior que no GMD (Tabela 4). A extrusão do GM e a consequente modificação estrutural das proteínas, conforme observado no item 5.2, podem ter auxiliado na exposição de segmentos de aminoácidos e ligações peptídicas específicos para os sítios ativos das enzimas digestivas, facilitando a liberação de nitrogênio.

**Tabela 4** – Grau de hidrólise, teor de nitrogênio e ação biológica dos GM e GMEO antes e após a digestão gastrointestinal simulada

Parâmetros	GM	GMEO	GMD	GMEOD
<b>Teor de nitrogênio (g 100g<sup>-1</sup> de cada amostra) (base seca)</b>	9,95 ± 1,28 <sup>c</sup>	10,16 ± 1,52 <sup>c</sup>	12,88 ± 0,32 <sup>b</sup>	14,76 ± 2,84 <sup>a</sup>
<b>Relação entre a massa de nitrogênio após e antes da digestão (%)</b>	-	-	20,83 ± 0,69 <sup>b</sup>	32,09 ± 1,42 <sup>a</sup>
<b>GH (%)</b>	5,60 ± 0,82 <sup>c</sup>	1,42 ± 0,08 <sup>d</sup>	32,07 ± 3,23 <sup>b</sup>	50,81 ± 2,00 <sup>a</sup>
<b>Digestibilidade (%)</b>	-	-	68,81 ± 1,04 <sup>b</sup>	77,24 ± 1,57 <sup>a</sup>
<b>Capacidade redutora (µg EAG g<sup>-1</sup>)</b>	21,19 ± 1,67 <sup>c</sup>	12,84 ± 0,67 <sup>d</sup>	30,35 ± 0,47 <sup>b</sup>	37,02 ± 1,42 <sup>a</sup>
<b>Antioxidante FRAP (µmol ET mg<sup>-1</sup>)</b>	4,33 ± 0,33 <sup>c</sup>	4,26 ± 0,54 <sup>c</sup>	58,30 ± 3,08 <sup>a</sup>	35,24 ± 2,40 <sup>b</sup>
<b>Antioxidante ABTS (µmol ET mg<sup>-1</sup>)</b>	22,95 ± 0,44 <sup>c</sup>	22,61 ± 0,43 <sup>c</sup>	36,42 ± 1,48 <sup>b</sup>	55,36 ± 3,36 <sup>a</sup>
<b>Antioxidante DPPH (µmol ET mg<sup>-1</sup>)</b>	24,43 ± 0,75 <sup>b</sup>	23,71 ± 2,23 <sup>b</sup>	40,76 ± 1,41 <sup>a</sup>	36,82 ± 2,16 <sup>a</sup>
<b>Atividade de inibição ECA (%)</b>	6,37 ± 0,33 <sup>c</sup>	4,80 ± 0,17 <sup>c</sup>	57,57 ± 1,06 <sup>b</sup>	66,47 ± 1,93 <sup>a</sup>
<b>Atividade de inibição de alfa-amilase (%)</b>	21,19 ± 2,51 <sup>c</sup>	20,89 ± 0,23 <sup>c</sup>	68,76 ± 1,13 <sup>a</sup>	57,11 ± 1,85 <sup>b</sup>
<b>Atividade de inibição de alfa-glucosidase (%)</b>	4,09 ± 0,82 <sup>b</sup>	1,91 ± 0,27 <sup>b</sup>	36,24 ± 2,23 <sup>a</sup>	34,88 ± 0,72 <sup>a</sup>

Médias na mesma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ). GH é o grau de hidrólise; GM = farelo de glúten de milho; GMEO = farelo de glúten de milho extrusado-otimizado; GMD = farelo de glúten de milho digerido; GMEOD = farelo de glúten de milho extrusado-otimizado digerido; EAG = equivalente de ácido gálico; ET = equivalentes µmol de Trolox; FRAP = poder de redução férrico; ABTS = atividade antioxidante utilizando o radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfonato); DPPH = atividade sequestradora de radicais livres; ECA = Inibição da enzima conversora de angiotensina I.

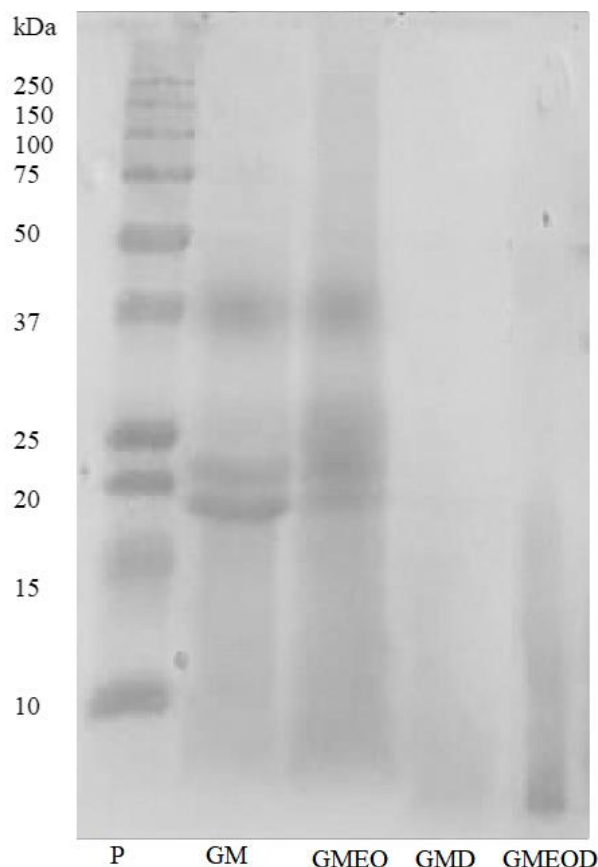
Todas as amostras mostraram GH diferentes ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). Como esperado, o GMD e GMEOD mostraram GH maior do que as respectivas amostras não digeridas (GM e GMEO). O menor GH do GMEO em comparação com GM pode ser resultado das alterações moleculares das proteínas devido à extrusão (ZHANG et al., 2022).

Comparando-se as amostras digeridas, o GH e a digestibilidade de GMEOD foram maiores do que GMD sugerindo que houve maior clivagem, pela hidrólise, das ligações peptídicas na amostra extrusada (GMEOD) em relação a não extrusada (GMD) (Tabela 4). A desnaturação ou desenovelamento das moléculas de proteínas devido à extrusão contribuiu para exposição segmentos de aminoácidos específicos da molécula para a ação enzimática (digestão) (ZHANG et al., 2023; OMOSEBI; OSUNDAHUNSI; FAGBEMI, 2018). Resultado semelhante foi descrito por Zheng et al. (2006) para hidrólise de GM com a enzima Alcalase, em que o maior GH foi observado no GM extrusado. Para Zhou et al. (2015) tratamentos térmicos, com objetivo de desnaturar as proteínas, do GM contribuíram para maior hidrólise.

A eletroforese do GM e GMEO indicou a presença de bandas características de alfa-zeínas, em torno de 22 e 24 kDa e dímeros de zeína ou gama-zeína, em torno de 36 kDa, conforme verificado, também, por Montoya-Rodriguez et al. (2020) e Uan-on, Baibang e Shuwisitkul (2018) (Figura 2). As bandas relacionadas à glutelinas não foram identificadas (próximo de 40-45 kDa). Outros autores também relataram que não foi possível identificar bandas de glutelinas no GM (SINGH et al., 2022; ZHENG et al., 2006). No GMEO observou-se a presença de uma banda suave maior que 25 kDa o que pode indicar agregação das alfa-zeínas durante o processamento por extrusão, conforme descrito por Federici et al. (2020), que encontraram bandas em, aproximadamente, 30 kDa em GM extrusado.

O perfil eletroforético de GMD e GMEOD foi diferente das respectivas amostras antes da digestão. Não foi possível identificar bandas acima de 10 kDa, sugerindo que as proteínas do GM foram hidrolisadas pelas enzimas pepsina e pancreatina. Resultado semelhante foi relatado por Montoya-Rodriguez et al. (2020) para hidrólise enzimática de milho com pepsina e pancreatina e hidrólise de GM azul. Zheng et al. (2006) obtiveram resultados que corroboram com este estudo, demonstrando por meio do perfil eletrofotético, que o GM extrusado e digerido por Alcalase apresentou perda das porções proteicas características da alfa-zeína.

**Figura 2** – Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas dos GM e GMEO antes e após a digestão gastrointestinal simulada



P = padrão de proteína; GM = farelo de glúten de milho; GMEO = farelo de glúten de milho extrusado-otimizado; GMD = farelo de glúten de milho digerido; GMEOD = farelo de glúten de milho extrusado-otimizado digerido.

A capacidade redutora do GM extrusado (GMEO) foi menor ( $p < 0,05$ ) que a do GM não extrusado, mas a capacidade antioxidante dessas amostras não diferiu quando avaliada pelos métodos FRAP, ABTS e DPPH ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4). A extrusão pode aumentar ou diminuir a proporção de compostos com propriedades antioxidantes dependendo das condições empregadas e das características do material a ser processado (MORENO et al., 2017). Moreno et al. (2017) relataram que as perdas de compostos bioativos, como compostos fenólicos, durante a extrusão, ocorrem como resultado da degradação térmica devido a ocorrência de reação de Maillard e de polimerização fenólica. Os autores sugerem que compostos antioxidantes, não relacionados aos

compostos fenólicos, podem não ser afetados pelo processo de extrusão, pois apresentam menor sensibilidade ao calor. \_

A hidrólise favoreceu a capacidade antioxidante (FRAP, ABTS e DPPH) (Tabela 4) das amostras, uma vez que os valores de GMD e GMEOD foram superiores aos de GM e GMEO ( $p < 0,05$ ), corroborando com resultados de Chanajon, Noisa e Yongsawatdigul (2022) para GM e GM hidrolisado. De acordo com Liu et al. (2020), a capacidade antioxidante de peptídeos de GM pode variar devido à especificidade da enzima e o tempo de hidrólise, pois resultam em peptídeos com diferentes composições, tamanhos e sequências de aminoácidos.

Tem sido observado que peptídeos de GM contendo maior proporção de aminoácidos hidrofóbicos, como tirosina, fenilalanina, leucina e alanina, em relação aos hidrofílicos, e/ou presença de aminoácidos aromáticos e aqueles contendo enxofre na molécula apresentam propriedades antioxidantes devido a capacidade de doação de elétrons por estes aminoácidos (ZHOU et al., 2015; CHANAJON; NOISA; YONGSAWATDIGUL, 2022; JIN et al., 2016; WANG et al., 2016; WANG et al., 2014). Minkiewicz et al. (2019) observaram que a enzima pepsina possui especificidade de ação nos aminoácidos tirosina, triptofano e lisina, o que pode ter contribuído para a ação antioxidativa observada neste estudo.

A atividade de inibição de ECA foi similar para GM e GMEO sugerindo que a extrusão não afetou esse parâmetro, mas houve aumento da atividade após a digestão das amostras (Tabela 4). A maior inibição ECA do GMEOD em relação ao GMD pode estar relacionada a contribuição da extrusão na alteração da conformação molecular das proteínas de modo que favoreceu a exposição ligações peptídicas de segmentos de aminoácidos específicos para ação das enzimas (OMOSEBI; OSUNDAHUNSI; FAGBEMI, 2018), e a hidrólise enzimática (Tabela 3) e dessa forma auxiliou na liberação de peptídeos contendo aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos em seus terminais, que são responsáveis pela atividade de inibição de ECA (HUANG et al., 2011).

Montoya-Rodriguez et al. (2020) notaram maior potencial de inibição ECA do milho azul hidrolisado por pepsina e pancreatina (94,5%), do que o encontrado neste estudo. A diferença pode estar relacionada ao tempo de digestão pela pepsina, que para os autores foi de 180 min, enquanto neste estudo foi 120 min, o que pode ter contribuído para produzir peptídeos de GM maiores (MINKIEWICZ et al., 2019). O tempo de digestão é um dos fatores que interfere nas propriedades dos peptídeos, pois determina a massa molecular dos compostos liberados na hidrólise. Para Huang

et al. (2011), peptídeos de GM maiores que 5 kDa apresentaram menor poder inibidor de ECA que aqueles menores que 3 kDa. Maior inibição de ECA também foi relatada por Sharma et al. (2022) para hidrólise de GM com Alcalase, provavelmente devido a especificidade da enzima (MINKIEWICZ et al., 2019).

A atividade de inibição da ação da alfa-amilase e alfa-glucosidase foi alterada após a digestão das amostras, sendo que para a alfa-amilase foi maior na amostra extrusada e digerida (Tabela 4). A resposta da inibição da ação da enzima alfa-amilase representa a possibilidade de o amido não ser digerido na saliva e no pâncreas, contribuindo para a não absorção de açúcares simples e aumento da taxa de glicose no sangue. Além disso, sem a ação da enzima o amido é fermentado no cólon e exerce função de fibra dietética, diminuindo a quantidade de calorias absorvidas (UDANI et al., 2018). DiNicolantonio et al. (2015) descreveram que a inibição da enzima alfa-glucosidase, por sua vez, impede a quebra de oligossacarídeos em unidades menores e, portanto, diminui a biodisponibilidade de carboidratos simples na corrente sanguínea, contribuindo para a regulação dos níveis de glicose e controle da diabetes.

GMD apresentou maior inibição de alfa-amilase em relação a acarbose (61,24%). GMD e GMEOD apresentaram inibição de alfa-glucosidase menor em relação a acarbose (60,23%). Karimi, Azizi e Gavlighi (2020) notaram valores semelhantes para a inibição da alfa-amilase (71,3%) e alfa-glucosidase (37,1%) para GM hidrolisado por flavourzima, uma enzima exógena ao humano. Ainda encontraram menor inibição de alfa-amilase em hidrolisados de GM (26,13%) e relataram que a presença de aminoácidos básicos, como lisina e arginina, e aminoácidos com grupos hidroxila (serina, treonina e tirosina) contribuem para as propriedades antidiabéticas (MIRZAEI et al., 2022).

#### **4. CONCLUSÃO**

A extrusão do farelo glúten de milho nas diferentes condições de umidade de amostra, temperatura e rotação do parafuso do extrusor afetou o rendimento de amostra digerida em condições gastrointestinal simuladas e a otimização indicou que o maior rendimento é na condição de 40% de umidade da amostra, 140°C de temperatura na zona de aquecimento e rotação do parafuso de 54 rpm.

A digestão enzimática sequencial modificou o perfil eletroforético, confirmando que houve hidrólise das proteínas do farelo de glúten de milho extrusado e não extrusado. O farelo de glúten de milho extrusado otimizado-digerido apresentou maior potencial de ação biológica relacionado à capacidade redutora, atividade sequestrante de radicais livres e atividade de inibição de ECA. A extrusão é um tratamento prévio que facilita a digestão gastrointestinal das proteínas do farelo do glúten de milho, além de aumentar seu potencial bioativo, e desta forma, agregar valor a este resíduo visando alimentação humana.

## 5. REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSER, J. Enzymic hydrolysis of food proteins. **Elsevier Applied Science Publishers**, 365 – 404, 1986.
- AKBARIAN, M.; KHANI, A.; EGHBALPOUR, S.; UVERSKY, V. N. Bioactive peptides: synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1445, 2022.
- ALU'DATT, M. H.; EREIFEJ, K.; ABU-ZAITON, A.; ALRABABAH, M.; ALMAJWAL, A.; RABABAH, T.; YANG, W. Antioxidant, antidiabetic, and antihypertensive effects of extracted phenolics and hydrolyzed peptides from barley protein fractions. **International Journal of Food Properties**, v. 15, n. 4, p. 781 – 795, 2012.
- AOAC. **Métodos oficiais de análise da AOAC International**. 16 ed. Gaithersburg, 1995.
- ATUKURI, J.; ODONG, B. B.; MUYONGA, J. H. Multi-response optimization of extrusion conditions of grain amaranth flour by response surface methodology. **Food Science & Nutrition**, v. 7, p. 4147 – 4162, 2019.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 292, p. 70 – 76, 1996.
- BOUGATEF, A.; HAJJI, M.; BALTI, R.; LASSOUED, I.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1198 – 1205, 2009.
- BRENNAN, C.; BRENNAN, M.; DERBYSHIRE, E.; TIWARI, B. K. Effects of extrusion on the polyphenols, vitamins, and antioxidant activity of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, v. 10, p. 570 – 575, 2011.
- CANELLA, M. Whipping properties of sunflower proteins dispersions. **LWT – Food Science and Technology**, v. 11, n. 5, p. 259 – 263, 1978.

CHANAJON, P.; NOISA, P.; YONGSAWATDIGUL, J. Prolyl oligopeptidase inhibition and cellular antioxidant activities of a corn gluten meal hydrolysate. **Cereal Chemistry**, v. 99, n. 6, p. 1183 – 1195, 2022.

CHEN, Y.; LIANG, Y.; JIA, F.; CHEN, D.; ZHANG, X.; WANG, Q.; WANG, J. Effect of extrusion temperature on the protein aggregation of wheat gluten with the addition of peanut oil during extrusion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1377 – 1386, 2021.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (2023). Estimativas – Produção e Balanço de oferta e demanda.

CONNOLLY, A.; PIGGOTT, C. O.; FITZGERALD, R. J. In vitro  $\alpha$ -glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 56, p. 100 -107, 2014.

CRUZ, J. N. Hidrolisado proteico da semente de cupuaçu como fonte de peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina I (Tese de doutorado). São Paulo: Universidade de São Paulo. 2014.

DA COSTA, P. F. P.; FERRAZ, M. B. M.; ROS-POLSKI, V.; QUAST, E.; COLLARES QUEIROZ, F. P.; STEEL, C. J. Functional extruded snacks with lycopene and soy protein. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 143-151, 2010.

DINICOLANTONIO, J. J.; BHUTANI, J.; O'KEEFE, J. H. Acarbose: safe and effective for lowering postprandial hyperglycaemia and improving cardiovascular outcomes. **Open Heart**, v. 2, n. 1, e000327, 2015.

DONADEL, M. E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de concentrado proteico de feijão envelhecido. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, 1999.

FEDERICI, E.; JONES, O. G.; SELLING, G. W.; TAGLIASCO, M.; CAMPANELLA, O. H. Effect of zein extrusion and starch type on the rheological behavior of gluten-free dough. **Journal of Cereal Science**, v. 91, 102866, 2020.

FISCHER, T. Effect of extrusion cooking on protein modification in wheat flour. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 128 – 132, 2004.

FRANCA-OLIVEIRA, G.; FORNARI, T.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. A review on the extraction and processing of natural source-derived proteins through eco-innovative approaches. **Processes**, v. 9, n. 9, p. 1626, 2021.

GRANATO, D.; CALADO, V. M. de. A.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137-149, 2014.

HU, R.; XU, J.; QI, G.; WANG, W.; SUN, X. S.; LI, Y. Antioxidative hydrolysates from corn gluten meal may effectively reduce lipid oxidation and inhibit HepG2 cancer cell growth. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 7, 100252, 2022.

HUANG, W. H.; SUN, J.; HE, H.; DONG, H. W.; LI, J. T. Antihypertensive effect of corn peptides, produced by a continuous production in enzymatic membrane reactor, in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v. 128, p. 968–973, 2011.

- ISLAM, M., HUANG, Y., ISLAM, S., FAN, B., TONG, L., WANG, F. Influence of the degree of hydrolysis on functional properties and antioxidant activity of enzymatic soybean protein hydrolysates. **Molecules**, 27, 6110, 2022.
- JIN, D.; LIU, X.; ZHENG, X.; WANG, X.; HE, J. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. **Food Chemistry**, v. 204, p. 427-436, 2016.
- KARIMI, A.; AZIZI, M. H.; GAVLIGHI, H. A. Fractionation of hydrolysate from corn germ protein by ultrafiltration: in vitro antidiabetic and antioxidant activity. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 5, p. 2395 – 2405, 2020.
- LAHOUE, V.; REHEL, K.; TAUPIN, L.; HARAS, D.; ALLAUME, P. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 870 – 875, 2010.
- LAMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 - 685, 1970.
- LI, T.; GUO, X.; ZHU, K.; ZHOU, H. Effects of alkali on protein polymerization and textural characteristics of textured wheat protein. **Food Chemistry**, v. 239, p. 579–587, 2018.
- LIU, W.; FANG, L.; FENG, X.; LI, G.; GU, R. In vitro antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of peptides derived from corn gluten meal. **European Food Research and Technology**, v. 246, p. 2017 – 2027, 2020.
- MA, W.; QI, B.; SAMI, R.; JIANG, L.; LI, Y.; WANG, H. Conformational and functional properties of soybean proteins produced by extrusion-hydrolysis approach. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2018, e9182508, 2018.
- MINKIEWICZ, P.; IWANIAK, A.; DAREWICZ, M. BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 5978, 2019.
- MIRZAEI, H.; GAVLIGHI, H. A.; NIKOO, M.; UDENIGWE, C. C.; KHODAIYAN, F. Relation of amino acid composition, hydrophobicity, and molecular weight with antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant properties of mixtures of corn gluten and soy protein hydrolysates. **Food Science & Nutrition**, 2022.
- MOCHIZUKI, M.; SHIGEMURA, H.; HASEGAWA, N. Anti-inflammatory effect of enzymatic hydrolysate of corn gluten in an experimental model of colitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, p. 389-392, 2010.
- MONTOYA-RODRÍGUEZ, A.; OSUNA-GALLARDO, E.I.; CABRERA-CHÁVEZ, F.; MILÁN-CARRILLO, J.; REYES-MORENO, C.; MILÁN-NORIS, E.M.; CUEVAS-RODRÍGUEZ, E.O.; MORA-ROCHÍN, S. Evaluation of the in vitro and in vivo antihypertensive effect and antioxidant activity of blue corn hydrolysates derived from wet-milling. **Biotechnia**, v. 22, p. 155–162, 2020.
- MORENO, C. R.; FERNÁNDEZ, P. C. R.; RODRIGUEZ, E. O. C.; CARRILLO, J. M.; ROCHÍN, S. M. Changes in nutritional Properties and bioactive compounds in cereals during

extrusion cooking. In IntechOpen (Ed.), **Extrusion of Metals, Polymers, and Food Products**, p. 103 – 124.

MOSIBO, O. K.; FERRENTINO, G.; ALAM, M. R.; MOROZOVA, K.; SCAMPICCHIO, M. Extrusion cooking of protein-based products: potentials and challenges. **Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 9, p. 2526-2547, 2020.

MURATE, E. H.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de concentrado protéico extrusado de sementes de girassol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 2, 1999.

NGOH, Y. Y.; GAN, C. Y. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). **Food Chemistry**, v. 190, p. 331 – 337, 2016.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 5, p. 642 – 646, 2001.

OMOSEBI, M. O.; OSUNDAHUNSI, O. F.; FAGBEMI, T. N. Effect of extrusion on protein quality, antinutritional factors, and digestibility of complementary diet from quality protein maize and soybean protein concentrate. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 4, e12508, 2018.

ONESMO, N. O. Effects of malting and fermentation on the composition and functionality of sorghum flour. (Dissertations & theses in food science and technology presented to Food Science and Technology Department, University of Nebraska, Lincoln). Paper, 12. 2011.

ORTIZ-MARTINEZ, M.; MEJIA, E. G. de.; GARCÍA-LARA, S.; AGUILAR, O.; LOPEZ-CASTILHO, L. M.; OTERO-PAPPATHEODOROU, J. T. Antiproliferative effect of peptide fractions isolated from a quality protein maize, a white hybrid maize, and their derived peptides on hepatocarcinoma human HepG2 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 36– 48, 2017.

PETERSON, G. L. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**, v. 100, p. 201-220, 1979.

PIETSCH, V. L.; EMIN, M. A.; SCHUCHMANN, H. P. Process conditions influencing heat gluten polymerization during high moisture extrusion of meat analog products. **Journal of Food Engineering**, v. 198, p. 28–35, 2017.

PRUDENCIO-FERREIRA, S. H.; ARÊAS, J. A. G. Protein-protein interactions in the extrusion of soya at various temperatures and moisture contents. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 2, p. 378 – 381, 1993.

REVILLA, P.; ALVES, M. L.; ANDELKOVIĆ, V.; BALCONI, C.; DINIS, I.; MENDES-MOREIRA, P.; REDAELLI, R.; GALARRETA, J. I. R. DE.; PATTO, M. C. V.; ŽILIĆ, S.; MALVAR, R. A. Traditional foods from maize (*Zea mays* L.) in Europe. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 683399, 2021.

RIBEIRO, K. DE. O.; GARCIA, M. C.; OLIVEIRA, A. R.; SOARES JÚNIOR, M. S.; CALIRI, M. Characterization and proposal of potential use in foods of coproducts from waxy maize wet milling. **Food Science and Technology**, v. 39, 315-320, 2019.

ROCHA, T. S.; HERNANDEZ, L. M. R.; CHANG, Y. K.; MEJÍA, E. G. Impacto f germination and enzymatic hydrolysis of cowpea bean (*Vigna unguiculata*) on the generation of peptides capable of inhibiting dipeptidyl peptidase IV. **Food Research International**, v. 64, p. 799 – 809, 2014.

SÁ, A.; MORENO, Y.; CARCIOFI, B. Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 20, p. 3367 – 3386, 2020.

SCHMID, E.; FARAHNAKY, A.; ADHIKARI, B.; TORLEY, P. J. High moisture extrusion cooking of meat analogs: a review of mechanisms of protein texturization. **Comprehensive Review**, p. 1 – 37, 2022.

SEIBEL, N. F.; BELÉIA, A. D. P. Características químicas e funcionalidade tecnológica de ingredientes de soja [*Glycine Max* (L.) Merrill]: carboidratos e proteínas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 113 – 122, 2009.

SHARMA, S.; PRADHAN, R.; MANICKAVASAGAN, A.; THIMMANAGARI, M.; SAHA, D.; SINGH, S. S.; DUTTA, A. Production of antioxidative protein hydrolysates from corn distillers solubles: process optimization, antioxidant activity evaluation, and peptide analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 184, 115107, 2022.

SHEN, Y., HU, R., LI, Y. Antioxidant and emulsifying activities of corn gluten meal hydrolysates in oil-in-water emulsions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 97, n. 2, p. 175 – 185, 2020.

SINGH, U.; KAUR, D.; MISHRA, V.; KRISHANIA, M. Combinatorial approach to prepare antioxidative protein hydrolysate from corn gluten meal with dairy whey: preparation, kinetics, nutritional study and cost analysis. **LWT – Food Science and Technology**, v. 153, 112437, 2022.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152 - 178, 1999.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (Data Analysis Software System), Version 7.0. 2011.

TANG, C.-H.; MA, C.-Y. Heat-induced modifications in the functional and structural properties of vicilin-rich protein isolate from kidney (*Phaseolus vulgaris*, L.) bean. **Food Chemistry**, v. 115, p. 859–866, 2009.

TRAN, H. C.; LE, H. A. T.; LE, T. T.; PHAN, V. M. Effects of enzyme types and extraction conditions on protein recovery and antioxidant properties of hydrolysed proteins derived from defatted *Lemna minor*. **Applied Science and Engineering Progress**, v. 14, n. 3, p. 360-369, 2021.

TRINIDAD-CALDERÓN, P. A.; ACOSTA-CRUZ, E.; RIVERO-MASSANTE, M. N.; DÍAZ-GÓMEZ, J. L.; GARCÍA-LARA, S.; LÓPEZ-CASTILLO, L. M. Maize bioactive peptides: from structure to human health. **Journal of Cereal Science**, v. 100, 103232, 2021.

UAN-ON, T.; BAIBANG, C.; SHUWISITKUL, D. Extraction and characterization of zein protein from corn for controlled drug release. **Current Applied Science and Technology**, v. 18, n. 3, p. 167 – 178, 2018.

UDANI, J.; TAN, O.; MOLINA, J. Systematic Review and Meta-Analysis of a Proprietary Alpha-Amylase Inhibitor from White Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on Weight and Fat Loss in Humans. **Foods**, v. 7, n. 4, p. 1-10, 2018.

WANG, C.; HE, H.; ZHANG, J.; LI, X.; MA, Z. High performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints and primary structure identification of corn peptides by HPLC-diode array detection and HPLC-electrospray ionization tandem mass. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, p. 94-104, 2016.

WANG, H.; VAN DEN BERG, F. W. J.; ZHANG, W.; CZAJA, T. P.; ZHANG, L.; JESPERSEBM B. M.; LAMETSCH, R. Differences in physicochemical properties of high-moisture extrudates prepared from soy and pea protein isolates. **Food Hydrocolloids**, v. 128, 107540, 2022.

WANG, Y.; CHEN, H.; WANG, J.; XING, L. Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate–chitosan beads. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 1682-1690, 2014.

WONGNGAM, W.; HAMZEH, A.; TIAN, F.; ROYTRAKUL, S.; YONGSAWATDIGUL, J. Purification and molecular docking of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides derived from corn gluten meal hydrolysate and from in silico gastrointestinal digestion. **Process Biochemistry**, v. 129, p. 113 – 120, 2023.

YANQING, L.; YUYANG, H.; XIAOQI, D.; ZHIMIN, L.; WENTAO, L.; GUANG, Z.; YING, Z.; XIUQING, X. Effect of enzymatic hydrolysis followed after extrusion pretreatment on the structure and emulsibility of soybean protein. **Process Biochemistry**, v. 116, p. 173 – 184, 2022.

ZAKY, A. A.; SIMAL-GANDARA, J.; EUN, J.; SHIM, J.; EL-ATY, A. M. A. Bioactivities, applications, safety, and health benefits of bioactive peptides from food and by-products: a review. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 815640, 2021.

ZHANG, B.; KANG, X.; CHENG, Y.; CUI, B.; EL-ATY, A. M. A. Impact of high moisture contents on the structure and functional properties of pea protein isolate during extrusion. **Food Hydrocolloids**, v. 127, 107508, 2022.

ZHANG, Y.; HE, Z.; XU, M.; ZHANG, X.; CAO, S.; HU, Y.; LUAN, G. Physicochemical properties and protein structure of extruded corn gluten meal: implication of temperature. **Food Chemistry**, v. 399, 133985, 2023.

ZHENG, X. Q.; WANG, J. T.; LIU, X. L.; SUN, Y.; ZHENG, Y. J.; WANG, X. J.; LIU, Y. Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by protamex hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 172, p. 407 – 415, 2015.

ZHENG, X.; LI, L.; LIU, X.; WANG, X.; LIN, J.; LI, D. Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 4, p. 763 – 770, 2006.

ZHOU, C.; HU, J.; MA, H.; YAGOUB, A. E. A.; YU, X.; OWSU, J.; MA, H.; QIN, X. Antioxidant peptides from corn gluten meal: orthogonal design evaluation. **Food Chemistry**, v. 187, p. 270 – 278, 2015.

## 6. CONCLUSÕES

As conclusões do presente estudo foram:

- A modificação do farelo de glúten de milho por meio da extrusão, em diferentes condições de umidade da amostra, temperatura e rotação do parafuso, provoca a diminuição da capacidade de absorção de água e solubilidade de proteína da amostra em pH 7, mas é possível otimizar a menor redução dessas propriedades na condição de 20% de umidade da amostra, 120°C de temperatura na zona de aquecimento e 117 rpm. Além disso, a extrusão afeta o rendimento da digestão gastrointestinal simulada (enzimática sequencial) do farelo de glúten de milho, e a otimização indica que o maior rendimento é na condição de 40% de umidade da amostra, 140°C de temperatura na zona de aquecimento e 54 rpm.
- A extrusão em condição otimizada do farelo de glúten de milho resulta no aumento da capacidade e atividade emulsificante. Entretanto, as alterações na estrutura molecular das proteínas provocam diminuição da solubilidade das proteínas em água e em diferentes pHs. A extrusão, ainda, leva ao aumento de interações não covalentes e ligações dissulfetos, além da intensificação da estrutura do tipo folha  $\beta$ .
- O perfil eletroforético das proteínas do farelo de glúten de milho extrusado otimizado-digerido é diferente do material extrusado e não extrusado, confirmando a hidrólise das proteínas. Este material, também, apresenta maior potencial de ação biológica relacionado à capacidade redutora, poder de redução férrico, atividade sequestrante de radicais livres, atividade de inibição de ECA, alfa-amilase e alfa-glucosidase.
- A extrusão é um tratamento prévio que modifica as características físicas, químicas e tecnofuncionais do farelo de glúten de milho e facilita a digestão gastrointestinal dessas proteínas, além aumentar seu potencial bioativo, e desta forma agregar valor a este resíduo visando alimentação humana.
- A análise *in silico* da alfa-zeína demonstra que o consumo desta proteína tem potencial para contribuir para diminuir o risco de diabetes mellitus tipo 2, hipertensão e outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer e inflamação, devido a liberação de peptídeos com ação inibitória de ECA, inibitória de DPP III e DPP IV e antioxidantes.

- O estudo *in silico* das prolaminas do milho confirma que a previsão computacional de peptídeos bioativos pode ser uma ferramenta útil e econômica para o design e síntese de novos peptídeos derivados de alimentos para estudos *in vitro* e *in vivo*.
- Os peptídeos do milho podem ser usados para manufatura de alimentos nutracêuticos ampliando a utilização desta matéria-prima, além de agregar valor econômico ao produto.
- O presente estudo amplia as perspectivas para o aproveitamento e agregação de valor ao farelo de glúten de milho como um ingrediente alimentar a partir de modificações moleculares de seus componentes para o aperfeiçoamento de características tecnofuncionais ou aquelas relacionadas à saúde, além de contribuir para a redução de resíduos agroindustriais.