

Proteínas de sementes de abóbora e propriedades multifuncionais de seus hidrolisados: uma revisão

Pumpkin seed proteins and the multifunctional properties of their hydrolysates: a review

Proteínas de semilla de calabaza y propiedades multifuncionales de sus hidrolisados: una revisión

Recebido: 30/05/2022 | Revisado: 11/06/2022 | Aceito: 15/06/2022 | Publicado: 26/06/2022

Ana Flávia Coelho Pacheco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7220-1432>
Universidade Federal de Viçosa, Brasil
E-mail: ana.f.pacheco@ufv.br

Gabriela Zinato Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0160-3378>
Universidade Federal de Viçosa, Brasil
E-mail: gabriela.zinato@ufv.br

Ana Carolina de Souza Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4789-1923>
Universidade Federal de Viçosa, Brasil
E-mail: ana.rodrigues10@ufv.br

Jeferson Silva Cunha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6722-9051>
Universidade Federal de Viçosa, Brasil
E-mail: jeferson.cunha@ufv.br

Flaviana Coelho Pacheco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1302-8059>
Universidade Federal de Viçosa, Brasil
E-mail: flaviana.pacheco@ufv.br

Paulo Henrique Costa Paiva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5455-7790>
EPAMIG, Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Brasil
E-mail: paulohcp@epamig.br

Alline Artigiani Lima Tribst

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1946-9354>
Universidade Estadual de Campinas, Brasil
E-mail: tribst@unucamp.br

Bruno Ricardo de Castro Leite Junior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9030-2819>
Universidade Federal de Viçosa, Brasil
E-mail: bruno.leite@ufv.br

Resumo

As sementes de abóbora são, na maioria das vezes, descartadas ou destinadas à alimentação animal, apesar de serem uma fonte promissora de proteínas. Diversos estudos têm demonstrado o potencial técnico-funcional de diferentes proteínas vegetais utilizadas no processamento de alimentos como ingredientes para melhoria das propriedades de formação de espuma, emulsificação e gelificação. Entretanto, a baixa solubilidade em água das proteínas de sementes de abóbora dificulta a sua aplicação industrial em diversos produtos. Para superar esta limitação, a hidrólise dessas proteínas surge como uma estratégia promissora para obtenção de compostos com melhores propriedades técnico-funcionais em comparação com as proteínas nativas. Além disso, os peptídeos obtidos podem exercer potenciais propriedades biológicas, tais como: atividades antidiabética, antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória e antimicrobiana. Com esta revisão de literatura, estudos sobre proteínas de sementes de abóbora, sua composição e propriedades técnico-funcionais foram compilados. As propriedades dos hidrolisados e peptídeos bioativos obtidos por meio da hidrólise enzimática das proteínas de sementes de abóbora foram enfatizados, de modo a difundir conhecimentos acerca do aproveitamento sustentável de uma fonte proteica de elevado potencial industrial. Os trabalhos mostraram que a hidrólise enzimática possibilita a obtenção de peptídeos bioativos com propriedades biológicas relevantes. Porém, estudos também devem ser conduzidos para compreensão do comportamento dos peptídeos bioativos em diferentes matrizes alimentares e em sistemas *in vivo*, a fim de reconhecer as suas bioatividades apresentadas *in vitro*.

Palavras-chave: Proteína vegetal; Propriedades técnico-funcionais; Propriedades biológicas; Hidrolisados; Peptídeos.

Abstract

Pumpkin seeds are most often discarded or intended for animal feed, despite being a promising source of protein. Several studies have demonstrated the technical-functional potential of different vegetable proteins used in food processing as ingredients to improve foaming, emulsification, and gelling properties. However, the low water solubility of pumpkin seed proteins makes their industrial application in several products difficult. To overcome this limitation, the hydrolysis of these proteins appears as a promising strategy to obtain compounds with better technical-functional properties compared to native proteins. In addition, the peptides obtained may exert potential biological properties, such as: antidiabetic, antioxidant, antihypertensive, anti-inflammatory, and antimicrobial activities. With this literature review, studies on pumpkin seed proteins, their composition and technical-functional properties were compiled. The properties of hydrolysates and bioactive peptides obtained through the enzymatic hydrolysis of pumpkin seed proteins were emphasized, to spread knowledge about the sustainable use of a protein source with high industrial potential. The works showed that enzymatic hydrolysis makes it possible to obtain bioactive peptides with relevant biological properties. However, studies should also be conducted to understand the behavior of bioactive peptides in different food matrices and *in vivo* systems, to recognize their bioactivities presented *in vitro*.

Keywords: Vegetable protein; Technical-functional properties; Biological properties; Hydrolyzed; Peptides.

Resumen

Las semillas de calabaza se desechan con mayor frecuencia o se destinan a la alimentación animal, a pesar de ser una fuente prometedora de proteínas. Diversos estudios han demostrado el potencial técnico-funcional de diferentes proteínas vegetales utilizadas en el procesamiento de alimentos como ingredientes para mejorar las propiedades espumantes, emulsionantes y gelificantes. Sin embargo, la baja solubilidad en agua de las proteínas de semilla de calabaza dificulta su aplicación industrial en varios productos. Para superar esta limitación, la hidrólisis de estas proteínas aparece como una estrategia prometedora para obtener compuestos con mejores propiedades técnico-funcionales en comparación con las proteínas nativas. Además, los péptidos obtenidos pueden ejercer potenciales propiedades biológicas, tales como: actividad antidiabética, antioxidante, antihipertensiva, antiinflamatoria y antimicrobiana. Con esta revisión bibliográfica se recopilieron estudios sobre proteínas de semilla de calabaza, su composición y propiedades técnico-funcionales. Se enfatizaron las propiedades de los hidrolizados y péptidos bioactivos obtenidos a través de la hidrólisis enzimática de las proteínas de semilla de calabaza, con el fin de difundir el conocimiento sobre el aprovechamiento sustentable de una fuente proteica con alto potencial industrial. Los trabajos demostraron que la hidrólisis enzimática permite obtener péptidos bioactivos con propiedades biológicas relevantes. Sin embargo, también se deben realizar estudios para comprender el comportamiento de los péptidos bioactivos en diferentes matrices alimentarias y en sistemas *in vivo*, con el fin de reconocer sus bioactividades presentadas *in vitro*.

Palabras clave: Proteína vegetal; Propiedades técnico-funcionales; Propiedades biológicas; Hidrolizado; Péptidos.

1. Introdução

As indústrias de processamento vegetal geram toneladas de resíduos anualmente por não utilizarem de modo integral as suas matérias-primas, sendo o quinto maior contribuinte para o total de desperdícios de alimentos dentre os diversos segmentos do setor alimentício, representando 8% do total (Fava et al., 2015; Banerjee et al., 2017). Entre os alimentos vegetais que geram uma grande quantidade de resíduos, principalmente sementes e cascas, destaca-se a abóbora (Fava et al., 2015).

A abóbora pertence à família Cucurbitaceae (Rahman et al., 2019). Sua produção mundial aumentou consideravelmente nos últimos anos, passando de 22 milhões de toneladas em 2008 para 27 milhões de toneladas em 2017, sendo a China e a Índia os principais produtores com cerca de 30 e 20% do total da produção mundial, respetivamente. Do ponto de vista nutricional, as abóboras são fontes valiosas de carotenoides, mas também contêm quantidades significativas de proteínas, fibras e tocoferol (Norfezah et al., 2011). No entanto, seu processamento, tanto artesanal quanto industrial, gera toneladas de resíduos como as sementes (representam 5% do peso total da abóbora) que, apesar de serem uma fonte expressiva de proteínas (24,5 a 36,0% em base seca), na maioria das vezes são destinadas à alimentação animal ou descartadas.

As sementes de abóbora representam uma fonte relativamente barata de proteínas em comparação com produtos de origem animal. Na indústria de alimentos, as proteínas de sementes de abóbora têm demonstrado potencial para diversas aplicações, devido às suas propriedades técnico-funcionais como emulsificação, principalmente (Bučko et al., 2015). Por outro lado, estas proteínas apresentam restrições relacionadas à sua baixa solubilidade em meio aquoso, com valores mínimos em pH

5 (correspondente ao seu ponto isoelétrico) e valores máximos em pH acima de 8, ou seja, a solubilidade aumenta em pH alcalino (Rezig et al., 2013; Bučko et al., 2015).

A solubilidade é uma propriedade que influencia diretamente nas outras propriedades técnico-funcionais e, conseqüentemente, na aplicação das proteínas de sementes de abóbora na indústria alimentícia. Logo, a obtenção de hidrolisados a partir destas proteínas surge como uma estratégia interessante para melhorar a solubilidade e outras propriedades técnico-funcionais como a emulsificação e formação de espuma (Bučko et al., 2016). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que os hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora podem conter peptídeos potencialmente bioativos, apresentando atividades antidiabética, antioxidante e anti-hipertensiva (Vaštag et al., 2011; Venuste et al., 2013; Vaštag et al., 2014; Nourmohammadi et al. 2017).

Desta forma, esta revisão tem o objetivo de apresentar o conhecimento atual sobre as proteínas de sementes de abóbora, sua importância tecnológica e limitações em aplicações na indústria de alimentos, enfatizando a obtenção de hidrolisados como uma estratégia para superar os desafios relacionados à sua técnico-funcionalidade. Assim, esse estudo descreve as principais formas de obtenção e as propriedades multifuncionais dos hidrolisados e peptídeos obtidos a partir de proteínas de sementes de abóbora, assim como as perspectivas futuras e desafios para otimizar à sua aplicação em diversos produtos alimentícios.

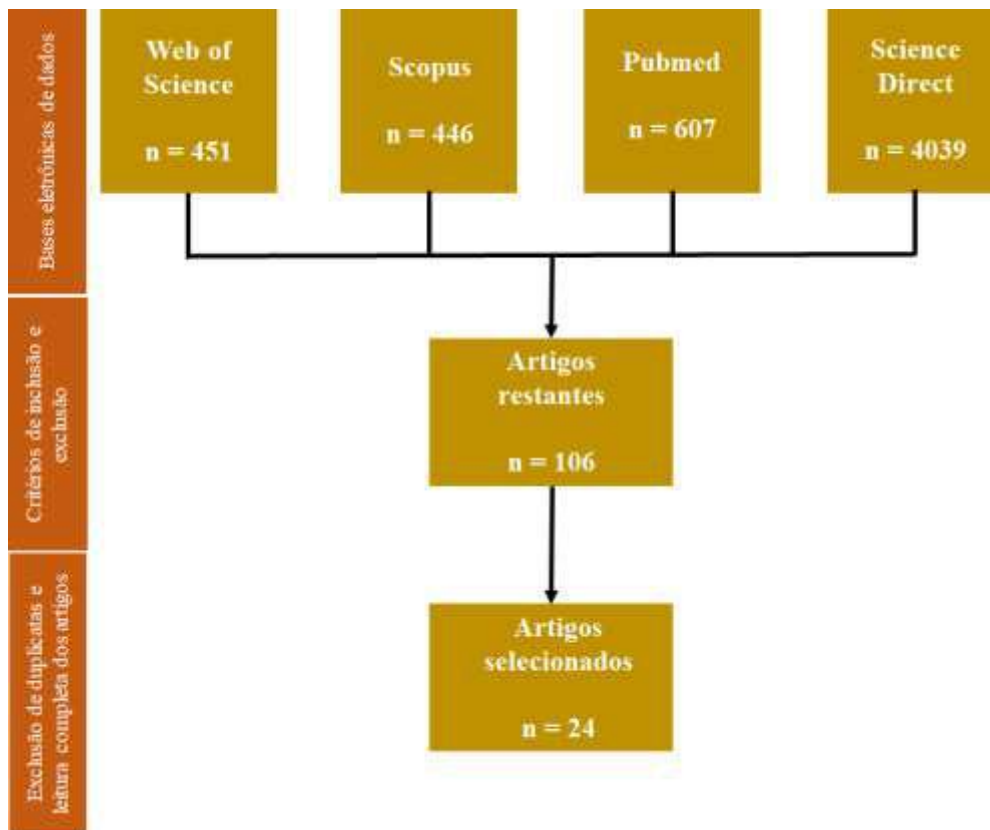
2. Metodologia

O presente trabalho trata-se de uma revisão narrativa, sobre os temas relacionados com propriedades multifuncionais dos hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora. As informações foram adquiridas com base em uma extensa pesquisa bibliográfica nas seguintes bases de dados eletrônicas: Web of Science, Scopus, Pubmed, Science Direct e Google Acadêmico. Para a busca de artigos científicos, selecionaram-se as palavras-chave “proteínas vegetais”, “abóboras”, “sementes de abóbora”, “resíduos agroindustriais”, “proteínas de sementes de abóbora”, “propriedades técnico-funcionais de proteínas de sementes de abóbora” e “propriedades biológicas de proteínas de sementes de abóbora”.

Os critérios adotados para a seleção dos artigos incluíram estudos publicados em inglês, predominando aqueles publicados nos últimos 15 anos. Além disso, para evitar possíveis fontes de viés e com base no objetivo do estudo, foram utilizados critérios de inclusão/exclusão e eliminação de duplicatas para elegibilidade.

Os resultados da revisão narrativa foram apresentados no fluxograma ilustrado na Figura 1. Inicialmente, foram identificados 5543 artigos, dos quais 451 artigos no Web of Science, 446 no Scopus, 607 no Pubmed e 4039 no Science Direct. Após os critérios de inclusão/exclusão e eliminação de duplicatas, a amostra final foi de 28 artigos.

Figura 1 – Fluxograma referente a busca de dados.



Fonte: Elaborada pelos autores.

3. Resultados e Discussão

3.1 Composição das sementes de abóbora e suas proteínas

As abóboras pertencem à família Cucurbitaceae (Rahman et al., 2019) e sua produção se destaca no Brasil e em diversos outros países (Mitić et al., 2018). Embora existam diversas variedades cultivadas em todo o mundo, as espécies comercialmente mais importantes são a *Cucurbita pepo*, *C. maxima*, *C. moschata*, *C. mixta* e *C. stilbo* (Rezig et al., 2013; Bučko et al., 2015). Durante a sua industrialização, principalmente pelas indústrias de doces, grande quantidade de resíduos são gerados, constituídos principalmente de sementes e cascas. Estes geralmente são descartados, fato que requer o desenvolvimento de alternativas para a sua utilização sustentável, agregando valor aos produtos obtidos (Vale et al., 2019).

As sementes representam 5% do peso total da abóbora e sua composição varia dependendo de fatores como espécie, variedade, localização e clima. A Tabela 1 apresenta a composição centesimal média de sementes de abóbora descrita em alguns estudos (Lazos, 1986; Amo et al., 2004; Alfawaz, 2006; Rezig et al, 2012).

Tabela 1. Composição centesimal média de sementes de abóbora.

Componente	Valores médios em 100g de semente			
	Lazos, 1986	Amo et al., 2004	Alfawaz, 2006	Rezig, et al., 2012
Umidade (%)	5,40	3,08	5,97	8,46
Energia (kcal)	676	628	453	455
Proteínas brutas (g)	32,3	14,31	39,25	33,92
Gordura Bruta (g)	45,4	52,13	27,83	31,57
Carboidratos (g)	5,55	24,45	11,48	0,11
Fibra Bruta (g)	12,1	2,55	16,84	21,97
Cinzas totais (mg)	4,65	3,60	4,59	3,97

Fonte: Lazos, (1986); Amo et al., (2004); Alfawaz, (2006); Rezig et al, (2012).

Em relação as proteínas, nas sementes de abóbora, a maior fração proteica é representada pelas globulinas 12S (Blagrove & Lilley, 1980; Marcone, 1999). As globulinas 12S das sementes de abóbora são também chamadas de cucurbitinas e são homólogas às relatadas em sementes de leguminosas, como as proteínas de soja (Rezig et al., 2013; Yang et al., 2019). A molécula de globulinas 12S tem uma massa molar de 325 kDa e é composta por seis subunidades semelhantes de massa molar igual a 54 kDa. Estas subunidades, por sua vez, contêm duas cadeias polipeptídicas (massas molares de aproximadamente 33 kDa e 22 kDa, respectivamente) que interagem entre si por meio de ligações dissulfeto (Colman et al., 1980; Marcone et al., 1998). As globulinas 12S são acompanhadas por albuminas 2S e essas duas frações proteicas juntas compõem 59% do teor de proteína bruta em sementes de abóbora (Fruhworth & Hermetter, 2007; Yang et al., 2019). Além disso, pequenas quantidades de globulinas 18S foram detectadas, as quais provaram ser um dímero dos componentes 12S (Blagrove & Lilley, 1980; Yang et al., 2019).

As proteínas têm uma série de funções no desenvolvimento saudável da população, principalmente em relação ao fornecimento de aminoácidos essenciais para a nutrição humana (Devi et al., 2018). Neste sentido, o fornecimento dietético de aminoácidos essenciais em quantidade e qualidade adequados é igualmente importante para as funções fisiológicas do corpo humano. No caso das proteínas de sementes de abóbora, estas apresentam quase todos os aminoácidos essenciais e que desempenham papéis importantes tanto como unidades de construção proteica quanto como intermediários no metabolismo (Asiegbu, 1987; Rezig et al., 2013; Amin et al., 2019). A composição média de aminoácidos das proteínas de sementes de abóbora é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Perfil de aminoácidos (g/100 g) em sementes de abóbora.

Aminoácido	Valor nutricional (g/100 g)
Alanina	0,74 - 6,9
Arginina	1,70 - 23,10
Ácido aspártico	2,05 - 2,70
Cistina	0,40 - 6,40
Ácido glutâmico	3,50 - 3,73
Glicina	1,50 - 6,80
Histidina	0,80 - 3,00
Isoleucina	0,81 - 4,90
Leucina	2,30 - 12,20
Lisina	1,50 - 4,00
Metionina	0,30 - 2,10
Fenilalanina	1,30 - 8,20
Prolina	1,70 - 5,00
Serina	0,64 - 7,40
Treonina	0,83 - 3,40
Triptofano	0,60
Tirosina	0,83 - 4,30
Valina	1,36 - 6,70

Fonte: Asiegbu, (1987); Rezig et al., (2013); Amin et al., (2019).

3.2 Propriedades técnico-funcionais de proteínas de sementes de abóbora

As proteínas vegetais são consideradas as fontes mais baratas e abundantes de proteínas, sendo também a melhor alternativa em substituição às proteínas animais (Du et al., 2012; Muhamyankaka et al., 2013). Nos últimos anos, tem crescido o interesse da comunidade científica por estudos relacionados a utilização de proteínas vegetais como ingredientes na alimentação, bem como a exploração das propriedades técnico-funcionais dessas proteínas. Esse movimento tem sido impactado por diversos fatores, dentre eles: redução de custos, demandas dietéticas religiosas, mudanças relacionadas a estilos de vida (vegetarianos e veganos) e pessoas com restrição de consumo à proteínas de origem animal (Aiking, 2011; Singh et al., 2014; Tovar-Pérez et al., 2019). Somado a isso, segundo as perspectivas da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO (2015), em 2024 a população mundial será superior a 7,8 bilhões de pessoas e estima-se que em 2050 este número chegue a 9,7 bilhões, o que equivale a uma taxa de crescimento populacional de 1,18% ao ano (Grande & Cren, 2016).

As proteínas de sementes de abóbora apresentam uma estrutura semelhante à das globulinas das sementes de leguminosas (Bučko et al., 2015). Essa semelhança indica que o isolado proteico de sementes de abóbora tem propriedades técnico-funcionais comparativas às das proteínas de sementes de leguminosas, como capacidade emulsificante, espumante e gelificante (Yang et al., 2019). Por outro lado, pesquisas sobre as propriedades técnico-funcionais das proteínas de sementes de abóbora ainda estão em estágio primário, predominando estudos relacionados somente à sua solubilidade, porém ainda escassos (Bucko et al., 2015; Rezig et al., 2013). Diversas alternativas têm sido utilizadas para melhorar a solubilidade e outras propriedades técnico-funcionais destas proteínas, como a emulsificação e a formação de espuma, de modo a aumentar o seu potencial de aplicação na indústria de alimentos. Dentre as alternativas, a hidrólise enzimática visando à geração de hidrolisados a partir das proteínas nativas apresenta-se como uma estratégia promissora (Bučko et al., 2016).

Os hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora podem desempenhar propriedades técnico-funcionais melhoradas em relação às proteínas nativas, aumentando as opções de uso nos diversos segmentos do setor alimentício. Bučko et al. (2016) estudaram a influência da hidrólise enzimática na solubilidade, propriedades interfaciais e emulsificantes do isolado proteico de sementes de abóbora (IPSA). Com a hidrólise enzimática, a solubilidade dos hidrolisados de IPSA aumentou em relação à IPSA nativa no intervalo de pH avaliado. A investigação tensiométrica mostrou que IPSA e seus hidrolisados adsorveram nas interfaces da solução ar-proteína e da solução óleo-proteína em todo o pH (3-8) e força iônica (0 -

1 mol dm⁻³ NaCl) testados. Isso foi evidenciado devido ao aumento na tensão interfacial após um aumento na concentração de proteína em solução. IPSA nativa não apresentou capacidade emulsificante nas condições avaliadas, porém os seus hidrolisados apresentaram capacidade emulsificante independentemente do pH e da força iônica.

Aliado ao incremento técnico-funcional proporcionado, os hidrolisados contêm peptídeos que podem desempenhar propriedades potencialmente biológicas como antioxidante, anti-hipertensivo e antidiabética (Vaštag et al., 2011; Venuste et al., 2013; Vaštag et al., 2014; Nourmohammadi et al. 2017). Esses peptídeos são denominados como “peptídeos bioativos” e são geralmente compostos de 2 a 20 resíduos de aminoácidos (Martines-Villaluenga et al., 2017; Karami & Akbari-Adergani, 2019).

3.3 Métodos para obtenção de hidrolisados e peptídeos a partir da proteína nativa

A escolha do método de hidrólise proteica influencia na geração de diferentes hidrolisados e peptídeos com distintas propriedades técnico-funcionais e biológicas (Magalhães et al., 2022). Estas propriedades estão relacionadas diretamente à estrutura primária, tamanho e conformação molecular dos hidrolisados e peptídeos obtidos (Magalhães et al., 2022). Além disso, uma única sequência peptídica pode ser capaz de exercer diferentes propriedades técnico-funcionais e/ou potencialmente biológicas (Karami & Akbari-Adergani, 2019). Existem diversos métodos que podem ser utilizados para obtenção de hidrolisados e peptídeos bioativos de proteínas, como por exemplo: a) digestão humana, b) fermentação utilizando-se culturas microbianas, c) hidrólise química e d) hidrólise enzimática (Karami & Akbari-Adergani, 2019; Chourasia et al., 2020).

A digestão humana ocorre naturalmente, na qual a liberação de hidrolisados e peptídeos inicia-se na boca, onde proteínas maiores são hidrolisadas em frações menores (Angelis et al., 2017). Posteriormente, ocorre a digestão gástrica: o estômago libera ácido clorídrico e pepsina para a digestão química/enzimática das proteínas, levando à liberação de polipeptídeos que se movem para o intestino delgado, onde o pâncreas secreta as enzimas como tripsina, quimotripsina (Mejia & Lumen, 2006; Angelis et al., 2017). Estas irão hidrolisar os polipeptídeos em peptídeos menores e/ou aminoácidos. Por fim, esses pequenos peptídeos são absorvidos pela corrente sanguínea, possibilitando que exerçam efeitos sistêmicos ou locais nos tecidos-alvo (Mejia & Lumen, 2006; Angelis et al., 2017).

A fermentação é um método eficiente e barato para a produção de hidrolisados e peptídeos por meio da atividade microbiana ou atividade enzimática microbiana (Cabanos et al., 2021). A fermentação envolve a incubação de microrganismos específicos que secretam proteases em condições ambientais definidas quanto a variáveis como temperatura, pH, potencial de oxirredução e substrato (Sanjukta & Rai, 2016; Cabanos et al., 2021). Estas proteases microbianas são capazes de hidrolisar proteínas alimentares e, assim, produzir hidrolisados e peptídeos (Sanjukta et al., 2015). À medida que as enzimas proteolíticas microbianas hidrolisam as proteínas em função da sua especificidade, são produzidos hidrolisados com diferentes tamanhos, sequências e propriedades químicas e físicas (Sanjukta & Rai, 2016). A natureza do substrato proteico, a especificidade das enzimas proteolíticas utilizadas e as condições de processamento (pH, tempo, temperatura e agitação) são fatores que influenciam consideravelmente a composição de aminoácidos dos hidrolisados (Cabanos et al., 2021).

Outro método para obtenção de hidrolisados e peptídeos é a hidrólise química, que pode ser ácida ou básica (Posorske, 1984). Apesar de ser altamente eficiente na geração de hidrolisados, a hidrólise química tem um alto custo operacional devido às elevadas temperatura e pressão (Posorske, 1984). Além disso, possui baixa especificidade com formação de produtos indesejáveis, necessitando-se de etapas posteriores de purificação (Castro et al., 2004) ou limitando as aplicações em produtos alimentícios. Assim, tem-se usado a hidrólise enzimática em substituição à hidrólise química (Posorske, 1984).

A hidrólise enzimática é um dos métodos mais utilizados para obtenção de hidrolisados e peptídeos (Magalhães et al., 2022). As enzimas são biomoléculas que atuam como catalisadores de reações bioquímicas e desempenham um importante papel em diversos processos industriais (Wang et al., 2018). Elas aumentam a taxa das reações ao reduzir a energia de ativação

necessária para converter os substratos em produtos sem alterar o equilíbrio químico (Wang et al., 2018).

As proteases são uma classe de enzimas que possuem grande importância na obtenção de hidrolisados e peptídeos a partir de proteínas nativas (Wang et al., 2018). Este método consiste na hidrólise da ligação peptídica entre aminoácidos específicos das proteínas, produzindo hidrolisados de vários tamanhos e diferentes estruturas primárias (Agyei et al., 2016; Wang et al., 2018). Consequentemente, a hidrólise proteica leva a um aumento dos grupos amino e carboxílico ionizáveis e permite a exposição de grupos hidrofóbicos, alterando as propriedades técnico-funcionais das proteínas nativas (Agyei et al., 2016).

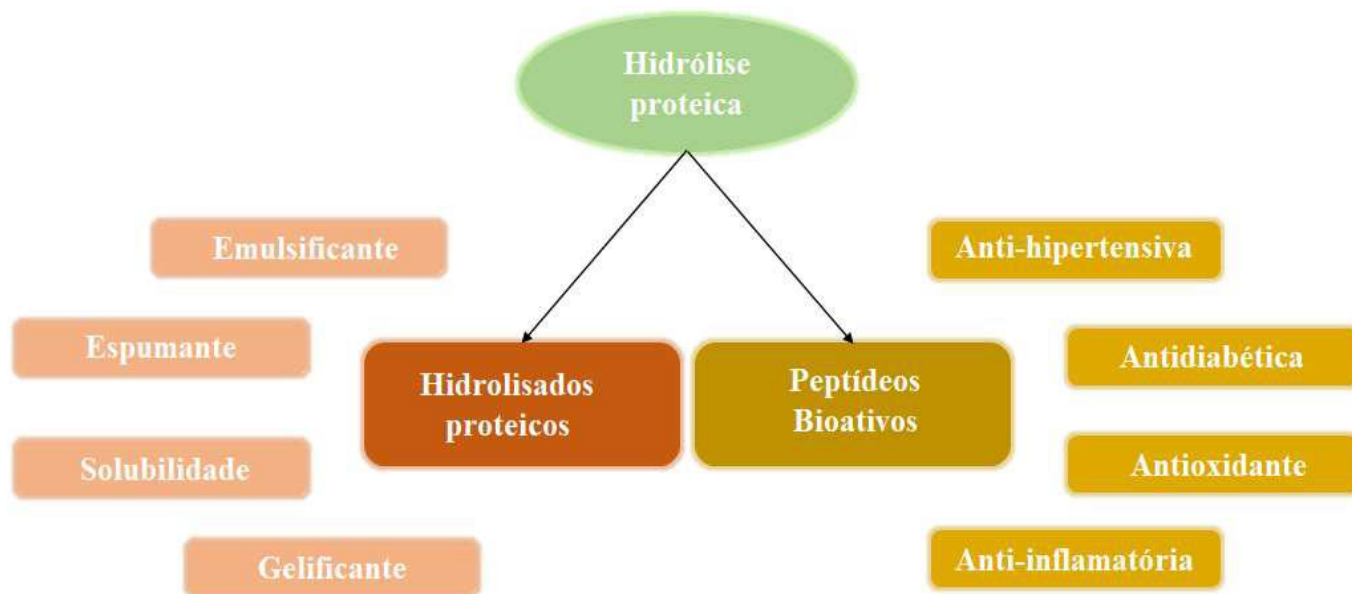
Diferentes proteases podem ser aplicadas no processo de hidrólise, as quais podem ser classificadas de acordo com sua origem (animal, vegetal ou microbiana), tipo de reação catalítica (endo ou exopeptidases) e natureza química do sítio catalítico (Aguilar & Sato, 2018; Wang et al., 2018). As endopeptidases hidrolisam as ligações peptídicas no interior da proteína, enquanto as exopeptidases atuam nas extremidades (Muri, 2014; Aguilar & Sato, 2018). A natureza do sítio catalítico define a classificação das proteases em serina, cisteína, aspárticas, glutâmico ou metaloproteínas, dependendo do tipo de aminoácido ou íon metálico presente no seu sítio ativo (Sumantha et al., 2006; Muri, 2014; Aguilar & Sato, 2018).

Dentre as enzimas proteolíticas utilizadas destacam-se a pepsina, tripsina, bromelina e papaína, além das comerciais tais como Alcalase®, Neutrase®, Protamex® e Flavourzyme® (Muri, 2014; Aguilar & Sato, 2018; Wang et al., 2018). O tipo de protease utilizada é fundamental, pois estabelece os padrões de hidrólise das ligações peptídicas, determinando diretamente o grau de hidrólise juntamente às condições do processo (Shahiidi & Zhong, 2008). A especificidade das enzimas no substrato também irá influenciar o grau de hidrólise, estando relacionada com os aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada e àqueles adjacentes a ela (Santos & Koblitz, 2008). Por exemplo, a Alcalase® é uma endopeptidase com ampla especificidade e preferência por resíduos não carregados, como Ser, Thr, Asp e Glu (Markland & Smith, 1971). Já a Flavourzyme® é uma mistura natural complexa de diferentes endo e exopeptidases sem especificidade na hidrólise de ligações peptídicas (Blinkovsky et al., 1999). A hidrólise enzimática também pode ser melhorada usando as condições ótimas de pH e temperatura das proteases, visando um maior rendimento na obtenção de peptídeos bioativos.

3.4 Propriedades multifuncionais dos hidrolisados e peptídeos de proteínas de sementes de abóbora

Os hidrolisados e peptídeos oriundos de proteínas são ingredientes de interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica ao serem utilizados para melhoria da qualidade dos produtos e promoção da saúde humana (Wang et al., 2018; Magalães et al., 2022). A Figura 2 apresenta as principais propriedades multifuncionais desempenhadas por hidrolisados e peptídeos derivados de proteínas alimentares.

Figura 2 – Propriedades técnico-funcionais e bioativas de hidrolisados e peptídeos, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelos autores (2022).

As propriedades técnico-funcionais dos hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora, bem como as propriedades potencialmente bioativas dos peptídeos obtidos por hidrólise enzimática, foram até o momento pouco exploradas, sendo os trabalhos apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Propriedades técnico-funcionais e biológicas de hidrolisados e peptídeos de proteínas de sementes de abóbora obtidos pela ação de proteases.

Substrato	Enzima	Propriedades	Referência
Proteína isolada	Alcalase®; Pepsina	Solubilidade e Capacidade emulsificante	Bučko et al. (2016)
Cucurbitina	Alcalase®; Flavourzyme®; Pepsina	Solubilidade, Capacidade emulsificante, espumante e ligação ao óleo. Atividade antioxidante (<i>in vitro</i>)	Popovic et al. (2013)
Proteína isolada	Alcalase®; Flavourzyme®; Uso sequencial (Alcalase® + Flavourzyme®)	Atividade inibidora da ECA e antioxidante (<i>in vitro</i>)	Vaštag et al. (2011)
Proteína isolada	Alcalase®; Tripsina	Atividade antioxidante (<i>in vitro</i>)	Nourmohammadi et al. (2017)
Proteína isolada	Alcalase®; Flavourzyme®; Protamex®; Neutrase®	Atividade antioxidante (<i>in vitro</i>)	Venuste et al. (2013)
Cucurbitina	Alcalase®; Pepsina	Atividade inibitória da ECA, antioxidante e α – amilase (<i>in vitro</i>)	Vaštag et al. (2014)

Fonte: Autores.

Bučko et al. (2016) observaram que os hidrolisados do isolado proteico de sementes de abóbora (IPSA) obtidos pela ação da Alcalase® e pepsina apresentaram solubilidade e propriedades emulsificantes maiores em comparação com a proteína nativa em toda a faixa de pH avaliada, especialmente na região de pH próxima ao pI. A solubilidade dos hidrolisados de Alcalase® e pepsina foi menos dependente do pH em comparação com IPSA, ou seja, na faixa de 60% a 76% para hidrolisados de Alcalase® e superior a 90% para hidrolisados de pepsina. Os efeitos da força iônica na solubilidade dos

hidrolisados de Alcalase® e pepsina também foram avaliados. Neste caso, os hidrolisados de Alcalase® tiveram menor influência da força iônica quando comparado aos hidrolisados de pepsina. Ressaltou-se também a presença de peptídeos relativamente maiores em todos os hidrolisados (14-20, 24 e 36 kDa), os quais devem ser responsáveis pelas excelentes propriedades emulsificantes obtidos.

Popović et al. (2013) observaram que a solubilidade dos hidrolisados de cucurbitina obtidos pelas enzimas Alcalase®, Flavourzyme®; Pepsina, foi maior em comparação com a proteína nativa dentro da faixa de pH estudada. A melhor atividade de emulsão e índice de estabilidade ($AE = 143,28 \pm 3,05 \text{ m}^2/\text{g}$ e $IE = 87,5 \pm 1,96 \text{ min}$) foi dos hidrolisados obtidos pela enzima Flavourzyme® enquanto que a Alcalase® produziu hidrolisados com a melhor capacidade de formação de espuma ($CFE = 242 \pm 3,21$). Além disso, os hidrolisados obtidos por Alcalase® e pepsina apresentaram poder redutor e atividade de eliminação de cátions do radical $ABTS^+$, enquanto os hidrolisados de Flavourzyme® não demonstraram essas atividades. O poder redutor de Fe^{3+} e a atividade de eliminação de cátions do radical $ABTS^+$ do hidrolisado de cucurbitina foram positivamente relacionados ao grau de hidrólise (DH). A maior atividade antioxidante foi encontrada no hidrolisado obtido por Alcalase® a DH 25,6 % (poder redutor de Fe^{3+} de $0,25 \pm 0,01 \text{ A700 nm}$ e atividade sequestrante de ABTS de $3,34 \pm 0,02 \text{ mmol/L}$ coeficientes antioxidantes equivalentes de Trolox (TEAC)).

Vaštag et al. (2014) observou que o uso de diferentes enzimas na hidrólise de curcubitina não afetou significativamente a atividade de eliminação de cátions do radical $ABTS^+$ ($3,3 \text{ mmol L}^{-1}$ Trolox para os hidrolisados de Alcalase® e $3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ para os hidrolisados de pepsina). No entanto, comprovou-se que o poder redutor de Fe^{3+} dos hidrolisados de Alcalase® foi quase duas vezes maior do que os hidrolisados de pepsina ($A_{\lambda=700 \text{ nm}}$ de cerca de 0,25 e cerca de 0,14, respectivamente). Ambos os hidrolisados de Alcalase® e pepsina provaram também ter atividade inibitória da ECA e atividade inibitória de α -amilase, com valores aparentes de IC_{50} de 0,0244 mg e 0,0445 mg atividade inibitória da ECA, respectivamente e uma redução de até 30% na atividade inibitória de α -amilase. Os hidrolisados obtidos por meio da ação da pepsina demonstraram inibição da α -amilase ligeiramente maior do que os hidrolisados da Alcalase®, em todas as concentrações de proteína estudadas ($0,5 - 2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Venuste et al. (2013) observou que o uso de diferentes enzimas (Alcalase®, Flavourzyme®, Protamex®, Neutrase®) usadas na hidrólise de proteínas de sementes de abóbora levou a obtenção de hidrolisados com atividade de eliminação de radicais DPPH, poder redutor de Fe^{3+} e capacidade quelantes de Fe^{2+} . A 10 mg mL^{-1} , os hidrolisados aumentaram as atividades de eliminação de radicais DPPH (de 21,89% para 85,27% para Flavourzyme®) e o poder redutor de Fe^{3+} (de Abs 700nm 0,21 para 0,48 para Flavourzyme®). A 1 mg mL^{-1} , a capacidade quelantes de Fe^{2+} (de 30,50% para 80,03% para Flavourzyme®) também foi melhorada. Os hidrolisados também mostraram melhores capacidades para suprimir ou retardar a peroxidação lipídica em um sistema modelo de ácido linoleico.

Vaštag et al. (2011) observaram que os hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora obtidos pelas enzimas Alcalase® e Flavourzyme® isoladas e em combinação, apresentaram atividade de eliminação de cátions do radical $ABTS^+$ e o poder redutor de Fe^{3+} . Os hidrolisados de Alcalase® apresentaram atividade de eliminação de cátions de radical $ABTS^+$ significativamente maior ($7,59 \pm 0,08 \text{ mM Trolox mg}^{-1}$) do que os hidrolisados de Flavourzyme® ($3,27 \pm 0,19 \text{ mM Trolox mg}^{-1}$). Além disso, comprovou-se o poder redutor de Fe^{3+} dos hidrolisados de Alcalase®, com valores máximos de $A_{\lambda=700 \text{ nm}}$ oscilando entre $0,33 \pm 0,03$ e $0,38 \pm 0,04$. Além disso, os hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora apresentaram potencial bioativo para a atividade inibidora da ECA. Os hidrolisados obtidos pela ação da enzima Alcalase® apresentaram maior atividade inibidora da ECA $71,1 \pm 7,5\%$ ($IC_{50} = 0,422 \text{ mg.mL}^{-1}$) em comparação com os hidrolisados obtidos pela ação da Flavourzyme®, que apresentaram atividade inibidora da ECA de $55,8 \pm 6,2\%$.

Nourmohammadi et al. (2017) observou que os hidrolisados de Alcalase® (tamanho de peptídeo $< 6,5 \text{ kDa}$) atingiram um máximo valor de 90% de atividade de eliminação de radicais DPPH enquanto os hidrolisados de tripsina atingiram um

valor máximo de 78%. Além disso, os hidrolisados de Alcalase® exibiram propriedades antioxidantes totais e atividade quelante de metais (Fe^{2+}) significativamente melhores do que os hidrolisados de tripsina.

A Tabela 4 apresenta um resumo dos resultados dos trabalhos relacionados às propriedades técnico-funcionais dos hidrolisados de proteínas de sementes de abóbora, bem como às propriedades bioativas dos peptídeos obtidos por hidrólise enzimática.

Tabela 4. Propriedades técnico-funcionais e biológicas de hidrolisados e peptídeos de proteínas de sementes de abóbora obtidos pela ação de proteases.

Referência	Condições enzimáticas e de hidrólise	Principais resultados
Nourmohammadi et al. (2017)	Alcalase® (5%) e tripsina (5%) na razão E/S de 1%, 1,5% e 2%. A hidrólise foi realizada por 2; 3,5; e 5 h sob temperaturas de hidrólise de 45, 50 e 55°C para Alcalase® e 35, 40 e 45°C para tripsina.	Os hidrolisados de Alcalase® exibiram atividade de eliminação de radicais DPPH, propriedades antioxidantes totais e atividade quelante de metais (Fe^{2+}) significativamente melhores do que os hidrolisados de tripsina.
Bučko et al. (2016)	Alcalase® e pepsina na razão E/S de 0,5 ml/g e 0,02 g/g, respectivamente. A hidrólise pela Alcalase® foi realizada à 50 °C por 30 min enquanto que da pepsina foi realizada a 37 °C por 90 min.	A solubilidade de ambos os hidrolisados (obtidos pela ação da Alcalase® e pepsina) foi maior do que a solubilidade da amostra não hidrolisada, especialmente em pH próximo ao pI. O desempenho emulsificante das proteínas foi dependente do pH e da força iônica, enquanto ambos os hidrolisados, estabilizaram emulsões com sucesso independente do pH e força iônica.
Vaštag et al. (2014)	Alcalase® e pepsina na razão E/S de 0,02 g/g. A hidrólise pela Alcalase® foi realizada à 50 °C, pH 8,00 e concentração de NaCl de 40 mg/ml, e para pepsina a pH 3,00 e temperatura de 37°C. Ambos por 60 min.	Ambos os hidrolisados de Alcalase® e pepsina apresentaram maiores valores para atividade de eliminação de cátions do radical ABTS ⁺ , poder redutor de Fe^{3+} , atividade inibitória da ECA e atividade inibitória de α -amilase.
Venuste et al. (2013)	Razão E/S de 1% para todas as enzimas. A hidrólise pela Alcalase® foi realizada à 55 °C e à 50 °C para Flavourzyme®, Protamex® e Neutrase®.	Os hidrolisados obtidos por Alcalase®, Flavourzyme®, Protamex® e Neutrase® apresentaram atividade de eliminação de radicais DPPH, poder redutor de Fe^{3+} e capacidade quelantes de Fe^{2+} , além de melhores capacidades para suprimir ou retardar a peroxidação lipídica em um sistema modelo de ácido linoleico.
Vaštag et al. (2011)	Alcalase® e Flavourzyme® nas razões E/S de 1/757 g/g, 1/385 g/g e 1/250 g/g. Para ambas as enzimas a hidrólise foi realizada à 50 °C por 60 min. Para a hidrólise com enzimas combinadas, Alcalase® (E/S 1/250 g/g) foi usada nos primeiros 60 min e então, Flavourzyme® foi adicionado (E/S 1/385 g/g) e a hidrólise prolongada até 120 min.	Os hidrolisados de Alcalase® e Flavourzyme® isoladas e em combinação, apresentaram atividade de eliminação de cátions do radical ABTS ⁺ , poder redutor de Fe^{3+} e atividade inibidora da ECA.

Fonte: Autores.

3.5 Perspectivas futuras e desafios

Conforme dito anteriormente, as proteínas de sementes de abóbora apresentam baixa solubilidade em intervalo de pH de 4,0-6,0, o que é uma característica comum para proteínas vegetais. Além disso, foi mostrado que a hidrólise dessas proteínas pode potencializar as propriedades técnico-funcionais em relação à proteína nativa. Por outro lado, existem outras alternativas que têm sido exploradas e se apresentam promissoras para melhorar a solubilidade e outras propriedades técnico-funcionais de proteínas vegetais. Dentre essas alternativas, encontram-se as tecnologias não convencionais, como por exemplo ultrassom (Flores-Jiménez et al., 2019; Omura et al., 2021; Lo et al., 2022; Sha et al., 2022), micro-ondas (Ertugrul et al.; 2021;

Huang et al., 2022), alta pressão hidrostática (Liu et al., 2020; Liu et al., 2022) e homogeneização de alta pressão (Guo et al., 2021; Zhang et al., 2022; Melchior et al., 2022).

Du et al. (2022) estudaram o efeito do tratamento ultrassônico de alta intensidade nas propriedades físico-químicas, estruturais, reológicas e funcionais de isolados proteicos de sementes de abóbora. Os resultados mostraram que o ultrassom (US) transformou os agregados de isolados proteicos de sementes de abóbora (IPSA) em agregados menores e com distribuição mais uniforme, o que teve um efeito significativo na cromaticidade e turbidez dos IPSAs. O aumento da potência do US também aumentou a hidrofobicidade da superfície do IPSA, o que foi benéfico para melhorar a capacidade espumante do IPSA.

Em condições otimizadas a aplicação dessas tecnologias, além de melhorar as propriedades técnico-funcionais das proteínas, podem ser usadas em combinação com processos enzimáticos visando maximizar a catálise enzimática e, assim, obter hidrolisados e peptídeos com melhores propriedades (Leite Júnior et al., 2015; Guan et al., 2018; Leite Júnior et al., 2019; Soares et al., 2019; Soares et al., 2020; Carullo et al., 2020; Carullo et al., 2021; Dong et al., 2021; Tian et al., 2022; Magalhães et al., 2022). Na literatura científica, não foram encontrados estudos sobre a aplicação de tecnologias físicas que objetive potencializar a hidrólise enzimática das proteínas de sementes de abóbora. Por outro lado, pesquisas com outras proteínas vegetais têm apresentado resultados promissores (Fathi et al., 2021; Zhou et al., 2017).

Em relação ao potencial bioativo dos hidrolisados das proteínas das sementes de abóbora, os estudos foram focados na avaliação *in vitro* e, portanto, não são conclusivos sobre os resultados *in vivo*. Assim, são necessários realizar outros trabalhos com foco em ensaios clínicos para comprovar as propriedades biológicas destes peptídeos. Além disso, são necessários estudos que investiguem os riscos quanto à alergenicidade e toxicidade dos hidrolisados e peptídeos obtidos.

4. Considerações Finais

O aumento do interesse da comunidade científica acerca das proteínas vegetais tem contribuído para a exploração de novas fontes proteicas, como as sementes de abóbora. Estas, que na maioria das vezes são descartadas ou usadas na alimentação humana, apresentam expressivo teor proteico, o que estimula sua aplicação na indústria de alimentos.

Pesquisas sobre as propriedades técnico-funcionais das proteínas de sementes de abóbora ainda são insipientes, predominando estudos relacionados somente à sua solubilidade. Dentre as alternativas utilizadas para melhorar a solubilidade e outras propriedades técnico-funcionais destas proteínas (emulsificação e formação de espuma, por exemplo), a hidrólise enzimática é utilizada estrategicamente para geração de hidrolisados proteicos com propriedades técnico-funcionais realçadas em comparação com a proteína nativa. Esse avanço amplia a utilização destas proteínas como ingredientes no desenvolvimento de produtos em diversos segmentos do setor alimentício.

Além disso, alguns estudos demonstraram que a hidrólise enzimática das proteínas da semente de abóbora contribui com a produção de peptídeos bioativos com diferentes atividades biológicas. Porém, esses estudos foram conduzidos apenas por meio de testes *in vitro*. Desta forma, pesquisas com ênfase em ensaios clínicos devem ser realizadas a fim de comprovar as bioatividades desses peptídeos.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Viçosa (Departamento de Tecnologia de Alimentos), Instituto de Laticínios Cândido Tostes – EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) e Universidade Estadual de Campinas (Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade a B.R.C. Leite Júnior (nº306514/2020-6) e a A.A.L. Tribst (nº305050/2020-6), a Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Código de Financiamento 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ-00388-2).

Referências

- Aguilar, J. G. dos S., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253-262.
- Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., & Danquah, M. K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioprocess Processing*, 98, 244-256.
- Aiking, H. (2011). Future protein supply. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 112-120.
- Alfawaz, M. (2004). Chemical Composition and oil characteristics of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed kernels. *Food Science Agricultural and Research*, 129, 5-18.
- Amin, M. Z., Islam, T., Uddin, M.R., Uddin, M. J., Rahman, M. M., & Satter, M. A. (2019). Comparative study on nutrient contents in the different parts of indigenous and hybrid varieties of pumpkin (*Cucurbita maxima* Linn.). *Heliyon*, 5(9), e02462.
- Amo, I., Eleyinmi, A., Ilelaboye, N., & Akoja, S. (2004). Characterization of oil extracted from gourd (*Cucurbita maxima*) seed. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 2, 38-39.
- Angelis, E. de, Piloli, R., Bavaro, S. L., & Monaci, L. (2017). Insight into the gastro-duodenal digestion resistance of soybean proteins and potential implications for residual immunogenicity. *Food Function*, 8(4), 1599-1610.
- Asiegbu, J. E. (1987). Some biochemical evaluation of fluted pumpkin seed. *Food Science & Technology*, 40(2), 151-155.
- Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., Macfarlane, D. Patti, A. F., & Arora, A. (2017). Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry*, 225, 10-22.
- Blagrove, R., & Lilley, G. (1980). Characterisation of cucurbitin from various species of the *Cucurbitaceae*. *European Journal of Biochemistry*, 103, 577-584.
- Blinkovsky, A. M., Byun, T., Brown, K. M., & Golightly, E. J. (1999). Purification, Characterization, and Heterologous Expression in *Fusarium venenatum* of a Novel Serine Carboxypeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied And Environmental Microbiology*, 65(8), 3298-3303.
- Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Petrović, L., & Milinković, L. (2016). Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 60, 271-278.
- Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Vaštag, Z., Petrović, L., & Vučinić-Vasić, M. (2015). Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 609-615.
- Cabanos, C., Matsuoka, Y., & Maruyama, N. (2021). Soybean proteins/peptides: A review on their importance, biosynthesis, vacuolar sorting, and accumulation in seeds. *Peptides*, 143, 170598.
- Carullo, D., Donsi, F., & Ferrari, G. (2020). Influence of high-pressure homogenization on structural properties and enzymatic hydrolysis of milk proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 130, Article e109657.
- Carullo, D., Barbosa-Cánovas, G. V., & Ferrari, G. (2021). Changes of structural and techno-functional properties of high hydrostatic pressure (HHP) treated whey protein isolate over refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*, 137.
- Castro, H. F. de, Mendes, A. A., Santos, J. C. dos, & Aguiar, C. L. de. (2004). Modificação de óleos e gorduras por biotransformação, Modification of oils and fats by biotransformation. *Química Nova*, 27(1), 146-156.
- Chourasia, R., Phukon, L. C., Singh, S. P., Rai, A. K., & Sahoo D. (2020). Chapter 15 - Role of enzymatic bioprocesses for the production of functional food and nutraceuticals, Editor(s): S. P. Singh, Pandey, A., Singhania, R. R., Larroche, C., & Li, Z. *Biomass, Biofuels, Biochemicals, Elsevier*, 309-334.
- Colman, P., Suzuki, E., & Van D. A. (1980). The structure of cucurbitin: subunit symmetry and organization in situ. *European Journal of Biochemistry*, 103, 585-588.
- Devi, N.M., Prasad, R. V., & Sagarika, N. (2018). A review on health benefits and nutritional composition of pumpkin seeds. *International Journal of Chemical Studies*, 6(3), 1154-1157.
- Dong, X., Wang, J., & Raghavan, V. (2021). Impact of microwave processing on the secondary structure, in-vitro protein digestibility and allergenicity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) proteins. *Food Chemistry*, 337, 127811.
- Santos, L. dos, & Koblitz, M. (2008). Proteases. In: Koblitz, M. *Bioquímica de alimentos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 242.
- Du, H., Zhang, J., Wang, S., Manyande, A., & Wang, J. (2022). Effect of high-intensity ultrasonic treatment on the physicochemical, structural, rheological, behavioral, and foaming properties of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.)-seed protein isolates. *LWT - Food Science and Technology*, 155, 112952.
- Du, Y., Jiang, Y., Zhu, X., Xiong, H., Shi, S., Hu, J., Peng, H., Zhou, Q., & Sun, W. (2012). Physicochemical and functional properties of the protein isolate and major fractions prepared from *Akebia trifoliata* var. *australis* seed. *Food Chemistry*, 133(3), 923-929.
- Ertugrul, U., Namli, S., Tas, O., Kocadagli, T., Gokmen, V., Sumnu, S. G., & Oztop, M. G. (2021). Pea protein properties are altered following glycation by

microwave heating. *LWT-Food Science and Technology*, 150, 111939.

Fathi, P., Moosavi-Nasab, M., Mirzapour-Kouhdasht, A., & Khalesi, M. (2021). Generation of hydrolysates from rice bran proteins using a combined ultrasonication-Alcalase hydrolysis treatment. *Food Bioscience*, 42, 101110.

Fava, F., Totaro, G., Diels, L., Reis, M., Duarte, J., Carioca, O. B., Poggi-Varaldo, H. M., & Ferreira, B. S. (2015). Biowaste biorefinery in Europe: opportunities and research & development needs. *New Biotechnology*, 32(1), 100-108.

Flores-Jiménez, N. T., Ulloa, J. A., Silvas J. E. U., Ramírez, J. C. R., Ulloa, P. R., Rosales, P. U. B., Carrillo, Y. S., & Leyva, R. G. (2019). Effect of high-intensity ultrasound on the compositional, physicochemical, biochemical, functional and structural properties of canola (*Brassica napus* L.) protein isolate. *Food Research International*, 121, 947-956.

Fruhwrth, G., & Hermetter, A. (2007). Seeds and oil of the styrian oil pumpkin: components and biological activities. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 1128-1140.

Grande, S. C.; & Cren, É. C. (2016). Demanda de proteínas vegetais: potencialidades e o diferencial dos farelos de Macaúba (REVISÃO). *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 2(3), 190–214, 26.

Guan, H., Diao, X., Jiang, F., Han, J. & Kong, B. (2018). The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates. *Food Chemistry*, 245, 89-96.

Guo, Z., Huang, Z., Guo, Y., Li, B., Yu, W., Zhou, L., Jiang, L., Teng, F., & Wang, Z. (2021). Effects of high-pressure homogenization on structural and emulsifying properties of thermally soluble aggregated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins. *Food Hydrocolloids*, 119, 106835.

Huang, K., Shi, J., Li, M., Sun, R., Guan, W., Cao, H., Guan, X., & Zhang, Y. (2022). Intervention of microwave irradiation on structure and quality characteristics of quinoa protein aggregates. *Food Hydrocolloids*, 130, 107677.

Ibrahim, H. R., Ahmed, A. S., & Miyata, T. (2017). Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *Journal of Advanced Research*, 8(1), 63–71.

Karami, Z.; & Akbari-adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 535–547.

Korhonen, H., & Pihlanto A. (2003). Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297–1308.

Lazos, E. (1986). Nutritional, fatty acid, and oil characteristics of pumpkin and melon seeds. *Journal of Food Science*, 51(5), 1382-1383.

Leite Júnior, B. R. C., Tribst, A. A. L., Ribeiro, L. R. & Cristianini, M. (2019). High pressure processing impacts on the hydrolytic profile of milk coagulants. *Food Bioscience*, 31, 100449.

Leite Júnior, B. R. C., Tribst, A. A. L. & Cristianini, M. (2015). Influence of high pressure homogenization on commercial protease from *Rhizomucor miehei*: Effects on proteolytic and milk-clotting activities. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 739-744.

Li-Chan, E. C. Y. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: Research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1(1), 28–37.

Liu, D., Zhang, L., Wang, Y., Li, Z., Wang, Z., & Han, J. (2022). Effect of high hydrostatic pressure on solubility and conformation changes of soybean protein isolate glycosylated with flaxseed gum. *Food Chemistry*, 333, 127530.

Liu, N., Lin, P., Zhang, K., Yao, X., Li, D., Yang, L., & Zhao, M. (2022). Combined effects of limited enzymatic hydrolysis and high hydrostatic pressure on the structural and emulsifying properties of rice proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 77, 102975.

Lo, B., Kasapis, S., & Farahnaky, A. (2022). Effect of low frequency ultrasound on the functional characteristics of isolated lupin protein. *Food Hydrocolloids*, 124, Part B, 107345.

Magalhães, I. S., Guimarães, A. D. B., Tribst, A. A. L., Oliveira, E. B., & Leite Junior, B. R. C. (2022). Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: Effects on hydrolysis kinetics and on the solubility and antioxidant activity of hydrolysates. *Food Research International*, 157, 111310.

Marcone, M. (1999). Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. *Food Research International*, 32, 79-92.

Marcone, M., Kakuda, Y., & Yada, R. (1998). Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants—I. Isolation/purification and characterization. *Food Chemistry*, 62, 27-47.

Markland, F. S., & Smith, E. L. (1971). 16 Subtilisins: Primary Structure, Chemical and Physical Properties, Editor(s): Paul D. Boyer. *The Enzymes*, Academic Press, 3, 561-608.

Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E.; & Frias, J. (2017). Bioactive Peptides in Fermented Foods. In: *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. [s.l.]: Elsevier, 23–47.

McCarthy, A., O'Callaghan, Y., & O'Brien, N. (2013). Protein Hydrolysates from Agricultural Crops—Bioactivity and Potential for Functional Food Development. *Agriculture*, 3(1), 112–130.

Mejia, E. de, & Lumen, B. de. (2006). Soybean bioactive peptides: a new horizon in preventing chronic diseases, sexuality. *Reproduction Menopause*, 4(2), 91-95.

- Melchior, S., Moreton, M., Calligaris, S., Manzocco, L., & Nicoli, M. C. (2022). High pressure homogenization shapes the techno-functionalities and digestibility of pea proteins. *Food and Bioproducts Processing*, 131, 77-85.
- Mitić, M., Pavlović, A., Tošić, S., Mašković P., Kostić, D., Mitić, S., Kocić, G. & Mašković, J. (2018). Optimization of simultaneous determination of metals in commercial pumpkin seed oils using inductively coupled atomic emission spectrometry. *Microchemical Journal*, 141, 197-203.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., & Parajó J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: a review. *Food Research International*. 39(9), 945–963.
- Muhamyankaka, V., Shoemaker, C.F., Nalwoga, M., & Zhang, X.M. (2013). Physicochemical properties of hydrolysates from enzymatic hydrolysis of pumpkin (*Cucurbita moschata*) protein meal. *International Food Research Journal*, 20(5), 2227-2240.
- Muri, E. M. F. (2014). Proteases virais: Importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos. *Química Nova*, 37(2), 308-316.
- Norfezah, M.N., Hardacre, A. & Brennan, C.S. (2011). Comparison of waste pumpkin material and its potential use in extruded snack foods. *Food Science and Technology International*, 17(4), 367-373.
- Nourmohammadi, E., Mahoonak, A.S., Alami, M., & Ghorbani. M. (2017). Amino acid composition and antioxidative properties of hydrolysed pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) oil cake protein. *International Journal of Food Properties*. 20(12), 3244-3255.
- Omura, M. H., Oliveira, A. P. H., Soares, L. S., Coimbra, J. S. R., Barros, F. A. R., Vidigal, M. C. T. R., Baracat-Pereira, M. C., & Oliveira, E. B. (2021). Effects of protein concentration during ultrasonic processing on physicochemical properties and techno-functionality of plant food proteins. *Food Hydrocolloids*, 113, 106457.
- Popović, L. M., Peričin, D. M., Vaštag, Ž. G. & Popović, Senka. (2013). Optimization of Transglutaminase Cross-linking of Pumpkin Oil Cake Globulin; Improvement of the Solubility and Gelation Properties. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 1105-1111.
- Posorske, L. H. (1984). Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(11), 1758-1760.
- Rahman, M. M., Juahir, H., Islam, M. H., Khandaker, M. M., Ariff, T. M., & Norsani W. M. (2019). Prophetic vegetable Pumpkin, Its impressive health benefits and total analysis. *Bioscience Research*, 16(4), 3987-3999.
- Rezig, L., Moncef, C., Kamel, M., & Salem, H. (2012). Chemical composition and profile characterization of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 82-87.
- Rezig, L., Chibani, F., Chouaibi, M., Dalgalarondo, M.I., Hessini, K., Guéguen, J., & Hamdi, S. (2013). Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed proteins: sequential extraction processing and fraction characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(32), 7715-7721.
- Sanjukta, S., & Rai, K. A. (2016). Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 1-10.
- Sanjukta, S., Rai, A. K., Muhammed, A., Jeyaram, K., & Talukdar, N. C. (2015). Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation. *Journal of Functional Foods*, 14, 650-658.
- Sarmadi, B. H.; & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956.
- Sha, L., & Xiong, Y. L. (2022). Comparative structural and emulsifying properties of ultrasound-treated pea (*Pisum sativum* L.) protein isolate and the legumin and vicilin fractions. *Food Research International*, 156, 111179.
- Shahidi, F.; & Zhong, Y. (2008). Bioactive Peptides. *Journal of AOAC International*, 91 (21), 14–31.
- Singh, B.P., Vij, S., & Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171-179.
- Soares, A. S., Augusto, P. E. D., Leite Júnior, B. R. C., Nogueira, C. A., Vieira, É. N. R., Barros, F. A. R., Stringheta, P.C., & Ramos, A. M. (2019). Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase: Investigation on substrate, enzyme and kinetics parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 107, 164-170.
- Soares, A. S., Leite Júnior, B. R. C., Tribst, A. A. L., Augusto, P. E. D., & Ramos, A. M. (2020). Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction. *LWT - Food Science and Technology*, 130, 109636.
- Sumantha, A., Larroche, C., & Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnolog*, 44(2), 211-220.
- Tian, S., Du, K., Yan, F., & Li., Y. (2022). Microwave-assisted enzymatic hydrolysis of wheat germ albumin to prepare polypeptides and influence on physical and chemical properties. *Food Chemistry*, 374, 131707.
- Tovar-Pérez, E.G., Lugo-Radillo, A., & Aguilera-Aguirre, S. (2019). Amaranth grain as a potential source of biologically active peptides: A review of their identification, production, bioactivity, and characterization. *Food Reviews International*, 35, 221-245.
- Vale, C. P. do, Loquete, F. C. C., Zago, M. G., Chiella, P. V., & Bernardi, D. M. (2019). Composição e propriedades da semente de Abóbora. *Fag Journal of Health (Fjh)*, 1(4), 79–90.
- Vaštag, Z.; Popović L.; & Popović S. (2014). Bioactivity evaluation of cucurbitin derived enzymatic hydrolysates. *International journal of agricultural and biosystems engineering*, 8, 445 – 448.
- Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., & Peričin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124(4), 1316-1321.

- Venuste, M., Zhang, X., Shoemaker, C.F., Karangwa, E., Abbas, S., & Kamdem, P.E. (2013). Influence of enzymatic hydrolysis and enzyme type on the nutritional and antioxidant properties of pumpkin meal hydrolysates. *Food and Function*, 4(5), 811–820.
- Wang, D., Yan, L., Ma, X., Wang, W., Zou, M., Zhong, J., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2018). Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 453-461.
- Yang, C., Wang, B., Wang, J., Xia, S., & Wu, Y. (2019). Effect of pyrogallol (1,2,3-benzenetriol) polyphenol-protein covalent conjugation reaction degree on structure and antioxidant properties of pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, 109, 443–9.
- Zhang, A., Wang, L., Song, T., Yu, H., Wang, X., & Zhao, X. (2022). Effects of high pressure homogenization on the structural and emulsifying properties of a vegetable protein: *Cyperus esculentus* L. *LWT-Food Science and Technology*, 153, 112542.
- Zhou, C., Hu, J., Yu, X., Yagoub, A. E. A., Zhang, Y., Ma, H., Gao, X., Out, P. N. Y. (2017). Heat and/or ultrasound pretreatments motivated enzymolysis of corn gluten meal: Hydrolysis kinetics and protein structure. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 488-496.