Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Efeito do hidrolisado proteico do grão de amaranto
(*Amaranthus cruentus* L. BRS Alegria) processado
na solubilização micelar do colesterol e na ação da
HMGR

Amanda Caroline Cardoso Corrêa Carlos Menezes

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação de
Nutrição em Saúde Pública para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Nutrição em
Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. José Alfredo
Gomes Arêas

São Paulo
2013

Efeito do hidrolisado proteico do grão de amaranto
(*Amaranthus cruentus* L. BRS Alegria) processado
na solubilização micelar do colesterol e na ação da
HMGR

Amanda Caroline Cardoso Corrêa Carlos Menezes

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação de
Nutrição em Saúde Pública para a
obtenção do título Mestre em
Ciências

Área de concentração: Nutrição em
Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. José Alfredo
Gomes Arêas

São Paulo
2013

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

Dedico aos meus pais Edmar e Silvia, pelo apoio e dedicação a
minha formação; ao meu marido Tiago, por dar continuidade
aos meus sonhos e minha filha Rafaela por preencher de
alegria a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao professor José Alfredo Gomes Arêas por me conceder a oportunidade para desenvolver o trabalho de pesquisa.

Às professoras Dra. Ursula M. Lanfer Marquez e Dra. Elizabeth Aparecida F. da Silva Torres, membros da banca examinadora, pelas contribuições durante a qualificação e pelas sugestões dadas para a finalização da dissertação.

Ao meu marido, que sempre ao meu lado me compreendeu nos momentos de ausência e me apoiou incondicionalmente na continuidade deste trabalho.

Aos meus pais que se sacrificaram e se empenharam pela minha formação, e sempre me incentivaram a buscar o melhor.

Aos meus irmãos Marília, Fernanda e Pedro por estarem presentes quando precisei de auxílio acadêmico ou atenção para minha filha.

Aos colegas de laboratório, Cíntia, Camila, Bianka, Jéssica, Marcelo, Nara Letícia, Rosana, Gustavo e Mariana pela amizade, pelos momentos de descontração e pela ajuda fornecida em algum momento deste processo.

Especialmente, agradeço ao Gustavo, à técnica Rosana, ao Marcelo e a Camila pela disposição em ajudar na parte experimental, principalmente durante minha licença maternidade, e pelos conselhos dados.

Às amigas que conheci durante este processo Mariana Séfora, Érica Siguemoto, Cintia e Thaíse pelo apoio e pelos trabalhos e alegrias compartilhadas.

A técnica Geni e todos do laboratório de bromatologia que dispensaram parte do tempo, conhecimento, paciência e convívio para nos abrigar durante a reforma do nosso laboratório.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa e recursos recebidos possibilitando a execução deste estudo.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o êxito desse trabalho.

Carlos-Menezes ACCC. Efeito do hidrolisado proteico do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS Alegria) processado na solubilização micelar do colesterol e inibição da HMGR [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2013.

RESUMO

Introdução: A obesidade e a dislipidemia são grandes contribuintes dos agravos cardiovasculares. O consumo de vegetais, principalmente de suas proteínas, atua de forma protetora na magnitude destes agravos. Há grandes indícios de que a proteína do amaranto possui efeito hipocolesterolemizante pela ação de peptídeos, originários de sua digestão incompleta. **Objetivo:** Verificar a ação, *in vitro*, do hidrolisado proteico do amaranto, submetido a diferentes processamentos, na solubilização micelar do colesterol e inibição da atividade enzimática HMGR. **Métodos:** As farinhas processadas e crua foram analisadas quanto seu teor de aminoácidos. Os isolados proteicos das farinhas do grão de amaranto tostado, extrusado e cru, foram submetidos à hidrólise enzimática e em seguida, foi elaborada uma solução de sais biliares e colesterol para avaliar a capacidade dos hidrolisados proteicos em diminuir a solubilização micelar de colesterol. Utilizaram-se os ultra filtrados (PM menor que 3 kDa) em concentração de 3 mg/mL em equivalentes de albumina, e para os de peso moleculares maiores foram utilizados 10 mg/mL. Com o intuito de verificar o mecanismo de inibição da síntese endógena de colesterol, somente, foram utilizados os hidrolisados ultra filtrados. Nos ensaios de inibição enzimática da HMGR foram utilizadas concentrações de hidrolisados (0,1, 0,5 e 1 mg/mL) para avaliar a inibição e comparar a pravastatina (inibidor conhecido). **Resultados:** A composição de aminoácidos demonstrou-se adequada, quando comparada a recomendação de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos. Os aminoácidos hidrofóbicos constituem 30 % do total de aminoácidos. Ao avaliar o efeito do hidrolisado na solubilização micelar do colesterol, foi observado que houve diferença ($p < 0,004$) devido ao processamento. O hidrolisado proteico da farinha crua (IPHc), com peptídeos de peso molecular

maior que 3 kDa, reduziu a solubilização micelar do colesterol em $44,09 \pm 1,5 \%$, enquanto que os hidrolisados de farinha tostada (IPHt) e extrusada (IPHe) reduziram em $31,24 \pm 5,9 \%$ e $24,97 \pm 4,1 \%$. Já os hidrolisados com peso molecular menor que 3 kDa apresentaram pouca diferença ($p < 0,03$) em relação ao processamento. A redução da solubilidade micelar observada pelos IPHc e IPHe foi semelhante: $37,21 \pm 1,65 \%$ e $35,45 \pm 0,4 \%$, respectivamente. O IPHt apresentou a menor redução de $22,47 \pm 4,6 \%$. Os hidrolisados da farinha de amaranto também foram capazes de inibir a atividade da enzima HMGR em diversas concentrações. O controle da atividade normal da enzima apresentou $0,65 \pm 0,05 \mu\text{mol}$ de NAPH oxidada min/mg equivalente de albumina. O IPHc, em concentrações de 0,1 e 0,5 mg/mL, apresentou efeito similar ao da pravastatina, diferindo do controle ($p < 0,05$), produzindo: $0,24 \pm 0,03$ e $0,29 \pm 0,13$ de μmol de NAPH oxidada min/mg equivalente de albumina. Por outro lado o IPHt apresentou efeito similar ao da pravastatina em concentração superior ao cru; em 1 mg/mL produziu $0,20 \pm 0,09$ de μmol de NAPH oxidada min/mg equivalente de albumina. O IPHe apresentou efeito inibidor da enzima em concentração de 0,1 mg/mL, porém menor do que o observado para a pravastatina. **Conclusões:** A proteína do grão de amaranto hidrolisada possui indícios de atividade hipocolesterolêmica. Sendo capaz de atuar tanto na via exógena quanto na via endógena, inibindo a absorção do colesterol e sua síntese de forma indireta. O processamento térmico diminuiu esta capacidade, mas ainda demonstra resultados significativos. Dentre os processamentos, a extrusão mostrou ter diminuído este efeito, embora os seus resultados possam ter sido influenciados pela quantidade de componentes no isolado proteico, como lipídeos e compostos fenólicos.

Descritores: amaranto, processos térmicos, efeito hipocolesterolêmico, colesterol, micelas, HMGR.

ABSTRACT

Introduction: Obesity and dyslipidemia are major contributors of cardiovascular diseases. The consumption of vegetables, especially their protein, acts protectively on the magnitude of these injuries. There is evidence that amaranth protein has a cholesterol-lowering effect by the action of peptides originating from its incomplete digestion. **Objective:** To assess the effect, *in vitro*, of the hydrolyzed protein of amaranth, submitted to different processes, on the reduction of the micellar solubilization of cholesterol and on the inhibition of HMGR enzyme activity. **Methods:** The raw and processed flours were analyzed for their content of amino acids. The isolated protein from amaranth grain flour toasted, extruded and raw, were subjected to enzymatic hydrolysis. Subsequently, it was prepared a solution of bile salts and cholesterol to assess the ability of the hydrolyzed protein to decrease the micellar solubilization of cholesterol. It was used the ultra-filtered peptides (MW up to 3 kDa) at concentration of 3 mg/mL equivalent albumin; and for higher molecular weights, it was used 10 mg/mL. In order to verify the mechanism of inhibition of the cholesterol endogenous synthesis, only it was used the hydrolyzed ultra-filtered peptides with MW < 3 KDa. In the assays of HMGR inhibition, several concentrations of peptides were used (0.1, 0.5 and 1 mg/mL) to compare the inhibition to pravastatin (a known inhibitor). **Results:** The amino acid composition showed to be adequate when compared to the recommendation of essential amino acids for children 2-5 years. Hydrophobic amino acids compose 30 % in total amino acids. When evaluating the effect of the hydrolyzate micellar solubilization of cholesterol has been observed that significant difference ($p < 0.004$) from the processing. The peptides from raw flour hydrolyzed protein (IPHc) with a molecular weight greater than 3 kDa reduced micellar solubilization of cholesterol by $44.09 \pm 1.5 \%$, while those from the roasted flour (IPHt) and extruded flour (IPHe) reduced by $31.24 \pm 5.9 \%$ and $24.97 \pm 4.1 \%$. Peptides with a molecular weight up to 3 kDa showed little difference ($p < 0.03$) due to processing. The reduction of the observed micellar solubility of IPHc and IPHe were similar: $37.21 \pm 0.4 \%$ and $35.45 \pm 1.65 \%$, respectively. The IPHt showed

the smallest decrease of 22.47 ± 4.6 %. The peptides from amaranth flour were also able to inhibit the activity of the enzyme HMGR in various concentrations. The control of normal enzyme activity showed 0.65 ± 0.05 μmol of NAPH oxidized min/mg equivalent of albumin. The IPHc at concentrations of 0.1 and 0.5 mg/mL had an effect similar to that of pravastatin, different from control ($p < 0.05$), yielding: 0.24 ± 0.03 and 0.29 ± 0.13 μmol of the NAPH oxidized min/mg equivalent of albumin. On the other hand, IPHt showed a similar effect to higher concentration of pravastatin in the raw, and in 1 mg/mL produced from 0.20 ± 0.09 μmol of oxidized NAPH min/mg equivalent of albumin. The IPHe showed the inhibitory effect on the enzyme concentration as lower as 0.1 mg/mL, but less pronounced than pravastatin. **Conclusions:** The peptides from hydrolysis of amaranth grain has evidence of hypocholesterolemic activity. They are able to act both in exogenously and endogenous pathways, inhibiting the absorption of cholesterol and its synthesis. The thermal processing reduces this capacity, but still shows significant results. Among the processing, extrusion deserves less attention than other one, although their results may have been influenced by the amount of the isolated protein components, such as lipids and phenolic compounds.

Key words: amaranth, thermal processes, hypocholesterolemic effect, cholesterol micelles, HMGR.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. ABSORÇÃO E SÍNTESE DE COLESTEROL	15
1.3. COLESTEROL E DIETA	18
1.4. PEPTÍDEOS BIOATIVOS	18
1.5. AMARANTO	20
1.5.1. Potencial hipocolesterolemizante do amaranto	22
1.5.2. Produtos alimentícios contendo amaranto	24
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1. OBJETIVO GERAL	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. AMOSTRA	28
4.1.1. Tostagem	28
4.1.2. Extrusão	28
4.2. COMPOSIÇÃO DAS FARINHAS DO GRÃO DE AMARANTO	29
4.2.1. Composição centesimal das farinhas do grão de amaranto	29
4.2.2. Perfil de aminoácidos	30
4.3. ISOLAMENTO DA PROTEÍNA DE AMARANTO	31
4.4. HIDRÓLISE IN VITRO	33
4.4.1. Grau de hidrólise	35
4.5. ELETROFORESE SDS-PAGE	36
4.6. PERFIS DOS HIDROLISADOS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	37
4.7. EFEITO DO HIDROLISADO PROTEICO NA SOLUBILIDADE MICELAR DE COLESTEROL	37
4.8. EFEITO DO HIDROLISADO PROTEICO SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA HMGR	39
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS FARINHAS DO GRÃO DE AMARANTO	42
5.2. PERFIL DE AMINOÁCIDOS DAS FARINHAS CRU E PROCESSADO	43
5.3. ISOLADO PROTEICO DE AMARANTO	47

5.4.	PERFIL DOS ISOLADOS E HIDROLISADOS POR ELETROFORESE SDS-PAGE E HPLC	48
5.5.	EFEITO DO HIDROLISADO PROTEICO NA SOLUBILIDADE MICELAR DE COLESTEROL.....	56
5.6.	EFEITO DO HIDROLISADO PROTEICO SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA HMGR.....	58
6.	CONCLUSÃO	64
7.	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Extrusora de laboratório ELM20-MIOTTO.	29
Figura 2. Fluxograma de isolamento proteico da farinha desengordurada do grão de amaranto.....	33
Figura 3. Composição de aminoácidos das farinhas do grão de amaranto....	43
Figura 4. Foto do gel de eletroforese da farinha e isolado proteico de amaranto.....	48
Figura 5. Foto do gel de eletroforese de hidrolisado proteico de amaranto. ..	52
Figura 6. Cromatogramas a 220 nm sobrepostos de Branco, linha preta e Hcru, linha verde.....	53
Figura 7. Cromatogramas a 220 nm sobrepostos de Branco, linha preta e Hextr, linha verde.....	54
Figura 8. Cromatogramas a 220 nm sobrepostos de Branco, linha preta e Htost, linha verde.	55
Figura 9. Efeito do IPH do grão de amaranto sobre a solubilidade micelar de colesterol.	56
Figura 10. Efeito do IPH de baixo peso molecular do grão de amaranto sobre a solubilidade micelar de colesterol.....	57
Figura 11. Efeito do IPHc do grão de amaranto sobre a inibição da atividade enzimática da HMGR.	59
Figura 12. Efeito do IPHt do grão de amaranto sobre a inibição da atividade enzimática da HMGR.	60
Figura 13. Efeito do IPHe do grão de amaranto sobre a inibição da atividade enzimática da HMGR.	61
Figura 14. Porcentagem de inibição da atividade enzimática HMGR dos hidrolisados proteicos em diferentes concentrações.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal das farinhas do grão de amaranto em base seca.	42
Tabela 2. Escore de aminoácidos essenciais da farinha do grão de amaranto cru.....	45
Tabela 3. Escore de aminoácidos essenciais da farinha do grão de amaranto tostada.	45
Tabela 4. Escore de aminoácidos essenciais da farinha do grão de amaranto extrusada.	46
Tabela 5. Frações proteicas da farinha do grão de amaranto extrusada, tostada e crua e de seus respectivos isolados proteicos.	51

LISTA DE ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

Alanina	A
Cisteína	C
Ácido Aspártico	D
Ácido Glutâmico	E
Fenilalanina	F
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Lisina	K
Leucina	L
Metionina	M
Asparagina	N
Prolina	P
Glutamina	Q
Arginina	R
Serina	S
Treonina	T
Valina	V
Triptofano	W
Tirosina	Y

1. INTRODUÇÃO

Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT) são um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial de Saúde estima que as DCNT sejam responsáveis por 61% das mortes ocorridas no mundo. No Brasil há um comportamento semelhante, em 2002 o Sistema Único de Saúde gastou 69% do orçamento com o tratamento destas doenças e em 2009 foram a principais causas de óbito (WHO, 2008; Brasil, 2002; 2009).

A dieta possui um papel determinante na prevenção e no desenvolvimento dessas doenças. A alimentação é considerada um dos fatores modificáveis mais importantes para o risco de agravos; 80 % dos casos de doenças coronarianas poderiam ser evitados com alterações nos hábitos alimentares, nos níveis de atividade física e no uso de produtos derivados do tabaco (WHO, 2003; 2008).

1.1. ABSORÇÃO E SÍNTESE DE COLESTEROL

O intestino e o fígado possuem um papel importante no controle do metabolismo lipídico (COHN *et al.*, 2010). O colesterol presente no lúmen intestinal deriva de muitas fontes, incluindo dieta, bile, secreção intestinal e descamação epitelial (VAN DER WULP *et al.*, 2013). No intestino delgado, os lipídeos da dieta são hidrolisados e solubilizados por sais biliares em agregados macromoleculares (compostos por sais biliares, ácidos graxos, monoglicerídeos,

fosfolipídios e colesterol) e conduzidos até as membranas dos enterócitos (GOODMAN, 2010).

Agregados macromoleculares estão envolvidos com a absorção de lipídeos: vesículas unilamelares e micelas mistas. As primeiras são partículas com centenas de angstroms de diâmetro, pobres em ácidos biliares, contendo fosfolipídeos, ácidos graxos, monoglicerídeos e colesterol. As segundas são muito mais ricas em ácidos biliares, são partículas menores com diâmetros inferiores a 100 Å e compostas principalmente de ácidos biliares e colesterol com menores quantidades de fosfolipídeos que as vesículas (WOOLLETT *et al.*, 2006).

As micelas possuem característica anfipática: são solúveis em água e capazes de facilitar o transporte intraluminal, facilitando a absorção de lipídeos através da borda em escova das células intestinais (MARRINK e MARK, 2002).

Existe uma concentração para formação de micelas, que é chamada de concentração micelar crítica (CMC), propriedade intrínseca e característica de um surfactante. A formação micelar depende das concentrações de ácidos biliares presentes no meio. Quando as concentrações de ácidos biliares excedem a CMC, somente este formam as micelas. Concentrações de ácidos biliares abaixo da CMC resultam num equilíbrio favorável para a formação de vesículas (WOOLLETT *et al.*, 2006). Substâncias derivadas de alimentos como peptídeos e fitoesteróis, podem perturbar este equilíbrio e resultar na insolubilização do colesterol nas micelas, que irá afetar a absorção celular, sendo de grande interesse nas intervenções de redução de colesterol (KIRANA *et al.*, 2005)

Derivados lipídicos do conteúdo micelar, em pH levemente ácido, tornam-se protonados e permeiam a membrana ou se agregam à ela temporariamente. O colesterol é absorvido por transportadores NPC1 L1 (*Niemann - Pick C1 - like1*) e ABC A1 (*ATP-binding cassette*), o efluxo é feito por transportadores ABC G5 e ABC G8 (GOODMAN, 2010). A redução da expressão gênica ou inibição destes transportadores podem inibir a absorção do colesterol e diminuir o efluxo hepático e intestinal, que resulta em alterações no metabolismo lipídico.

Os LXR (*liver X receptors*) também estão envolvidos na biossíntese lipídica e no metabolismo do colesterol. A ativação global desses receptores desencadeia efeitos como aumento dos níveis de HDL-c (lipoproteína de alta densidade), hipertrigliceridemia, esteatose hepática, aumento da excreção de colesterol na bile e redução na eficiência da absorção intestinal. Após a absorção intestinal, as enzimas ACAT 1 e ACAT 2 (acilCoA: colesterol aciltransferase) catalisam a esterificação de colesterol intracelular para ser incorporado a apolipoproteínas e quilomícrons (IQBAL e HUSSAIN, 2009).

A síntese endógena de colesterol consiste em outra etapa de controle do metabolismo. A enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) redutase ou HMGR catalisa a conversão de HMG CoA a mevalonato, cujo passo é determinante não somente na síntese de colesterol mas, como também na de isoprenoides não esteróides (GOLDSTEIN e BROWN, 1990; JO e DEBOSE-BOYD, 2010). O excesso de colesterol é desviado para a produção de ácidos biliares, lipoproteínas e hormônios (GOLDSTEIN e BROWN, 1990; IKONEN, 2008). Muitas drogas hipolipemiantes atuam sobre a etapa limitante da síntese de colesterol, bloqueando a atividade da enzima HMGR.

1.3. COLESTEROL E DIETA

Diversos estudos avaliam a interferência da dieta nas alterações dos níveis plasmáticos de colesterol total e suas frações. Entretanto, poucos estudos sobre o metabolismo do colesterol ressaltam o fato de que menos de um terço do colesterol presente no lúmen intestinal provém da dieta, e dois terços a três quartos correspondem à origem endógena (WILSON e RUDEL, 1994).

Alimentos que contém fitoesteróis e seus correspondentes saturados, como o estanol, reduzem a absorção do colesterol e, portanto, reduzem os níveis plasmáticos de LDL-c (lipoproteína de baixa densidade) (JESCH e CARR, 2006). Alguns estudos, por meio de um sistema de soluções de bile *in vitro*, demonstraram que o sitosterol reduz a solubilização micelar de colesterol, com consequente diminuição da sua absorção.

FROTA *et al.* (2008) compararam o efeito hipocolesterolemizante do grão do feijão caupi e do seu isolado proteico em hamsters. Verificaram que o feijão integral e sua proteína promoveram uma redução de 49 e 20 %, respectivamente, nos níveis séricos de colesterol total quando comparados ao controle. Esse resultado mostra a importante contribuição da proteína vegetal no controle da hipercolesterolemia.

1.4. PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Peptídeos biologicamente ativos são peptídeos derivados de alimentos que exercem em humanos efeitos fisiológicos, semelhantes a hormônios. São

encontrados em vegetais, ovos, leite, peixes e em carne bovina (ERDMANN *et al.*, 2008).

Há três maneiras de peptídeos serem liberados no trato digestório: pela ação enzimática do processo digestivo, pela digestão microbiana intestinal e durante o processamento de alimentos, como a fermentação (MÖLLER *et al.*, 2008). Esses hidrolisados proteicos contêm mais de 50 % de peptídeos, com resíduos de 2-50 aminoácidos por molécula (ERDMANN *et al.*, 2008). Os peptídeos podem exibir diversas atividades, dependendo da sua sequência de aminoácidos. Eles podem atuar de forma imunomodulatória, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, opióide, anti-hipertensiva e hipocolesterolêmica (HARTMANN e MEISEL, 2007).

As proteínas do leite, como as do soro e as caseínas, exercem diversos efeitos fisiológicos, atuam como antioxidante, antimicrobiano, imunomodulatório, anticarcinogênico, e, além disso, são precursoras de alguns outros peptídeos bioativos (SEVERIN e XIA, 2005).

Alguns estudos têm demonstrado o efeito hipocolesterolêmico do isolado proteico de soja ligada a fosfolipídeos, em humanos (HORI *et al.*, 2001). Os peptídeos IAEK, VPDPR e IAVP têm comprovada ação hipocolesterolêmica, já que o primeiro inibe a absorção do colesterol, o segundo inibe a absorção de gorduras em animais com dieta rica em lipídeos e o terceiro atua como inibidor da HMG-CoA redutase, enzima envolvida no processo de síntese de colesterol (NAGAOKA *et al.*, 2001; DZIUBA *et al.*, 2003; TAKENAKA *et al.*, 2003; PAK *et al.*, 2005a e 2005b).

BORODIN *et al.* (2009), por meio de um estudo *cross-over*, demonstraram que a ingestão de 30 g de isolado proteico de soja, durante 2 meses, foi capaz

de reduzir o colesterol total, triglicerídeos e a fração LDL-c, e também, aumentou a fração HDL-c de Russos hipercolesterolêmicos. O estudo foi conduzido em 28 indivíduos com idade média de 50 anos.

NAGAOKA *et al.* (2010) avaliaram a interferência do peptídeo derivado da proteína de soja VAWWMY na solubilização micelar do colesterol *in vitro*. Neste estudo foi verificada uma diminuição da solubilização quando comparada a de isolados proteicos, por ligação entre o peptídeo e os sais de bile.

TIRONI e AÑÓN (2010) analisaram a atividade antioxidante de proteínas e, peptídeos em grãos de *Amaranthus mantegazzuanus*. Este estudo mostrou a presença de peptídeos antioxidantes no isolado proteico, e nas frações: albumina, globulina e glutelina, tendo nesta maior atividade. Assim, verifica-se que apesar de o leite e a soja serem os alimentos mais estudados com relação a seus peptídeos bioativos, o amaranto também tem se mostrado fonte de peptídeos benéficos ao organismo.

1.5. AMARANTO

O amaranto é um pseudocereal, originário da América Central e México, que pertence à classe das dicotiledôneas e à família das amarantáceas, possui características tanto de cereais quanto de leguminosas. Há mais de 60 espécies no gênero *Amaranthus*, a maioria com origem no continente americano. O grande número de variedades é refletido na grande quantidade de denominações do vegetal: amaranto (espanhol e português); *kiwicha*, *achita*, *coyo*, *achis*, *qamaya* (Peru); *coimi*, *millmi* e *inca pachaqui o grano inca* (Bolívia); *sangorache*, *ataco*, *quinua de castilla* (Equador); *millmi* (Argentina); *alegría*, *huanthi* (México); *rejgira*, *ramdana*, *eeerai* (Índia); *een*, *choy*, *yin choy*, *in-tsai*,

hsien tsai, xian ca (China) (ROBERTSON, 1981; MUJICA-SÁNCHEZ *et al.*, 1997; RASTOGI e SHUKLA, 2013).

Este grão ainda é pouco consumido no Brasil, mesmo havendo esforços de pesquisadores para introduzi-lo em nossa cultura. Pesquisas realizadas pela EMBRAPA – Cerrados, avaliaram diversas espécies de amaranto, e a que melhor se adaptou quanto ao solo e ao clima do cerrado, foi o *Amaranthus cruentus* L., que originou a variedade BRS Alegria (FERREIRA *et al.*, 2007).

Este grão desperta grande interesse entre os pesquisadores, devido às características nutricionais e funcionais que ele apresenta, além do uso potencial em indústrias alimentícias. Ao final da década de 80 o Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos da América considerou o amaranto como um dos mais promissores alimentos do milênio (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989)

A composição do grão de amaranto varia em 48-62% de amido, 14,5-15 % de proteínas, 4,8-8,1 % de gorduras e 2-3,5 % de fibra. Sua proteína é de boa qualidade biológica embora alguns trabalhos mostrem a existência de aminoácidos limitantes. Os resultados sobre aminoácidos são controversos, alguns autores demonstraram que a leucina é o aminoácido limitante, outros demonstraram ser a treonina (FERREIRA e ARÊAS, 2004; TOMOSKOZI *et al.*, 2009; BRESSANI *et al.*, 1989). O grão de amaranto apresenta majoritariamente, globulinas e albuminas, e em menor ou nenhuma quantidade, proteínas de estoque (prolaminas e glutelinas). As albuminas são proteínas globulares citoplasmáticas de baixo peso molecular, que desempenham diversas funções em humanos. As globulinas são compostas de globulina 11S, globulina-P e uma pequena parte de globulina 7S. A globulina 11S possui uma estrutura quaternária

dodecamérica, com subunidades ácidas e básicas ligadas por pontes dissulfídicas. A globulina-P é composta por molécula unitária, com massa molecular e composição polipeptídica similar a 11S, porém tendem a se polimerizar e contém mais subunidades monoméricas de 56 kDa. As glutelinas também possuem características moleculares semelhantes (SEGURA-NIETO *et al*, 1992; KONISHI *et al*, 1991; MARTÍNEZ *et al*, 1997; AVANZA e AÑÓN, 2007). A baixa quantidade de glutelina torna o consumo do grão indicado para portadores de doença celíaca (ALVAREZ-JUBETE *et al.*, 2009). A doença celíaca é caracterizada pela má absorção de nutrientes resultante de uma inflamação intestinal após a ingestão de gliadinas e glutelinas, proteínas encontradas em grande quantidade no trigo, centeio, cevada e aveia (FARREL e KELLY, 2002).

O conteúdo de vitaminas e minerais também é considerável. Cálcio, fósforo e ferro estão presentes em quantidades similares aos cereais. Quantidades de fatores anti-nutricionais como fitatos são insignificantes. Este pseudocereal possui compostos antioxidantes, como tocotrienóis, tocoferóis, flavonoides e outros compostos fenólicos (BECKER *et al.*, 1981; LORENZ e WRIGHT, 1984; BRESSANI e LIGORRIA, 1994; CZERWINSKI *et al.*, 2004; AMAYA-FARFAN *et al.*, 2005; PASKO *et al.*, 2008).

1.5.1. Potencial hipocolesterolemizante do amaranto

PLATE e ARÊAS (2002) verificaram que o amaranto extrusado reduziu em 50 % os níveis de colesterol total em coelhos hipercolesterolemizados. CHAVÉZ-JÁUREGUI *et al.* (2010) avaliaram o efeito hipocolesterolemizante de snacks de

amaranto em 22 pacientes com hipercolesterolemia moderada do InCor (Instituto do Coração do Hospital das Clínicas de São Paulo). Neste estudo foram utilizados 50 g de snack de amaranto (cerca de 7 g de proteína/dia) e 50 g de snack de milho (placebo) durante dois meses. Porém, não se observou efeito significativo na redução de colesterol, LDL-c e triglicérides, quando comparado ao placebo. A quantidade de amaranto utilizada não foi suficiente para que suas proteínas demonstrassem algum benefício na redução do colesterol. MAIER *et al.* (2000) verificaram que o colesterol total plasmático diminuiu 4,5 % após 28 dias de intervenção dietética em humanos que consumiram 50 g de proteína de amaranto por dia.

MENDONÇA *et al.* (2009) estudaram o efeito da proteína do amaranto, na diminuição dos níveis de colesterol, em hamsters hipercolesterolêmicos, os quais sofreram essa indução por dieta rica em caseína. Foi fornecido 30% de proteína na dieta, a qual era composta de 20% de caseína e 10% de isolado proteico de amaranto. Foi observado que houve uma diminuição de 48% do colesterol total plasmático no grupo que recebeu somente o isolado proteico. Mesmo quando a proteína do amaranto era adicionada de caseína, a intervenção acarretou numa redução de 27 % do colesterol total. Para as frações não HDL-c essa redução foi de 57 e 39 %, respectivamente. Isso mostra o marcante efeito hipocolesterolêmico da proteína, mesmo na presença de um agente hipercolesterolemizante.

Os mecanismos de redução de colesterol sérico pela ingestão de isolado proteico de amaranto ainda não estão totalmente elucidados. Uma das vias de redução de colesterol pode ser a inibição da solubilização micelar do colesterol, uma vez que SOARES (2008) encontrou o peptídeo IAEK no isolado proteico do

grão de *Amaranthus cruentus*, quando submetido à digestão *in vitro*. Este peptídeo está descrito na literatura como hipocolesterolemizante por inibir a absorção do colesterol em células Caco-2, poder ligante em ácidos biliares e como ativador da enzima 7 α -hidroxilase (HOWARD e UDENIGWE, 2013; NAGAOKA *et al.*, 2001).

MARTIROSYAN *et al.* (2007) avaliaram o efeito do óleo de amaranto em pacientes portadores de doenças do coração e em hipertensos obesos. Dentre os parâmetros verificados, o óleo foi eficiente em reduzir os níveis de colesterol sanguíneo. CASTRO *et al.* (2013) estudaram o efeito do óleo do amaranto e do esqualeno em hamsters submetidos a dieta hipercolesterolemizante. Este trabalho mostrou que a fração lipídica do *A. cruentus* não reduz os níveis de colesterol plasmático, bem como os de triglicerídeos. Entretanto, aumentou a excreção de ácidos biliares nas fezes, evidenciando uma possível diminuição da solubilidade de colesterol nas micelas.

Outra hipótese para explicar o efeito hipocolesterolemizante destas proteínas vegetais é a inibição da atividade enzimática HMGR, pois há peptídeos relacionados com esta inibição, por exemplo, LPYPR e LPYP encontrados na fração glicínina da soja (HOWARD e UDENIGWE, 2013).

1.5.2. Produtos alimentícios contendo amaranto

As proteínas do amaranto podem ser incluídas na alimentação por meio de farinhas, concentrados proteicos ou isolados (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1994; AVANZA e AÑÓN, 2007).

O amaranto extrusado também possui alto valor biológico. FERREIRA e ARÊAS (2004) compararam a qualidade biológica da proteína do amaranto cru,

torrado e extrusado (em porcentagens de umidades distintas) em ratos. Observaram que o grupo que consumiu o amaranto extrusado apresentou maiores índices de razão de eficácia proteica, em relação ao grupo controle de caseína e aos outros dois.

GAMEL *et al.* (2004) comparam o valor proteico da semente crua e estourada (como pipoca) de duas espécies de amaranto (*A. caudatus* e *A. cruentus*). Observaram que, depois de estouradas, há uma diminuição de aminoácidos, 9 e 13 %, respectivamente, e entre os aminoácidos a perda maior foi de tirosina, seguido de fenilalanina e metionina. A digestibilidade *in vitro* foi ligeiramente maior para as amostras estouradas, enquanto que *in vivo* não houve diferença.

Para se obter maior variedade de produtos com o grão de amaranto, o processamento térmico torna-se essencial na utilização tanto pela Indústria de Alimentos, na elaboração de produtos ou ingredientes a base de amaranto, como no nível doméstico. Ao se preparar o grão das várias formas preconizadas, é imprescindível a avaliação de como este processamento afeta as propriedades hipocolesterolêmicas da proteína do amaranto.

2. JUSTIFICATIVA

Foi demonstrado que o amaranto pode apresentar efeitos fisiológicos importantes como ação antioxidante e, principalmente, hipocolesterolemizante, provavelmente devido à presença de peptídeos bioativos, além disso, possui alto valor nutricional.

A literatura sobre os benefícios do grão em humanos é muito escassa, porém há grande diversidade de estudos realizados em animais e *in vitro* demonstrando o potencial benéfico deste alimento.

No entanto ainda não está elucidado os mecanismos pelos quais a proteína do amaranto exerce seu efeito hipocolesterolemizante, e como a diferença na composição de aminoácidos pode contribuir com este efeito.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Verificar a ação, *in vitro*, de hidrolisados proteicos provenientes do grão de amaranto cru e processados, na solubilização micelar do colesterol e inibição da atividade da enzima HMGR.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter as formas extrusadas e tostadas do grão de amaranto.
- Isolar a proteína do amaranto integral e destes produtos processados.
- Avaliar a composição de aminoácidos da farinha integral e processada.
- Promover a hidrólise *in vitro* do isolado proteico da farinha de amaranto integral e dos produtos processados.
- Avaliar o perfil eletroforético da fração proteica das farinhas e dos isolados antes e após hidrólise.
- Avaliar o perfil cromatográfico dos hidrolisados proteicos de baixo peso molecular.
- Avaliar o efeito destes hidrolisados na capacidade de solubilização micelar do colesterol.
- Avaliar o efeito dos hidrolisados ultrafiltrados sobre a atividade da HMGR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRA

O grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria) foi obtido da EMBRAPA – Cerrados (Planaltina-DF), por meio da empresa Celeiro Com. Ind. Ltda ME em novembro de 2010. Após o recebimento, as sujidades dos grãos foram separadas manualmente.

Os grãos foram moídos em triturador modelo M20 da marca IKA®-WERKE e a farinha foi tamisada em peneira interna média de 0,45 mm. O produto foi armazenado até 4 °C para utilização.

4.1.1. Tostagem

O processo de tostagem foi realizado de acordo com o método de BRESSANI *et al.* (1987) com modificações. A farinha do grão foi tostada em uma chapa aquecida a 120 °C, durante 1 minuto.

4.1.2. Extrusão

A farinha do grão foi submetida à extrusora de laboratório (Miotto Ltda., São Bernardo do Campo-SP, Brasil) de parafuso único com razão comprimento/diâmetro (L/D) de 20:1, razão de compressão 3:1 e com velocidade de rotação do parafuso fixada a 200 rpm. A extrusão foi conduzida a 150 °C (zona 2), sendo 60 °C na área de alimentação (zona 1) e 130 °C na área de saída (zona 3), orifício de saída fixado em 3 mm. A umidade da farinha integral de

amaranto foi ajustada a 27 % (base seca), pois este foi o teor observado para o melhor valor proteico biológico (FERREIRA e ARÊAS, 2004). Após adição de água, a farinha foi homogeneizada manualmente e estocada em sacos plásticos lacrados sob refrigeração, por 12 horas, para equilíbrio da umidade desejada.

Figura 1. Extrusora de laboratório ELM20-MIOTTO.

4.2. COMPOSIÇÃO DAS FARINHAS DO GRÃO DE AMARANTO

4.2.1. Composição centesimal das farinhas do grão de amaranto

Após estes processos, tanto o amaranto cru quanto os processados foram moídos como já descrito, para obtenção das farinhas para análise.

O teor de umidade foi analisado por secagem a 105 °C, o teor de cinzas por calcinação a 550 °C e o de lipídeos por extração em extrator Soxhlet com éter de petróleo; o conteúdo de nitrogênio das amostras foi analisado pelo método micro-Kjeldahl, métodos descritos pela AOAC (2010). O valor dos carboidratos totais foi determinado por diferença. Para o cálculo do teor de proteínas foi utilizado como fator de conversão de nitrogênio: 5,85 para as farinhas e 6,12 para os isolados proteicos; valores descritos previamente de acordo com o cálculo da soma da massa de aminoácidos (mg) obtidos por cromatografia de troca iônica dividido pelo teor de nitrogênio (mg) da amostra (SOSULSKI e IMAFIDON, 1990; MENDONÇA *et al.*, 2009).

4.2.2. Perfil de aminoácidos

A análise de aminoácidos totais e triptofano foram realizadas pelo laboratório CBO Análises, localizado em Campinas – São Paulo.

A preparação das farinhas foi realizada de acordo com o método proposto por WHITE *et al.* (1986). Esta análise ocorreu em etapas, iniciando-se pela hidrólise para liberação de aminoácidos até a separação dos derivados de feniltiocarbamil, os quais foram detectados por absorbância em UV, em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Para a hidrólise foram pesados 0,2 g de proteína de cada tipo de farinha (cru, tostada e extrusada) e norleucina – utilizado como padrão interno – a razão amostra/padrão é aproximadamente 15:1. A seguir foram adicionados 100 mL de HCl 6 mol/L contendo 0,1 % de fenol, a mistura foi refluxada por 20 h a 110 °C. Após resfriamento, completou-se o volume para 200 mL e a solução foi filtrada em fibra de vidro.

Para a remoção de proteínas de alto peso molecular e lipídeos, a amostra foi eluída em cartucho C18 Sep-pak, 1 mL de amostra foi adicionado a 2 mL de solução 0,1 % (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) em água deionizada e metanol (70:30 v/v), foi coletado os últimos 2 mL. O HCl foi removido de 20 µL da fração coletada por vácuo a temperatura ambiente, a derivatização foi iniciada pela adição de 20 µL de solução contendo etanol 95 % v/v, água, trietilamina, fenilisotiocianato na proporção em volume de 7:1:1:1, resultando nos derivados de feniltiocarbamil.

Os derivados foram separados por HPLC em coluna de fase reversa Nova-Pak C18, de 3,9 x 150 mm, com forno de coluna a 38 °C. A fase móvel consistiu em dois eluentes. O eluente A era formado por 940 mL de acetato de sódio 0,14 mol/L, pH 6,4, contendo 0,05 % de trietilamina e 60 mL de acetonitrila grau HPLC. O eluente B era formado de 60 % de acetonitrila grau HPLC e 40 % de água deionizada (v/v). O gradiente linear de eluição utilizado foi de 0-100 % de B.

O tempo total de análise foi de 25 minutos com detector de UV em comprimento de onda 254 nm. As áreas dos picos foram comparadas às da mistura padrão de aminoácidos Pierce (Amino Acid Standard H). Os valores de triptofano foram determinados por espectrofotometria com leitura a 590 nm por meio do método descrito por SPIES (1967), utilizando hidrólise enzimática com pronase a 40 °C por 24 h, já que a hidrólise ácida destrói este aminoácido.

4.3. ISOLAMENTO DA PROTEÍNA DE AMARANTO

O isolamento foi realizado pelo princípio de precipitação isoeletrica segundo MARTÍNEZ e AÑÓN (1996), com modificações. As amostras moídas

foram desengorduradas com hexano na proporção 1:4, sob agitação durante 4 horas. Após 24 horas de secagem em temperatura ambiente; foi adicionada água destilada na farinha desengordurada na proporção 1:10, exceto para amostra do amaranto extrusado, no qual foi estabelecida a proporção 1:15. O pH foi elevado a 9 com NaOH 1 mol/L. A mistura foi agitada por 5 horas a temperatura ambiente e permaneceu em repouso por 12 horas a 4 °C. Posteriormente a mistura de pH 9 foi filtrada e centrifugada a 9000 x *g* por 20 min a 4 °C. O precipitado constituído majoritariamente de carboidratos foi descartado.

Após novo ajuste do pH do sobrenadante a 4,5 com HCl 1 mol/L, o homogenato permaneceu por 12 horas a 4 °C. Uma nova centrifugação a 9000 x *g* foi realizada e o precipitado foi congelado. Posteriormente, o isolado proteico (IP) congelado foi liofilizado, como descrito a seguir.

Figura 2. Fluxograma de isolamento proteico da farinha desengordurada do grão de amaranto.

4.4. HIDRÓLISE *IN VITRO*

As amostras foram hidrolisadas de acordo com as técnicas de MEGIAS *et al.* (2009), com modificações descritas a seguir.

A hidrólise foi dividida em duas partes a fim de simular a digestão humana. A primeira consiste em simular a digestão gástrica, na qual foi utilizada a pepsina

na proporção 1:1000 (enzima/substrato). Primeiramente, as amostras (IP de amaranto cru, tostado e extrusado) foram pesadas e a massa ajustada para 800 mg de proteína. Nestes tubos foram adicionados 40 mL de tampão NaCl 30 mM em pH 2, e a este homogenato foi adicionado pepsina dissolvida em NaCl, houve ajuste de volume para 45 mL. A solução foi mantida a 37 °C por 2 horas. Posteriormente, para simular a digestão intestinal, o pH foi ajustado a 7 com NaOH 5 M. Após, foi adicionada pancreatina (proporção 1:1000 enzima/substrato) dissolvida em água destilada. Após homogeneização, os tubos foram incubados a 37 °C durante 1 hora. Ao término, elevou-se a temperatura para 80 °C durante 20 minutos. Os volumes foram ajustados com água destilada para centrifugação e coleta do sobrenadante.

Os hidrolisados foram submetidos à diálise, por 24 horas com trocas de água destilada a cada 6 horas, a fim de minimizar possíveis interferências devido à quantidade de sal.

Parte dos produtos da digestão foi separada por membrana hidrofílica que permite permeação de moléculas de até 3000 Da. Para isso os hidrolisados foram centrifugados a 7500 x g por 40 minutos a 4 °C. A fim de verificar possíveis perdas na diálise e conhecer as concentrações proteicas dos hidrolisados com massa menor que 3000 Da, foi realizada análise de proteínas (LOWRY *et al.*, 1951).

Os hidrolisados apresentaram as seguintes concentrações: 11,4 mg/mL, 8,9 mg/mL e 9,46 mg/mL em equivalente de albumina para o IPHc, IPHe e IPHt, respectivamente; e 3,86 mg/mL, 3,39 mg/mL e 6,28 mg/mL em equivalente de albumina do IPH com massa menor que 3 kDa nas respectivas amostras (a

concentração foi calibrada pela equação: $y = 0,0989x - 0,0549$; $R^2 = 0,9937$.

Onde, y é dado em absorbância e x em $\mu\text{g/mL}$).

4.4.1. Grau de hidrólise

De acordo com o método de BÜCHMANN (1979) e ADLER-NISSEN (1986) foram feitos testes com ácido tricloroacético (TCA) para avaliar o grau de hidrólise das enzimas a cada hora em contato com a amostra para padronizar o método. Uma alíquota de 2 mL de cada hidrolisado da amostra do isolado proteico de amaranto tostado foi adicionada em TCA 10 % e após 15 minutos em repouso, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 15 min. O teor proteico do sobrenadante foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2010).

As proteínas solúveis em TCA dos hidrolisados, foram relacionadas de forma percentual às quantidades totais de proteína presente no isolado proteico. Para determinar o grau de hidrólise, utilizou-se a seguinte equação:

$$GH = \frac{100 \times (Hp - Ipe)}{\text{proteína total}} \quad (1)$$

Sendo:

GH = grau de hidrólise (%);

Hp = hidrolisado proteico;

Ipe = isolado proteico (branco) + enzima (branco).

Depois de variados testes foi escolhido o grau de hidrólise de 22,27%. Valores elevados de grau de hidrólise não são desejados, pois, resulta em

aminoácidos livres, devido a uma quebra completa da cadeia proteica. Valores baixos indica uma quebra insuficiente resultando em pequenas quantidades de peptídeos (XIA et al., 2012).

4.5. ELETROFORESE SDS-PAGE

O perfil eletroforético visou à comparação do peso molecular da farinha do grão integral, do isolado proteico do grão cru, tostado e extrusado, bem como os hidrolisados e do padrão de eletroforese Kaleidoscope™ (Bio Rad 161 0375).

A eletroforese foi realizada de acordo com o método descrito por (LAEMMLI, 1970), em condições redutoras e não redutoras. O gel concentrador contendo 4 % m/v de acrilamida em tampão TRIS-HCl em pH 6,8 foi preparado sobre o gel de análise com 10 % m/v de acrilamida em tampão TRIS-HCl em pH 8,8. O equipamento utilizado para eletroforese é do tipo vertical da Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia). O modelo Hoefer mini VE formou um gel de dimensões 8 cm x 9 cm x 1 mm. Em cada poço foram adicionadas 0,05 mg de proteína. A amperagem foi fixada em 20 mA para cada gel. Ao término da corrida, os géis foram corados com solução de Azul Comassie R Brilhante 0,025 % em metanol 40 % e ácido acético 7 %.

Os géis foram analisados pelo software UltraQuant 6.0 (Ultralum – Estados Unidos) para serem determinados os pesos moleculares das frações proteicas por comparação aos padrões de 10 proteínas recombinantes de 10 a 250 kDa por similaridade entre as amostras e densidade óptica das bandas.

4.6. PERFIS DOS HIDROLISADOS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Para o controle positivo da presença de peptídeos, os hidrolisados oriundos dos dispositivos de ultra filtração tiveram suas ligações peptídicas detectadas a 220 nm com auxílio de um cromatógrafo líquido (Shimadzu – Japão) com controlador LC10AT, bomba DGU-14A acoplada a injetor manual Rheodyne e detector UV/vis com arranjo de diodos SPD-M10A VP. O software utilizado foi o Class VP.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa C18 Atlantis de 250 x 0,46 mm e partículas de 5 μ m (Waters - Irlanda). Foram injetados 20 μ L de hidrolisados proteicos de amaranto cru, tostado e extrusado com massa molecular menor que 3 kDa nas concentrações de: 3,86 mg/mL, 6,28 mg/mL e 3,39 mg/mL. A fase móvel utilizada foi: solvente A: 0,045 % de TFA em água milli Q; solvente B: 0,036 % de TFA em acetonitrila. As amostras foram eluídas em gradiente linear de 5 a 95 % de tampão B em 55 minutos, mais 5 minutos para voltar a concentração inicial e 10 minutos para estabilização da coluna totalizando 70 minutos de corrida. O fluxo foi isocrático, em 1 mL/min. O gradiente selecionado foi baseado na polaridade e solubilidade dos diferentes peptídeos (SWERGOLD e RUBIN, 1983; VIJAYALAKSHMI, *et al.* 1986).

4.7. EFEITO DO HIDROLISADO PROTEICO NA SOLUBILIDADE MICELAR DE COLESTEROL

Este método foi realizado como descrito por ZHANG *et al.* (2012) e JESH e CARR (2006) o qual consiste em elaborar uma solução micelar contendo concentrações finais de 0,5 mmol/L de colesterol, 2,4 mmol/L de fosfatidilcolina,

1 mmol/L de ácido linoleico, 132 mmol/L de NaCl, 15 mmol/L de fosfato de sódio monobásico e 6,6 mmol/L de taurocolato de sódio (pH 7,4).

As suspensões foram sonicadas em banho de gelo no ultrassom (marca Elma; modelo Transsonic digital S) por 15 minutos a 100 % de potência (140 W), seguido de incubação a 37 °C por 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 10 mg/mL de hidrolisado proteico de amaranto cru, tostado e extrusado em tubos distintos. Para avaliar o efeito do hidrolisado de baixo peso molecular, foram adicionados em outros tubos 3 mg/mL de hidrolisado proteico de amaranto cru e referente aos vários tipos de processamento. As concentrações correspondem ao peso molecular maior e menor que 3 kDa, respectivamente. A solução final contendo a solução micelar e os hidrolisados foi sonicada por 1 minuto e incubada a 37 °C por 1 hora.

Após incubação, as soluções foram centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos a fim de separar o colesterol insolúvel. O sobrenadante de cada amostra, inclusive do controle (micela de colesterol sem hidrolisado) foram filtrados por uma membrana de 0,22 µm. A membrana possui a finalidade de reter micelas mistas maiores que 220 Å. Deste filtrado foi coletado uma alíquota de 100 µL e diluído em 900 µL de água miliQ.

A concentração de colesterol do filtrado, incluído nas micelas mistas pequenas, foi analisado por kit de determinação de colesterol *Amplex® Red Cholesterol Assay*. Para leitura foi utilizado o equipamento Spectra Max M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), com detecção por fluorescência em 590 nm (emissão) e 555 nm (excitação). As concentrações de colesterol foram calibradas de acordo com a equação: $y = 856,49x - 952,4$ ($R^2=0,9932$), (y é dado em emissão e x em µg/mL).

Para a avaliação do efeito inibidor dos hidrolisados na solubilidade do colesterol foi utilizada a equação:

$$I_s = \frac{[(C_m - C_{mh}) \times 100]}{C_m} \quad (2)$$

Sendo:

I_s : inibição de solubilidade micelar de colesterol (%);

C_m : concentração de colesterol lida no meio com micelas; e

C_{mh} : concentração de colesterol lida no meio com micelas.

4.8. EFEITO DO HIDROLISADO PROTEICO SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA HMGR

Para avaliar a inibição da atividade da enzima HMGR (hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase ou HMG-CoA redutase) foi utilizado um kit da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Como controle positivo, foi utilizada a droga de referência pravastatina (250 nM), uma vez que inibe o efeito catalítico da enzima HMGR.

O ensaio baseia-se na leitura espectrofotométrica do decréscimo da absorbância a 340 nm, representando a oxidação do NADPH pela subunidade catalítica de HMGR, na presença do substrato HMG-CoA, de acordo com a reação abaixo:

Alíquotas contendo 4 µL de NADPH (concentração final de 400µM) e 12 µL de substrato HMG-CoA (concentração final de 0,3 mg/mL) foram pipetadas

em placas de 96 poços em tampão (pH 7,4). As análises foram iniciadas (tempo 0), após a adição de 2 µL da HMGR (0,50 - 0,70 mg/mL de proteína) em um volume final de 0,2 mL por poço. A mistura foi incubada a 37 °C na ausência de inibidores (controle), na presença de 1 µL de pravastatina e, para testar a ação dos hidrolisados foram utilizadas as concentrações de 1mg/mL, 0,5mg/mL e 0,1mg/mL de proteína de cada amostra, o que equivale a 10, 5 e 1 µg, respectivamente no volume pipetado de 10 µL. O volume de cada poço foi completado a 200 µL com tampão Tris-HCl a pH 7,4. A placa foi agitada durante 10 s.

As quantidades de NADPH consumidas foram monitoradas a 37 °C no período de 0 a 600 s, tendo leitura da absorbância a cada 20 s. Utilizou-se o equipamento Mam5 SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Os resultados foram expressos µmol de NADPH oxidado/min/mg em equivalente de albumina ou em porcentagem, baseando-se no controle negativo (droga ou peptídeos ausentes).

Para a avaliação do efeito inibidor dos hidrolisados na solubilidade do colesterol foi utilizada a equação:

$$\text{NADPH oxidado/min} / \text{mg EA} = \frac{\left(\frac{\Delta_{\text{abs}}}{\text{min}}_{\text{amostra}} - \frac{\Delta_{\text{abs}}}{\text{min}}_{\text{branco}} \right) \times 0,2}{12,44 \times 0,006 \times 0,3 \times 0,55} \quad (3)$$

Sendo, Unidades: NADPH oxidado/min

Levando em consideração a reação na ausência de inibidores (Unidades/mg_{atividade}), os resultados foram expressos como % de inibição da

atividade da enzima na presença do medicamento ou dos hidrolisados (Unidades/mg_{amostra}).

$$CI = \frac{\left(\frac{\text{Unidades}}{\text{mg}}_{\text{atividade}} - \frac{\text{Unidades}}{\text{mg}}_{\text{amostra}} \right)}{\frac{\text{Unidades}}{\text{mg}}_{\text{atividade}}} \times 100 \quad (4)$$

Sendo,

CI: capacidade de inibição e Unidades: NADPH oxidado/min

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata, os resultados obtidos foram expressos em médias e desvios-padrão; para comparar três ou mais amostras foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA). Quando esta análise revelou diferença com significância estatística ($p \leq 0,05$), utilizou-se o teste de Tukey de comparação múltipla. Foi utilizado o programa Excel® e o software Statistical Package for the Social Sciences - SPSS Data Editor versão 13.0 para Windows.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS FARINHAS DO GRÃO DE AMARANTO

A caracterização das farinhas do grão cru e processado, quanto à quantidade de umidade, cinzas e macronutrientes estão descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Composição centesimal das farinhas do grão de amaranto em base seca*. Valores expressos em g/100g de alimento.

	Umidade	Cinzas*	Proteína*	Lipídeos*	Carboidratos totais*
Cru	9,3±0,4	3,5±0,02	15,8±0,17	7,2±0,07	73,5
Extrusado	10,5±0,14	4,7±0,02	24,7±0,17	6,8±0,003	63,8
Tostado	8,2±0,15	3,3±0,05	22,6±0,68	6,2±0,02	67,9

O teor de lipídeos encontrado para a farinha de amaranto cru corroboram com os resultados obtidos por YÁNEZ *et al.* (1994) que ao avaliar a composição centesimal de duas amostras da espécie *A. cruentus* (procedente do Chile) encontrou 6,6% e 7,3% para lipídeos, em base seca. O teor de lipídeos da farinha de amaranto extrusado também está de acordo com a literatura, MENDOZA e BRESSANI (1997) encontraram valores semelhantes no *A. cruentus*, oriundo da Guatemala e também observaram que a extrusão melhora a qualidade proteica.

O aumento na porcentagem de proteínas do amaranto extrusado e tostado, e a diminuição de lipídeos podem ser atribuídos a diferença de umidade nestas farinhas. Infere-se que ao secar o amaranto cru, houve uma evaporação parcial do conteúdo de água no grão.

5.2. PERFIL DE AMINOÁCIDOS DAS FARINHAS CRU E PROCESSADO

Abaixo estão apresentados os teores de aminoácidos referentes às farinhas, crua e processadas.

Figura 3. Composição de aminoácidos das farinhas do grão de amaranto.

Poucos aminoácidos alteraram sua concentração devido ao processamento. Entretanto, o processo de extrusão ocasionou maior alteração no percentual de aminoácidos quando comparado ao amaranto cru e tostado.

A cisteína (C) sofreu a maior redução de 22,8 % na farinha de amaranto extrusada. Também houve diminuição nos valores de isoleucina (I), lisina (K), triptofano (W) e valina (V), nesta ordem: 2,6 % e 11,5 %; 6,5 % e 4,8 %; 5,16 e 8,39 %, para farinha de amaranto tostado e extrusado, respectivamente, e 8,85 % para o extrusado. Além disso, foi observado um aumento percentual de ácido aspártico (D) e metionina (M). Em D houve um incremento de 4,6 % e 9,2 %, para o tostado e extrusado, respectivamente, e em M aumentou 25,8 % no amaranto extrusado. O conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos é de 30 % aproximadamente em todas as amostras.

Os resultados demonstrados condizem com os trabalhos de GAMEL *et al.* (2005) e TOVAR *et al.* (1989), que verificaram aumento de ácido aspártico no amaranto cozido e estourado, e redução de triptofano e lisina no grão cozido, estourado e tostado. Por outro lado, o processamento utilizado pelos autores aumentou as concentrações de valina e diminuiu metionina. A redução de ácido aspártico foi observada no amaranto tostado.

Apesar das mudanças ocorridas no perfil de aminoácidos após o processamento, este pouco interferiu no escore analisado (**Tabelas 2, 3 e 4**). Para o cálculo, foi utilizada a recomendação de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos (FAO/WHO, 1991).

$$\text{Escore de amino ácidos (\%)} = \frac{\text{amino ácido do alimento}}{\text{recomendação do amino ácido}} \times 100$$

(5)

Tabela 2. Escore de aminoácidos essenciais da farinha do grão de amaranto cru.

Aminoácidos	Amaranto cru g/100g	FAO/WHO 1991 (g)	Escore de aminoácidos (%)
cistina + metionina	3,87	2,5	155
fenilalanina + tirosina	8,16	6,3	130
Histidina	2,67	1,9	141
Isoleucina	3,38	2,8	121
Leucina	6,26	6,6	94,9
Lisina	5,98	5,8	103
treonina	3,45	3,4	101
triptofano	1,55	1,1	141
Valina	4,29	3,5	123

Tabela 3. Escore de aminoácidos essenciais da farinha do grão de amaranto tostada.

Aminoácidos	Amaranto tostado g/100g	FAO/WHO 1991 (g)	Escore de aminoácidos (%)
cistina + metionina	3,87	2,5	154
fenilalanina + tirosina	7,95	6,3	126
Histidina	2,7	1,9	142
Isoleucina	3,29	2,8	117
Leucina	6,13	6,6	92,8
Lisina	5,59	5,8	96,4
Treonina	3,43	3,4	100
Triptofano	1,47	1,1	133
Valina	4,27	3,5	122

Tabela 4. Escore de aminoácidos essenciais da farinha do grão de amaranto extrusada.

Aminoácidos	Amaranto extrusado g/100g	FAO/WHO 1991 (g)	Escore de aminoácidos (%)
cistina + metionina	4,19	2,5	167
fenilalanina + tirosina	7,82	6,3	124
Histidina	2,69	1,9	141
Isoleucina	2,99	2,8	106
Leucina	5,99	6,6	90,7
Lisina	5,69	5,8	98,1
Treonina	3,45	3,4	101
Triptofano	1,42	1,1	129
Valina	3,91	3,5	111

As farinhas de amaranto possuem bom perfil de leucina (mesmo sendo limitante), valina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano, lisina e treonina, os quais são considerados aminoácidos essenciais.

Comparando os valores de aminoácidos do amaranto com os obtidos por IQBAL *et al.* (2006) ao avaliar leguminosas (grão de bico, lentilha, feijão de corda e ervilha), foi observado que o teor de arginina, triptofano, cistina, glicina, prolina, serina e tirosina são maiores na farinha de amaranto cru e processada. Já treonina, alanina, ácido glutâmico e ácido aspártico possuem valores semelhantes. O teor de metionina do feijão de corda observado pelo autor é menor do que o visto no amaranto extrusado.

A metionina é um aminoácido limitante em muitas leguminosas e nos cereais costuma ser a lisina, nestes resultados observados comparados com o escore, o amaranto processado apresenta como limitantes a leucina e a lisina e somente leucina para o grão *in natura*. BECKER *et al.* (1981) e MENDONÇA *et*

al. (2009) em seus estudos também demonstram que a leucina pode ser um aminoácido limitante no amaranto grão de amaranto cru.

5.3. ISOLADO PROTEICO DE AMARANTO

O isolado proteico (IP) da farinha de amaranto cru e tostado apresentaram pureza de: 90,74 % e 92,55 % de proteína, respectivamente. Já o IP da farinha extrusada atingiu, em diversas tentativas, um máximo de 53,35 %. O rendimento em relação à quantidade inicial de proteína foi de 51,44 % para a amostra crua, 20,45 % para a amostra tostada e 10,8 % para a extrusada. Não foi avaliado o percentual de lipídeos remanescentes devido à pequena quantidade obtida. O baixo rendimento é consequente de temperaturas utilizadas no processamento. A utilização de temperaturas elevadas pode gerar em proteínas, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações dissulfeto, que diminui a solubilidade em sais (PRUDENCIO-FERREIRA e AREAS, 1993).

O conteúdo proteico após isolamento foi maior que o descrito por SALCEDO-CHÁVEZ *et al.* (2002) e ABUGOCH *et al.* (2010) os quais obtiveram, respectivamente, 61 % de proteína de *A. cruentus*, e 82 - 84 % de proteína de *A. hypocondriacus*; após o processamento. CORDERO-de-los-SANTOS *et al.* (2005) ao isolar a proteína do *A. hypocondriacus* obtiveram uma pureza de 93,1 % e rendimento de 56,4 %, valor de rendimento inferior ao obtido no IP de farinha crua.

A concentração de proteína do isolado proteico está de acordo com o trabalho de MARTÍNEZ e AÑÓN (1996) que ao avaliar a extração proteica do

grão de amaranto (*A. hypocondriacus*) em diferentes pH, obtiveram uma concentração de 80-90 g de proteína em 100 g de isolado proteico.

5.4. PERFIL DOS ISOLADOS E HIDROLISADOS POR ELETROFORESE SDS-PAGE E HPLC

A análise eletroforética das farinhas de amaranto extrusado, tostado e cru e seus respectivos isolados proteicos e hidrolisados estão representadas nas **Figuras 4 e 5**.

Foi possível separar no padrão, bandas de peso molecular de 250 kDa a 25 kDa, pesos moleculares menores não foram encontrados devido a compactação do gel formado.

Figura 4. Foto do gel de eletroforese da farinha e isolado proteico de amaranto.

Separação de peso molecular em kDa. Amostras: (P) padrão, (Ie) isolado proteico extrusado, (Fe) farinha extrusada, (It) isolado proteico tostado, (Ft) farinha tostada, (Ic) isolado proteico cru e (Fc) farinha crua.

Comparando as farinhas entre si em relação ao processamento térmico, pôde-se observar que houve poucas mudanças. Nas farinhas crua e tostada foi possível identificar frações proteicas acima de 85 kDa, mesmo sendo em porcentagens pequenas (total de 5-7 %), enquanto que na farinha extrusada foi observada a existência de frações menores que esta.

Entretanto houve pouca modificação nas frações com densidades mais representativas, embora tenha havido alterações na densidade das mesmas. Na farinha crua as maiores contribuições referem-se aos pesos moleculares de 54; 31 e 25 kDa (21,5; 29,9 e 22,3%, respectivamente). Na farinha tostada, em frações semelhantes, houve mudança nas densidades observadas: 54; 31 e 25 kDa (10,6; 27,6 e 32,4 %, respectivamente). Já na farinha extrusada houve uma diminuição da densidade da fração correspondente a 25 kDa, as demais se assemelham com o perfil das outras farinhas. Para as frações de 55; 31; 26 e 25 kDa, foi observada as densidades de 13,2; 29,5; 12,4 e 16,9 %, respectivamente.

A albumina e globulina representam 50 % do conteúdo proteico de estoque do amaranto (PAREDES-LÓPEZ *et al.*, 1988; MARTINEZ *et al.*, 1997). A albumina 2 ou globulina-p, podem ser classificadas como polipeptídeos com massa molecular de 52, 54 e 56 kDa, porém também podem ser encontradas massas maiores que 80 e menores que 40 kDa como descrito por MARTÍNEZ *et al.* (1997). A globulina 11S ou amarantina, responsável por muitos efeitos bioativos, possui peptídeos de peso molecular 52, 56 e 40 kDa (ROMERO-ZEPEDA e PAREDES-LOPEZ, 1995; MARTINEZ *et al.*, 1997; TOVAR-PÉREZ *et al.*, 2009).

Os polipeptídeos de glutelina e prolamina podem ser encontrados na maioria entre 20-40 kDa e 10-22 kDa, respectivamente (SEGURA-NIETO *et al.*, 1992).

Ao comparar os isolados proteicos com as farinhas correspondentes e entre si, pôde-se notar que houve perda de algumas frações, principalmente em relação aos isolados derivados de processamento térmico, pois só expressaram frações com peso molecular abaixo de 56 kDa, por outro lado o IP de farinha crua exibiu frações acima de 70 kDa. MARTÍNEZ e AÑÓN (1996) ao avaliar a extração proteica do grão de amaranto em diferentes pH, observaram que extrações entre pH 8 e 11 induzem transformações estruturais na proteína, mas permanecem frações de albumina-2, glutelina e globulina. Essas frações possuem maior estabilidade térmica, e, possivelmente, também estão presentes nos isolados proteicos oriundos do grão processado termicamente.

O processamento parece ter afetado nas distribuições de frações nos IP, principalmente no extrusado, onde aparecem somente quatro frações; em contrapartida no tostado aparecem seis frações. Segundo VAZ e ARÊAS (2010), no processo de extrusão ocorre uma rápida reorganização de macromoléculas desnaturadas, o que pode explicar a diferença de frações proteicas observadas.

As frações mais contribuintes no IP de farinha crua são as proteínas de peso molecular: 52,7; 30,6 e 24,9 kDa, com correspondentes densidades de 13,9; 25,9 e 30,1 %. No IP de farinha tostada são as frações de: 54,5; 31,3 e 24,9 kDa e densidades respectivas de 11,8; 25,6 e 34,6 %. Já no IP de farinha extrusada, são as frações de: 42,3; 31 e 24,5 kDa e densidades de 14; 42,1 e 31,6 %, respectivamente. Resultados sumarizados na **Tabela 5**.

Tanto nas farinhas quanto nos isolados proteicos foram encontradas as proteínas principais do grão de amaranto.

Tabela 5. Frações* proteicas da farinha do grão de amaranto extrusada, tostada e crua e de seus respectivos isolados proteicos.

Padrão		Extrusado				Tostado				Cru			
		IP		Farinha		IP		Farinha		IP		Farinha	
(kDa)	(%)	(kDa)	(%)	(kDa)	(%)	(kDa)	(%)	(kDa)	(%)	(kDa)	(%)	(kDa)	(%)
250	8,64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	210	3,45	-	-	-	-
150	7,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	11,9	-	-	-	-	-	-	95,1	4,00	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	86,5	5,43
75	12,7	-	-	-	-	-	-	-	-	73,1	5,87	-	-
		-	-	71,5	4,64	-	-	69,0	2,89	68,5	3,80	-	-
		-	-	63,9	2,64	-	-	-	-	-	-	-	-
		55,9	12,2	54,8	13,2	54,5	11,7	54,0	10,6	-	-	54,0	21,4
50	15,5	-	-	-	-	-	-	-	-	52,6	13,9	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	47,7	5,24	-	-
		42,3	14,0	-	-	43,1	9,85	43,5	8,69	-	-	-	-
		-	-	40,5	10,3	40,3	10,2	-	-	39,2	5,42	39,8	11,8
37	21,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	35,7	10,2	36,0	7,96	35,4	10,3	35,3	9,78	35,6	9,01
		31,0	42,1	31,2	29,5	31,2	25,5	31,0	27,6	30,6	25,8	31,0	29,8
		-	-	26,0	12,4	-	-	-	-	-	-	-	-
25	22,4	24,4	31,6	24,7	16,9	24,9	34,5	25,1	32,4	24,9	30,1	25,0	22,3

*Separação das frações por peso molecular em kDa e densidade em porcentagem (%).

Não foi possível separar e identificar frações proteicas nos hidrolisados oriundos do grão de amaranto cru e processado, pois o perfil eletroforético foi substancialmente modificado. O método utilizado é incapaz de detectar polipeptídeos com massa menor que 20 kDa (**Figura 5**).

Figura 5. Foto do gel de eletroforese de hidrolisado proteico de amaranto.

Separação de peso molecular em kDa. Amostras: (P) padrão, (Hc) hidrolisado proteico de farinha crua, (Ht) hidrolisado proteico de farinha tostada e (He) hidrolisado proteico de farinha extrusada.

Os perfis dos hidrolisados monitorados por HPLC, podem ser observados nas **Figuras 6, 7e 8**. É possível visualizar a existência de vários picos até aproximadamente os 20 minutos iniciais de corrida, principalmente no IPHt, confirmando a existência de ligações peptídicas nos hidrolisados. Baseado no gradiente de eluição pode-se afirmar que o IPHc e IPHe possuem peptídeos polares e apolares, diferentemente do IPHt que são em sua maioria polares.

Figura 6. Cromatogramas a 220 nm sobrepostos de Branco, linha azul e Hcru, linha verde.

Branco: enzimas pepsina e pancreatina; Hcru: hidrolisado proteico da farinha crua.

Figura 7. Cromatogramas a 220 nm sobrepostos de Branco, linha azul e Hextr, linha verde.

Branco: enzimas pepsina e pancreatina; Hextr: hidrolisado proteico da farinha extrusada.

Os cromatogramas dos hidrolisados proveniente de farinha crua e extrusada são semelhantes. Apresentam uma pequena quantidade de picos, com perfil equilibrado de peptídeos com características polares e apolares. O cromatograma do IPHt se apresenta bem complexo, a hidrólise parece ter liberado mais fragmentos peptídicos do que nas outras amostras, predominando o perfil polar.

Essa diferença entre os cromatogramas, também se deve pela falta de padronização nas concentrações, o IPHt tem aproximadamente o dobro da concentração dos demais.

Figura 8. Cromatogramas a 220 nm sobrepostos de Branco, linha azul e Htost, linha verde.

Branco: enzimas pepsina e pancreatina; Htost: hidrolisado proteico da farinha tostada.

5.5. EFEITO DO HIDROLISADO PROTEICO NA SOLUBILIDADE MICELAR DE COLESTEROL

Ao avaliar o efeito do hidrolisado na solubilização micelar de colesterol, foi observado que houve diferença ($p < 0,004$) proveniente do processamento. O IPHc com peso molecular maior que 3 kDa, reduziu em $44,09 \pm 1,5 \%$, enquanto que o IPHt e IPHe reduziram em $31,2 \pm 5,9 \%$ e $25,0 \pm 4,1 \%$, respectivamente (**Figura 9**). Já os hidrolisados com peso molecular menor que 3 kDa apresentaram pouca diferença ($p < 0,03$) em relação ao processamento. A redução da solubilidade micelar observada pelos IPHc e IPHe foram semelhantes: $37,2 \pm 1,65 \%$ e $35,5 \pm 0,4 \%$, respectivamente. O IPHt apresentou a menor redução de $22,5 \pm 4,6 \%$ (**Figura 10**).

Figura 9. Efeito do IPH do grão de amaranto sobre a solubilidade micelar de colesterol.

* Representa diferença estatística entre as amostras; $p \leq 0,05$.

Figura 10. Efeito do IPH de baixo peso molecular do grão de amaranto sobre a solubilidade micelar de colesterol

* Representa diferença estatística entre as amostras; $p \leq 0,05$.

O menor efeito do IPH processado pode ser atribuído à perda de aminoácidos hidrofóbicos como cisteína, isoleucina, triptofano e valina. A mudança na composição de aminoácidos resultou numa modificação na formação de peptídeos, neste caso, acarretou de forma negativa na interação com os sais biliares e na competição com o colesterol presentes nas micelas. Nota-se que os peptídeos de menor peso molecular correspondem pela maior parte responsável por este efeito. TIENGO *et al.* (2011) avaliaram produtos do amaranto (*A. cruentus*) como: farinha desengordurada, concentrado proteico, hidrolisado proteico e resíduo alcalino sobre a capacidade de ligação a ácidos biliares e verificou capacidade de ligação similar para todas as amostras, em

torno de 20 %. Pode-se atribuir este valor à grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos encontrados nas amostras. CHO *et al.* (2007) obtiveram valores semelhantes para peptídeos derivados de soja.

Peptídeos com resíduos de aminoácidos com N-terminal hidrofóbico e C-terminal hidrofílico, ou seja, com uma estrutura anfipática favorecem a associação com fosfolípidios, agindo na integridade da micela com consequente redução da solubilidade micelar de colesterol (HOWARD e UDENIGWE, 2013). Embora existam dados contundentes acerca da redução da solubilidade micelar do colesterol em contato com peptídeos bioativos, não se pode descartar a existência de outros compostos no isolado proteico, como lípides e polifenóis, que também são substâncias conhecidas por atuar em micelas mistas. A exemplo, o ácido gálico, que é capaz de reduzir a formação de micelas, em percentagem similar ao hidrolisado proteico de amaranto (NGAMUKOTE *et al.*, 2011).

5.6. EFEITO DO HIDROLISADO PROTEICO SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA HMGR

Os hidrolisados da farinha de amaranto também foram capazes de inibir a atividade da enzima HMGR em diversas concentrações. O controle da atividade normal da enzima apresentou $0,65 \pm 0,05$ de μmol de NAPH oxidada min/mg em equivalente de albumina. O IPHc, em quantidades de 0,1 e 0,5 mg/mL, apresentou efeito similar ao da pravastatina, diferindo do controle ($p < 0,05$), produzindo: $0,24 \pm 0,03$ e $0,29 \pm 0,1$, valor estatisticamente igual ao da pravastatina: $0,12 \pm 0,02$ de μmol de NAPH oxidada min/mg em equivalente

de albumina. Porém a concentração maior de IPHc não diferiu do controle, pois produziu $0,58 \pm 0,1$ de μmol de NAPH oxidada min/mg equivalente de albumina (**Figura 11**).

Figura 11. Efeito do IPHc do grão de amaranto sobre a inibição da atividade enzimática da HMGR.

* Representa diferença estatística; $p \leq 0,05$.

Por outro lado o IPHt apresentou efeito similar ao da pravastatina em quantidade superior ao cru; em 1 mg/mL produziu $0,20 \pm 0,09$ em 5 mg/mL, que também demonstrou ter um bom efeito, produziu $0,32 \pm 0,06$ de μmol de NAPH oxidada min/mg em equivalente de albumina. Já a menor concentração, equivalente a pravastatina, não demonstrou efeito, pois produziu $0,51 \pm 0,08$ de μmol de NAPH oxidada min/mg em equivalente de albumina (**Figura 12**).

Figura 12. Efeito do IPHt do grão de amaranto sobre a inibição da atividade enzimática da HMGR.

* Representa diferença estatística; $p \leq 0,05$.

O IPHe apresentou efeito inibidor da enzima na concentração de 0,1 mg/mL, pois produziu $0,4 \pm 0,01$ de μmol de NAPH oxidada min/mg em equivalente de albumina, porém esta concentração não teve efeito similar ao da pravastatina. As concentrações de IPHe 0,5 e 1 mg/mL não demonstraram efeito, produziram valores de NAPH oxidada similares ao controle, no qual correspondiam a $0,46 \pm 0,16$ e $0,55 \pm 0,08$ de μmol de NAPH oxidada min/mg em equivalente de albumina. A concentração intermediária de IPHe poderia revelar algum efeito se o desvio-padrão da análise fosse menor (**Figura 13**).

Figura 13. Efeito do IPHe do grão de amaranto sobre a inibição da atividade enzimática da HMGR.

* Representa diferença estatística; $p \leq 0,05$.

Os hidrolisados apresentaram satisfatória porcentagem de inibição da atividade enzimática. Nas quantidades de 0,1, 0,5 e 1 mg/mL, os hidrolisados proteicos reduziram a atividade da enzima, nas respectivas concentrações, em: 63,7 %, 55,8 % e 21,2 % no IPHc; 27,8 %, 50,9 % e 69,1 % no IPHt; e 38,2 %, 28,9 % e 29,3 % no IPHe (**Figura 14**).

Os hidrolisados correspondentes às farinhas: crua e tostada apresentam um sugestivo comportamento dependente da dose utilizada. As duas amostras quando comparadas entre si demonstram uma linearidade inversa, sendo a primeira, decrescente e a segunda, crescente. Já o hidrolisado oriundo de farinha extrusada não demonstra este comportamento.

Figura 14. Porcentagem de inibição da atividade enzimática HMGR dos hidrolisados proteicos em diferentes concentrações.

PAK *et al.* (2006) verificaram que peptídeos que contêm resíduos de ácido glutâmico desempenham um papel chave no reconhecimento no sítio ativo da enzima HMGR. Observaram também que o peptídeo YVAE possui alta afinidade pela enzima e que a inibição ocorre de forma competitiva em relação à HMG-CoA. Fato que pode justificar a inibição ocorrida pelos hidrolisados proteicos do amaranto, já que o ácido glutâmico é o maior componente presente dentre os aminoácidos.

A inibição desta enzima é fundamental para a redução da hipercolesterolemia, pois esta ação acarreta no aumento de receptores de LDL, consequentemente melhora os níveis de LDL-c plasmático (HAINES *et al.*, 2013).

Não foram encontrados relatos na literatura acerca da inibição da atividade enzimática HMGR e proteína do grão de amaranto. Entretanto, os percentuais de inibição observados corroboram com os ensaios realizados com outros vegetais. GIL-RAMÍREZ *et al.* (2013) avaliaram o extrato metanólico de cogumelo (*A. bisporus*) e verificaram que numa concentração de 1 mg/ μ L inibem em média 60 % a atividade da HMGR. GHOLAMHOSEINIAN *et al.* (2010) demonstraram que diversos extratos metanólicos de vegetais inibiram em média 40 % a atividade enzimática. Em relação aos extratos vegetais estudados por esses autores, o grão de amaranto possui um potencial maior em inibir a atividade da HMGR, pois em concentrações de 0,5 mg/mL os hidrolisados proteicos de amaranto cru e tostado tiveram um percentual de inibição maior que 50%. Hipoteticamente, se fossem utilizados extratos do grão de amaranto nos ensaios, o percentual de inibição poderia ser mais elevado.

6. CONCLUSÃO

Foi possível obter as formas tostadas e extrusadas do grão, bem como obter um isolado proteico do grão de amaranto cru com pureza entre 53 % e 93 %. O processamento térmico altera as características estruturais da proteína, dependendo das condições nas quais é feito o processamento, diminui drasticamente o rendimento final no isolamento proteico..

A composição centesimal do grão de amaranto cru está de acordo outros estudos realizados, o grão processado apresentou valores de proteína mais elevados, o que demonstra alteração estrutural da matéria pelo aquecimento.

O aquecimento, mas principalmente a extrusão, alterou o perfil de aminoácidos existentes no grão cru, mas não comprometeu a qualidade proteica.

A proteína do grão de amaranto hidrolisada com pepsina e pancreatina apresentou indícios de atividade hipocolesterolêmica. Sendo capaz de atuar tanto na via exógena quanto na via endógena, podendo contribuir com a inibição da absorção do colesterol e sua síntese de forma indireta. O processamento térmico diminuiu esta capacidade, mas ainda demonstra resultados favoráveis. Dentre os processamentos, a extrusão merece o menor destaque, embora os seus resultados possam ter sido influenciados pela quantidade de componentes no isolado proteico, como lipídeos e compostos fenólicos.

Análises adicionais, como mapeamento de peptídeos do amaranto envolvidos nessas ações hipocolesterolêmicas, bem como estudos de biodisponibilidade e interferência na cinética enzimática são necessários para melhor elucidar esses mecanismos de inibição.

7. REFERÊNCIAS

- ABUGOCH, L. E.; MARTÍNEZ, N. E.; AÑÓN, M. C. Influence of pH on structure and function of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. **Cereal Chemistry**, v. 87, n. 5, p. 448-453, 2010.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- ALVAREZ-JUBETE, L.; ARENDT, E. K.; GALLAGHER, E. Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, p. 240-257, 2009.
- AMAYA-FARFAN, J.; MARCÍLIO, R.; SPEHAR, C. R. Deveria o Brasil investir em novos grãos para sua alimentação? A proposta do amaranto (*Amaranthus sp.*). **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 12, p. 47-56, 2005
- AOAC. **Official methods of analysis of the Association Chemistry**. Ed. 18^o. Gaithersburg, USA: AOAC, 2010.
- AVANZA, M. V.; AÑÓN, M. C. Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 4, p. 616-623, 2007.
- BECKER, R. et al. A compositional study of amaranth grain. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 4, p. 1175-1180, 1981.
- BORODIN, E. A. et al. Effects of Two-Month Consumption of 30 g a Day of Soy Protein Isolate or Skimmed Curd Protein on Blood Lipid Concentration in Russian Adults with Hyperlipidemia. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 55, n. 6, p. 492-497, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **A vigilância, o controle e a prevenção das Doenças Crônicas Não Transmissíveis: DCNT no contexto do Sistema Único de Saúde brasileiro - situações e desafios atuais**. Brasília-DF, Brasil: Organização Pan-Americana de Saúde, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Saúde Brasil: uma análise da situação de saúde**. Brasília-DF, Brasil: 2009
- BRESSANI, R.; ELIAS, L. G.; GARCIA-SOTO, A. Limiting amino acids in raw and processed amaranth grain protein from biological tests. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 39, n. 3, p. 223-234, 1989.
- BRESSANI, R. et al. Yield, selected chemical-composition and nutritive-value of 14 selections of amaranth grain representing 4 species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 38, n. 4, p. 347-356, 1987.
- BRESSANI, R.; LIGORRIA, L. Effect of lime cooking of grain amaranth oil selected chemical-components and one its protein-quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 9, p. 1998-2001, 1994.

BÜCHMANN, N. B. In vitro digestibility of protein from barley and other cereals. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, n. 6, p. 583-589, 1979.

CASTRO, L. Í. A. et al. Amaranth oil increased fecal excretion of bile acid but had no effect in reducing plasma cholesterol in hamsters. **Lipids**, v. 48, n. 6, p. 609-618, 2013.

CHO, S. J.; JUILLERAT, M. A.; LEE, C. H. Cholesterol lowering mechanism of soybean protein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10599-10604, 2007.

CHÁVEZ-JÁUREGUI, R. N. et al. Effects of defatted amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) snacks on lipid metabolism of patients with moderate hypercholesterolemia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1007-1010, 2010.

COHN, J. S. et al. Reduction in intestinal cholesterol absorption by various food components: Mechanisms and implications. **Atherosclerosis Supplements**, v. 11, n. 1, p. 45-48, 2010.

CORDERO-DE-LOS-SANTOS, M. et al. Physicochemical and functional characterisation of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 4, p. 269-280, 2005.

CZERWINSKI, J. et al. Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 10, p. 622-629, 2004.

DZIUBA, J.; IWANIAK, A.; MINKIEWICZ, P. Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides. **Polimery**, v. 48, n. 1, p. 50-53, 2003.

ERDMANN, K.; CHEUNG, B. W. Y.; SCHRODER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 10, p. 643-654, 2008.

FAO/WHO. **Protein Quality Evaluation: Report of the joint FAO/WHO expert consultation**: Food and Agriculture Organization of the United Nations Roma, Itália: 1991.

FARREL, R.J.; KELLY, C.P. Current concepts: celiac sprue. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 3, p. 180-188, 2002.

FERREIRA, T. A. P. C.; ARÊAS, J. A. G. Protein biological value of extruded, raw and toasted amaranth grain. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 34, n. 1, p. 53-59, 2004.

FERREIRA, T. A. P. D. C.; MATIAS, A. C. G.; ARÊAS, J. A. G. Características funcionais e nutricionais do amaranto (*Amaranthus spp.*). **Nutrire**, v. 32, n. 2, p. 91-116, 2007.

FROTA, K. M. G. et al. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. H235-H240, 2008.

GAMEL, T. H. et al. Nutritional study of raw and popped seed proteins of *Amaranthus caudatus* L and *Amaranthus cruentus* L. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 10, p. 1153-1158, 2004.

GAMEL, T. H. et al. Effect of seed treatments on the chemical composition and properties of two amaranth species: starch and protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 2, p. 319-327, 2005.

GHOLAMHOSEINIAN, A.; SHARIFI-FAR, F.; SHAHOUEHI, B. Inhibitory activity of some plant methanol extracts on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. **International Journal of Pharmacology**, 2010.

GIL-RAMÍREZ, A. et al. Study on the 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA reductase inhibitory properties of *Agaricus bisporus* and extraction of bioactive fractions using pressurised solvent technologies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 11, p. 2789-2796, 2013.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343, n. 6257, p. 425-430, 1990.

GOODMAN, B. E. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. **Advances in Physiology Education**, v. 34, n. 2, p. 44-53, 2010.

GUZMÁN-MALDONADO, H.; PAREDES-LÓPEZ, O. Production of high-protein flour and maltodextrins from amaranth grain. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 4, p. 289-293, 1994.

HAINES, B. E.; WIEST, O.; STAUFFACHER, C. V. The Increasingly Complex Mechanism of HMG-CoA Reductase. **Accounts of chemical research**, 2013.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 163-169, 2007.

HORI, G. et al. Soy protein hydrolyzate with bound phospholipids reduces serum cholesterol levels in hypercholesterolemic adult male volunteers. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 72-78, 2001.

HOWARD, A.; UDENIGWE, C. C. Mechanisms and prospects of food protein hydrolysates and peptide-induced hypolipidaemia. **Food & Function**, v. 4, n. 1, p. 40-51, 2013.

IKONEN, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 125-138, 2008.

IQBAL, A. et al. Nutritional quality of important food legumes. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 331-335, 2006.

IQBAL, J.; HUSSAIN, M. M. Intestinal lipid absorption. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 296, n. 6, p. E1183-E1194, 2009.

JESCH, E. D.; CARR, T. P. Sitosterol reduces micellar cholesterol solubility in model bile. **Nutrition Research**, v. 26, n. 11, p. 579-584, 2006.

JO, Y.; DEBOSE-BOYD, R. A. Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, n. 3, p. 185-198, 2010.

KIRANA, C. et al. Naturally derived micelles for rapid in vitro screening of potential cholesterol-lowering bioactives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4623-4627, 2005.

KONISHI, Y. et al. Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of physicochemical properties and the putative localization in the grains. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.55, n. 11, p.1745-1750, 1991.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LORENZ, K.; WRIGHT, B. Phytate and tannin content of amaranth. **Food Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 27-34, 1984.

MAIER, S. M.; TURNER, N. D.; LUPTON, J. R. Serum lipids in hypercholesterolemic men and women consuming oat bran and amaranth products 1. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 3, p. 297-302, 2000.

MARRINK, S. J.; MARK, A. E. Molecular dynamics simulations of mixed micelles modeling human bile. **Biochemistry**, v. 41, n. 17, p. 5375-5382, 2002.

MARTINEZ, E. N.; CASTELLANI, O. F.; ANON, M. C. Common molecular features among amaranth storage proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 3832-3839, 1997.

MARTIROSYAN, D. M. et al. Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. **Lipids Health Disease**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2007.

MARTÍNEZ, E. N.; AÑÓN, M. C. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2523-2530, 1996.

MEGIAS, C. et al. Stability of sunflower protein hydrolysates in simulated gastric and intestinal fluids and Caco-2 cell extracts. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 1496-1500, 2009.

MENDONÇA, S. et al. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 738-742, 2009.

MENDOZA, C.; BRESSANI, R. Nutritional and functional characteristics of extrusion-cooked amaranth flour. **Cereal Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 218-222, 1987.

MÖLLER, N. P. et al. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 171-182, 2008.

MUJICA-SÁNCHEZ, A.; BERTI-DÍAZ, M.; IZQUIERDO, J. **El cultivo del amaranto (*Amaranthus spp.*): producción, mejoramiento genético y utilización**. In: FAO, Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile:1997.

NAGAOKA, S. et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 281, n. 1, p. 11-17, 2001.

NAGAOKA, S. et al.. Soystatin (VAWWMY), a novel bile acid-binding peptide, decreased micellar solubility and inhibited cholesterol absorption in rats. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, n. 8, p. 1738-1741, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Lost crops of the Incas: Little-known plants of the Andes with promise for the worldwide cultivation**. Washington, USA: National Academy Press, 1989.

NGAMUKOTE, S. et al. Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 5054-5061, 2011.

PAK, V. V. et al. Peptide design of a competitive inhibitor for HMG-CoA reductase based on statin structure. **Biopolymers**, v. 84, n. 6, p. 586-594, 2006.

PAK, V. V. et al. Structure-activity relationships of the peptide Ile-Ala-Val-Pro and its derivatives revealed using the semi-empirical AM1 method. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n. 4, p. 454-460, 2005b.

PAK, V. V. et al. Hypocholesterolemic soybean peptide (IAVP) inhibits HMG-CoA reductase in a competitive manner. **Food Science and Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 727-731, 2005a.

PAREDES-LÓPEZ, O.; MORA-ESCOBEDO, R.; ORDORICA-FALOMIR, C. Isolation of amaranth proteins. **Lebensmittel-Wissenschaft+ Technologie**, v. 21, n. 1, p. 59-61, 1988..

PASKO, P. Analysis of Selected Phenolic Acids and Flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* Seeds and Sprouts by HPLC. **Acta Chromatographica**, v. 20, n. 4, p. 661-672, 2008.

PLATE, A. Y. A.; AREAS, J. A. G. Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits. **Food Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 1-6, 2002.

PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H.; AREAS, 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.

RASTOGI, A.; SHUKLA, S. Amaranth: A New Millennium Crop of Nutraceutical Values. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 2, p. 109-125, 2013.

ROBERTSON, K. R. The General of Amarantaceae in the south eastern United States. **Journal of The Arnold Arboretum**, v. 62, n. 3, p. 47, 1981.

ROMERO-ZEPEDA, H.; PAREDES-LOPEZ, O. Isolation and characterization of amarantin, the 11S amaranth seed globulin. **Journal of Food Biochemistry**, v. 19, n. 5, p. 329-339, 1995.

SALCEDO-CHÁVEZ, B. et al. Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6515-6520, 2002.

SEGURA-NIETO, M. et al. Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1553-1558, 1992.

SEVERIN, S.; XIA, W. S. Milk biologically active components as nutraceuticals: Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 7-8, p. 645-656, 2005.

SOARES, R. A. M. **Identificação de peptídeos hipocolesterolemizantes do isolado protéico do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria).** Dissertação de Mestrado. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo: 2008.

SOSULSKI, F. W.; IMAFIDON, G. I. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 6, p. 1351-1356, 1990.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 1412-1416, 1967.

SWERGOLD, G. D.; RUBIN, C. S. High-performance gel-permeation chromatography of polypeptides in a volatile solvent - rapid resolution and molecular-weight estimations of proteins and peptides on a column of TSK-G3000-PW. **Analytical Biochemistry**, v. 131, n. 2, p. 295-300, 1983.

TAKENAKA, Y. et al. Enterostatin (VPDPR) and its peptide fragment DPR reduce serum cholesterol levels after oral administration in mice. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 7, p. 1620-1622, 2003.

TIENGO, A.; MOTTA, E. M. P.; NETTO, F. M. Chemical Composition and Bile Acid Binding Activity of Products Obtained from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) Seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 66, n. 4, p. 370-375, 2011.

TIRONI, V. A.; AÑÓN, M. C. Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 315-322, 2010.

TOMOSKOZI, S. et al. Comparative study of composition and technological quality of amaranth i. gross chemical composition, amino acid and mineral content. **Acta Alimentaria**, v. 38, n. 3, p. 341-347, 2009.

TOVAR, L. R. et al. Dry heat popping of amaranth seed might damage some of its essential amino acids. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 39, n. 4, p. 299-309, 1989.

TOVAR-PÉREZ, E. et al. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 437-444, 2009.

VAN DER WULP, M. Y.; VERKADE, H. J.; GROEN, A. K. Regulation of cholesterol homeostasis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 368, n. 1, p. 1-16, 2013.

VAZ, L. C. M. A.; AREAS, J. A. G. Recovery and upgrading bovine rumen protein by extrusion: Effect of lipid content on protein disulphide cross-linking, solubility and molecular weight. **Meat Science**, v. 84, n. 1, p. 39-45, 2010.

VIJAYALAKSHMI, M.; LEMIEUX, L.; AMIOT, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 9, n. 16, p. 3559-3576, 1986.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva: 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2008: reducing risks, promoting healthy life**. Geneva, Suíça: 2008.

WILSON, M. D.; RUDEL, L. L. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. **Journal of Lipid Research**, v. 35, n. 6, p. 943-955, 1994.

WOOLLETT, L. A. et al. Micellar solubilisation of cholesterol is essential for absorption in humans. **Gut**, v. 55, n. 2, p. 197-204, 2006.

XIA, Y. et al. Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1509-1518, 2012.

YÁNEZ, E. et al. [Chemical and nutritional characterization of amaranthus (*Amaranthus cruentus*)]. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 44, n. 1, p. 57-62, 1994.

ZHANG, H.; YOKOYAMA, W. H.; ZHANG, H. Concentration-dependent displacement of cholesterol in micelles by hydrophobic rice bran protein hydrolysates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 7, p. 1395-1401, 2012.

ANEXO

Amanda Caroline Cardoso Corrêa Carlos Menezes

- Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1248784524849677>
- Última atualização do currículo em 13/11/2013

Nome: Amanda Caroline Cardoso Corrêa Carlos Menezes

Nome em citações bibliográficas: CARLOS, A. C. C. C.; CARLOS-MENEZES, A. C. C. C.

Sexo: feminino

Endereço Profissional:

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.

Avenida Dr. Arnaldo, 715

Cerqueira César

01246904 - São Paulo, SP - Brasil

URL da Homepage: <http://www.nutricao.fsp.usp.br/funcionais>

2011-2013

Mestrado em Nutrição em Saúde Pública.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Efeito do hidrolisado proteico do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS Alegria) processado na solubilização micelar do colesterol e inibição da HMGR.

Orientador: José Alfredo Gomes Arêas.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Ciência dos Alimentos.

Setores de atividade: Atividades profissionais, científicas e técnicas; Pesquisa e desenvolvimento científico.

2005 - 2009

Graduação em Nutrição.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

José Alfredo Gomes Arêas

- Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1B
- Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5885518243056121>
- Última atualização do currículo em 13/11/2013

Nome: José Alfredo Gomes Arêas

Nome em citações bibliográficas: ARÊAS, J. A. G.; Areas, J. A. G.; Arêas, J. A. G.; Arêas, José A. G.; Areas, Jose A. G.; ARÊAS, JOSÉ ALFREDO GOMES

Sexo: Masculino

Endereço Profissional:

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição.

Av. Dr. Arnaldo, 715

Cerqueira César

01246904 - São Paulo, SP - Brasil

Telefone: (11) 30617858

Fax: (11) 30617705

URL da Homepage: <http://www.nutricao.fsp.usp.br/funcionais>

1986

Livre-docência.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Interrelação entre estrutura e textura de isolados proteicos de pulmão bovino, Ano de obtenção: 1986.

Palavras-chave: Propriedades Funcionais; Interação lípide-proteína; Extrusão termoplástica; Espectroscopia de Alimentos; Atividade de água; Proteínas alimentares.

Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Tecnologia de Alimentos / Especialidade: Aproveitamento de Subprodutos.

Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Tecnologia de Alimentos / Especialidade: Tecnologia de Produtos de Origem Animal.

Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos / Especialidade: Propriedades Funcionais de Alimentos.

Setores de atividade: Nutrição e Alimentação; Produção Animal, Inclusive Serviços Veterinários; Fabricação de Equipamentos de Instrumentação Médico-Hospitalares, Instrumentos de Precisão e Ópticos, Equipamentos Para Automação Industrial, Cronômetros e Relógios.

1990 - 1993

Pós-Doutorado.

University of Oxford.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biofísica / Subárea: Biofísica Molecular.

Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos / Especialidade: Propriedades Funcionais de Alimentos.

Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos / Especialidade: Química, Física, Fisico-Química e Bioquímica dos Alim. e das Mat-Primas Alimentares.

1980 - 1983

Doutorado em Food Science.

University of Nottingham, NOTTINGHAM, Inglaterra.

Título: Influence of Lipid-protein Interactions on Characteristics of Extruded Offal Protein, Ano de obtenção: 1983.

Orientador: Ralston A Lawrie.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Palavras-chave: Food Protein; Extrusion of Protein; Recovery of Abattoir; Functional Properties; Novel Products; Protein Upgrade.

Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Tecnologia de Alimentos / Especialidade: Aproveitamento de Subprodutos.

Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos / Especialidade: Química, Física, Fisico-Química e Bioquímica dos Alim. e das Mat-Primas Alimentares.

Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos / Especialidade: Propriedades Funcionais de Alimentos.

Setores de atividade: Nutrição e Alimentação; Produção Animal, Inclusive Serviços Veterinários; Produtos e Processos Biotecnológicos.

1974 - 1979

Mestrado em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Transformações do amido na banana nanica (*Musa acuminata* L.): Papel da fosforilase e fosfatase, Ano de Obtenção: 1979.

Orientador: Franco Maria Lajolo.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Palavras-chave: Amadurecimento; Amido; Banana; Fisiologia Pós-colheita.

Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos / Especialidade: Química, Física, Físico-Química e Bioquímica dos Alim. e das Mat-Primas Alimentares.

Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos / Especialidade: Fisiologia Pós-Colheita.

Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos.

Setores de atividade: Produção Vegetal.

1969 - 1973

Graduação em Farmácia e Bioquímica.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.