Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Avaliação de biodisponibilidade e mecanismos
de ação hipocolesterolemizante de peptídeos do
amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria)**

Rosana Aparecida Manólio Soares Freitas

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Nutrição em Saúde Pública para
obtenção do título de Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Nutrição

Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

São Paulo
2017

**Avaliação de biodisponibilidade e mecanismos
de ação hipocolesterolemizante de peptídeos do
amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria)**

Rosana Aparecida Manólio Soares Freitas

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Nutrição em Saúde Pública da
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências.**

**Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes
Arêas**

Versão corrigida

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A meus pais, por zelarem por mim e guiarem
meu caminho, em todos os momentos.

A Luciano e Yasmin, por serem minha
alegria. Vocês são o complemento da minha
vida.

A Deus, por tudo.

Agradecimentos

Agradeço a todos os meus familiares pelo incentivo e dedicação em todos os momentos do meu trabalho e da minha vida.

Ao Professor José Alfredo, por 15 anos de orientação e rica convivência. Tentei aprender ao máximo seus ensinamentos, sob vários aspectos, ao longo deste período. Espero continuar desfrutando de sua sabedoria.

Aos professores do Departamento de Nutrição pela oportunidade dada para execução deste trabalho e pelo suporte enquanto funcionária, em especial às professoras Elizabeth Torres e Deborah Bastos.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões de melhoria durante o trabalho e proveitosa contribuição na correção ao final dele.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e da pós-Graduação pelo auxílio e amizade de sempre, especialmente Alessandra, Bastos, Cintia, Eduardo, Jonathan, José Bezerra, Roseli e Vânia.

Ao Centro de Bioterismo do Instituto de Medicina Tropical e ao Biotério Central da Faculdade de Medicina, ambos da USP, pela permissão do uso de suas instalações. Um agradecimento especial aos funcionários Maria Luisa e Clóvis (FM) e Talita e Andrea (IMT), pela gentileza e presteza durante as experimentações.

Ao Dr. Daniel Pimenta, pelas inúmeras análises no espectrômetro de massas, debates a respeito das metodologias e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A Aritania e Valeria, pelo auxílio durante as análises realizadas nos laboratórios da Faculdade de Medicina da USP.

Às amigas de todas as horas, Geni e Liania, pelos apoios técnico, científico, moral e psicológico. Vocês são essenciais, sempre.

Aos antigos amigos de laboratório, incluindo Andrea, Aurea, Carol Conti, Emilia, Karina, Marcela, Nara, Rosa Nilda, Simone, Vanessa, Yara, dentre tantos outros. Vocês me ajudaram a descobrir o prazer em fazer Ciência.

Aos atuais amigos de laboratório, em especial Amanda, Bianka, Cintia e Marcelo. Além da convivência divertida agradeço pela cooperação, incentivo e paciência. Vocês são demais.

A FAPESP e ao CNPq pelos auxílios à pesquisa que possibilitaram a realização deste trabalho.

Muitas pessoas contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse executado, seria impossível citar todas. Deixo meu sincero agradecimento a todos.

Não se deve ir atrás de objetivos fáceis. É preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.

O impossível existe até quando alguém duvide dele e prove o contrário.

Albert Einstein

Resumo

SOARES-FREITAS, R.A.M. Avaliação de biodisponibilidade e mecanismos de ação hipocolesterolemizante de peptídeos do amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria). [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, USP, 2017.

Introdução: Doenças cardiovasculares constituem importante causa de morte em todo mundo e a hipercolesterolemia está diretamente relacionada a este problema de saúde pública. A dieta desempenha papel importante neste processo e alguns alimentos, como o amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria), têm mostrado capacidade de redução do colesterol plasmático. Estudos sugerem que este efeito está relacionado a peptídeos liberados durante a digestão das proteínas, os quais atuam na modulação do metabolismo lipídico. Considerando-se que os efeitos da digestão gastrointestinal e da absorção destes peptídeos são claramente complexos torna-se importante a realização de estudos visando avaliar bioacessibilidade e mecanismos de ação destes peptídeos nos locais alvo do organismo. **Objetivo:** Analisar a biodisponibilidade de peptídeos em modelos animais após ingestão de isolado proteico de amaranto e relacioná-la com parâmetros ligados ao metabolismo do colesterol. **Métodos:** O amaranto teve sua proteína isolada. Os peptídeos da proteína do amaranto foram analisados após digestão *in vitro*. Dois experimentos *in vivo* foram conduzidos: um de fase aguda e outro de média duração. No primeiro, o isolado proteico de amaranto foi administrado a ratos e os peptídeos no sangue foram monitorados por 2 horas para verificação de fragmentos que resistissem à digestão gastrointestinal. O experimento *in vivo* 2 consistiu na alimentação de 3 grupos de hamster, um com dieta recomendada pela AIN93 (grupo N) e dois com dietas hipercolesterolêmicas por 21 dias, contendo a proteína de amaranto como única proteína da ração (grupo I), comparada ao controle de caseína (grupo H). Neste experimento foram analisados no plasma: peptídeos, colesterol total e frações; nas fezes: colesterol total e ácidos biliares; no fígado: colesterol, lipídeos totais, ácidos graxos, atividade enzimática da Hmgcr, expressão de *Hmgcr*, *Srebf2*, *Lxra*, *Abca1*, *Abcg8* e *Ampk*. **Resultados e discussão:** Foram identificados

fragmentos peptídicos provenientes da digestão *in vitro* do isolado proteico de amaranto, e outras dezenas de sequencias peptídicas em ratos após administração aguda de amaranto foram analisadas. Destaca-se a identificação do peptídeo ALGV, presente em proteína do amaranto de acordo com banco de dados, e similar a fragmentos com ação hipocolesterolemizante. No sangue de hamsters foram encontrados seis peptídeos com 100% de cobertura e similaridade a base de dados de proteínas de amaranto, merecendo investigação sobre seus efeitos. Verificou-se que o isolado proteico de amaranto foi capaz de suprimir a hipercolesterolemia quando a dieta hipercolesterolemizante foi introduzida em paralelo a este ingrediente, com valores inferiores em 72% (triglicerídeos), 64% (colesterol total), 80% (LDL-c) do grupo I em relação ao grupo H. Foi observada ainda menor concentração de colesterol e lipídeos totais no fígado dos animais do grupo I em relação ao grupo H (177 x 464 mg de colesterol/100 g de tecido; 2,06 x 2,86 g de lipídeos/100 g de tecido, respectivamente). Parâmetros lipídicos do sangue, das fezes e do fígado foram similares aos do grupo N, cuja dieta seguiu a preconização para roedores. Foi observada maior excreção de colesterol total no grupo I em relação ao grupo H, mas não houve maior excreção de ácidos biliares nas fezes. Não houve mudança na expressão dos genes analisados neste estudo, mas o amaranto reduziu a atividade da enzima Hmgcr. Postula-se que parâmetros como expressão de Ldlr e atividade da Acat sejam alterados pela ingestão de amaranto. O perfil de ácidos graxos também foi modificado de forma a se assimilar ao grupo N, porém deve-se verificar parâmetros inflamatórios devido à maior proporção de ácido araquidônico em relação aos demais grupos estudados. **Conclusão:** Verifica-se biodisponibilidade dos peptídeos do amaranto e ação hipocolesterolemizante e hipolipemiante em diversas vias metabólicas, promovendo proteção cardiovascular.

Palavras-chave: amaranto, peptídeos bioativos, hipocolesterolemia, metabolismo lipídico, isolado proteico.

Abstract

SOARES-FREITAS, R.A.M. Evaluation of bioavailability and hypocholesterolemic mechanisms of peptides from Amaranth (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria). [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, USP, 2017.

Introduction: Cardiovascular diseases are important causes of death worldwide, and hypercholesterolemia is directly related to this public health problem. Diet plays an important role in this process and some foods such as amaranth (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria) have been shown to reduce plasma cholesterol. Studies suggest that this effect is related to peptides released during the digestion of proteins, which would play an important role in the modulation of lipid metabolism. Considering that the effects of gastrointestinal digestion and the absorption of these peptides are clearly complex, it is important to carry out studies aiming to evaluate their bioaccessibility and evaluation of the mechanisms of action of these peptides in the target sites of the organism. **Objective:** To analyze the bioavailability of peptides in animal models after ingestion of amaranth protein isolate and to relate it to parameters associated to cholesterol metabolism. **Methods:** The amaranth was crushed, the flour was defatted and its protein isolated. Amaranth peptides were analysed after *in vitro* digestion. Two *in vivo* experiments were conducted: one of acute phase and one of medium duration. In the first, the amaranth protein isolate was administered to rats and the peptides in the blood were monitored for 2 hours to check for fragments that resisted gastrointestinal digestion. The *in vivo* experiment 2 consisted of feeding three groups of hamsters, one with a diet recommended by AIN93 (group N) and two with hypercholesterolemic diets for 21 days, containing amaranth protein as the only dietary protein (group I), compared to casein control (group H). In this experiment were analyzed in the plasma: peptides, total cholesterol and fractions; In feces: total cholesterol and bile acids; In the liver: cholesterol, total lipids, fatty acids, Hmgcr enzymatic activity, *Hmgcr* expression, *Srebf-2*, *Lxra*, *Abca1*, *Abcg8* and *Ampk*. **Results and discussion:** Peptide fragments from the *in vitro* digestion of amaranth protein isolate were identified and other dozens of

peptide sequences were found in rats after acute amaranth administration. A higher number of peptides were found in the serum in relation to the plasma of the animals. Remarkably, ALGV peptide was found in serum of rats. This peptide is present in amaranth protein, according to databases, and is similar to fragments that present hypocholesterolemic action. In the blood of hamsters it could be found six peptides with 100% coverage and similarity to the database of amaranth proteins, deserving investigation about their effects. Amaranth protein was able to suppress hypercholesterolemia when the hypercholesterolemic diet was introduced in parallel with this ingredient, with values lower for group I in 72% (triglycerides), 64% (total cholesterol), 80% (LDL-c) in relation to the H group. A lower concentration of cholesterol and total lipids were observed in the liver of the group I compared to the H group (177 x 464 mg cholesterol / 100 g of tissue, 2.06 x 2,86 g lipids / 100 g of tissue, respectively). Lipid parameters of blood, faeces and liver were similar to those of group N, whose diet followed the recommendation for rodents. There was greater excretion of total cholesterol in group I in relation to group H, but there was no greater excretion of bile acids in feces, indicating that the effect of amaranth protein may be due to increased transintestinal cholesterol excretion, decreased micellar solubilization of cholesterol and / or modification in the expression of cholesterol transport related proteins in the intestine. There was no change in the expression of the genes analyzed in this study, but amaranth reduced the activity of the Hmgcr enzyme. It is postulated that parameters such as Ldlr expression and Acat activity are altered by amaranth intake. The fatty acid profile was also modified in order to assimilate to the N group, but inflammatory parameters related to amaranth intake should be verified due to the higher proportion of arachidonic acid in relation to the higher proportion of arachidonic acid in relation to the other groups studied. **Conclusion:** The bioavailability of amaranth peptides and hypocholesterolemic and hypolipidemic activity in several metabolic pathways is verified, therefore promoting cardiovascular protection.

Key words: amaranth, bioactive peptides, hypocholesterolemia, lipid metabolism, protein isolate.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES E COLESTEROLEMIA	13
1.1.1 METABOLISMO DO COLESTEROL	14
1.1.2 EXCREÇÃO E (RE)ABSORÇÃO INTESTINAL DO COLESTEROL	17
1.1.3 SÍNTESE E CAPTAÇÃO DO COLESTEROL	20
1.2 O PAPEL DA DIETA NA COLESTEROLEMIA	23
1.3 DIGESTÃO PROTEICA E PEPTÍDEOS BIOATIVOS	25
1.4 BIODISPONIBILIDADE DE PEPTÍDEOS	30
1.5 AMARANTO	36
1.5.1 CARACTERIZAÇÃO DO GRÃO	38
1.5.2 AÇÃO BIOATIVA DO AMARANTO	39
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA	44
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS FARINHAS E DO ISOLADO PROTEICO	46
4.3 ANÁLISE IN VITRO	48
4.3.1 GRAU DE HIDRÓLISE	49
4.3.2 PERFIL ELETROFORÉTICO	49
4.3.3 IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS	50
4.4 EXPERIMENTO IN VIVO 1	51
4.4.1 COLETA E ANÁLISE DE SANGUE	53
4.5 EXPERIMENTO IN VIVO 2	53
4.5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS	58
4.5.2 CONSUMO ALIMENTAR	59
4.5.3 GANHO DE PESO	59
4.5.4 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	60
4.5.5 DETERMINAÇÃO DOS LIPÍDEOS SÉRICOS	61
4.5.6 IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS NO SORO DOS ANIMAIS	62
4.5.7 ANÁLISES NAS FEZES	62
4.5.8 ANÁLISES NO FÍGADO	64
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	68

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

69

5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS FARINHAS INTEGRAL, DESENGORDURADA E DO ISOLADO PROTEICO	69
5.1.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	69
5.1.2	SOLUBILIDADE	72
5.2	EXPERIMENTO IN VITRO - CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO DE DIGESTÃO	74
5.2.1	PERFIL ELETROFORÉTICO	75
5.2.2	IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	77
5.3	EXPERIMENTO IN VIVO 1 – BIODISPONIBILIDADE DE PEPTÍDEOS	79
5.4	EXPERIMENTO IN VIVO 2 – METABOLISMO DO COLESTEROL	83
5.4.1	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS DO EXPERIMENTO IN VIVO 2	83
5.4.2	CONSUMO DAS RAÇÕES E GANHO DE PESO DOS ANIMAIS	85
5.4.3	PERFIL DE LIPÍDEOS SÉRICOS	87
5.4.4	COLESTEROL E ÁCIDOS BILIARES NAS FEZES	89
5.4.5	LIPÍDEOS TOTAIS, COLESTEROL E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO FÍGADO	92
5.4.6	EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO	97
5.4.7	ATIVIDADE DA ENZIMA HMGCR	102
5.4.8	PEPTÍDEOS PRESENTES NO SORO DOS HAMSTERS	105

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

107

7 CONCLUSÕES

109

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

111

Lista de siglas - aminoácidos

Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys	C
Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y

1 Introdução

1.1 Doenças cardiovasculares e colesterolemia

As doenças cardiovasculares (DCV) constituíram a maior de todas as endemias no século XX no mundo. Observou-se uma tendência da redução da mortalidade por tais doenças de 1980 a 2012, principalmente em países mais desenvolvidos da Europa Ocidental, EUA e Canadá. Entretanto, segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2016) estima-se que 17,5 milhões de pessoas morreram por DCV em 2012, representando 31% de todas as mortes no âmbito global. Desses óbitos, cerca de 7,4 milhões ocorreram devido às doenças coronarianas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; MANSUR e FARVARATO, 2012).

Ainda que as mortes por DCV tenham sido reduzidas em relação ao século anterior devido a melhorias nos tratamentos clínicos e intervencionistas e menor exposição a agentes infecciosos, a morbidade permanece crescente, refletindo grande consumo de recursos do setor saúde (ROSA et al., 2007; HSU et al. 2013). A morbidade está associada a uma variedade de fatores de risco modificáveis, incluindo peso, fumo, consumo de álcool, dieta rica em ácidos graxos saturados e estresse (YUSUF et al., 2004). Consequentemente, uma manutenção apropriada dos fatores de risco é crítica para prevenção das doenças cardiovasculares.

Uma das causas mais frequentes das DCV é a aterosclerose coronária. A aterosclerose é caracterizada pela presença de placas de ateroma, espessamentos arteriais que apresentam um depósito formado quase somente de ésteres de colesterol (BETTERIDGE, 1989; MATHUR, 1961). A ocorrência das DCV é, principalmente, consequência de uma exposição prévia a fatores de risco. Entre eles

destaca-se a hipercolesterolemia. (ECKEL e KRAUSS, 1998; AKOSAH et al., 2000; MCGILL, 2000; MANSUR et al., 2001). Existe uma correlação positiva entre a aterosclerose e a concentração de colesterol sérico, sendo a hipercolesterolemia um importante fator de risco desta doença (MCGILL, 2000; AKOSAH et al., 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

1.1.1 Metabolismo do colesterol

O colesterol desempenha importantes funções nos seres vivos, sendo componente estrutural das membranas biológicas, precursor do colesterciferol (vitamina D₃) e de hormônios esteroides (cortisol, aldosterona, estrogênios, testosterona); além de atuar no processo de absorção dos lipídeos, uma vez que também é precursor dos ácidos biliares (SANTOS, 2001; BASSO, 2007). A molécula de colesterol (figura 1) pertence a uma categoria chamada de lipídeos anfipáticos. Quando exposto à água ou ambiente aquoso o colesterol permanece insolúvel, mas pode formar uma monocamada estável na superfície do fluido (CHRISTIE, 2014).

Graças a essas características moleculares uma das principais funções do colesterol é modular a fluidez das membranas celulares por interação com outros lipídeos, especialmente fosfolípidos. Por ser uma molécula anfifílica é capaz de intercalar fosfolípidos na camada biliar, que é uma estrutura tridimensional que necessita da presença de uma molécula planar (o colesterol possui um anel tetracíclico compacto e rígido) que interaja com ambos os lados. As interações ocorrem especialmente por forças de van der Waals e hidrofóbicas (com ácidos graxos) e ligações de hidrogênio de grupos hidroxila da cabeça polar da molécula de colesterol (com fosfolípidos). A função do colesterol é estabilizar a membrana,

levando à formação de uma fase líquida ordenada quando há muitos ácidos graxos insaturados, e tornando a fase mais fluida se a membrana estiver composta por muitos ácidos graxos saturados (CHRISTIE, 2014).

Figura 1. Fórmula bastão da molécula de colesterol.

Fonte: Christie, 2014.

O colesterol encontra-se nas formas livre ou esterificado (ésteres de colesterol) em tecidos animais e nas lipoproteínas plasmáticas, pois devido a seu caráter hidrofóbico necessita ser carregado dessa forma em fluidos biológicos (FIELDING e FIELDING, 2008).

As lipoproteínas de densidade alta (HDL), constituídas por cerca de 50% de proteína, especialmente Apo A I e II, levam o colesterol até o fígado diretamente ou transferindo ésteres de colesterol para outras lipoproteínas. As partículas de HDL removem o excesso de colesterol dos tecidos transportando-os para o fígado, o que caracteriza o transporte reverso de colesterol (TRC) (DANIELS et al., 2009).

As lipoproteínas de densidade baixa (LDL) têm como principal proteína a Apo B-100, transportando o colesterol para locais onde ele exerce uma função fisiológica. As lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) são constituídas por 50% de triglicérides e 40% de colesterol. Boa parte dos triglicérides da VLDL são retirados pela enzima lipase lipoproteínica, de modo que a partícula fica menor e mais rica em colesterol (passando a ser denominada lipoproteína de densidade intermediária -

IDL). VLDL e IDL têm como função o transporte dos triglicérides endógenos e do colesterol para os tecidos periféricos para serem armazenados ou utilizados como fonte de energia (FIELDING e FIELDING, 2008).

Os quilomícrons são partículas produzidas pelas células intestinais, responsável pelo transporte de substâncias hidrofóbicas pela linfa e pelo sangue. Os lipídeos provenientes da dieta (triglicérides, fosfolípides, colesterol e seus ésteres) são agregados à apolipoproteína B-48 em quilomícrons nascentes. Enquanto circula pelo sistema linfático, os quilomícrons nascentes passam à circulação do fígado e são drenados via duto torácico para a corrente sanguínea (DANIELS et al., 2009).

Na corrente sanguínea ocorre a doação de apolipoproteínas da HDL para os quilomícrons, que neste estágio passam a ser considerados maduros. Os quilomícrons maduros ativam enzimas que catalisam a hidrólise dos triglicérides dos quilomícrons; glicerol e ácidos graxos são liberados dos quilomícrons e absorvidos por tecidos como adiposo e muscular (FIELDING e FIELDING, 2008).

A hiperlipidemia é uma alteração metabólica decorrente de distúrbios no metabolismo das lipoproteínas, repercutindo no aumento da concentração de lipídeos plasmáticos e alterações no seu metabolismo. Clinicamente, as hiperlipidemias podem manifestar-se como hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia (SANTOS, 2001). O controle da concentração sérica do colesterol ocorre principalmente através da regulação da captação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que são as principais transportadoras do colesterol endógeno (BROWN e GOLDSTEIN, 1986). O aumento da quantidade de partículas LDL, bem como o aumento da quantidade de colesterol que estas transportam, está

dentre os principais fatores de risco para a gênese da aterosclerose (WAGNER et al., 1989; BETTERIDGE, 1989; YUSUF et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2006).

O organismo humano sintetiza grande parte do colesterol circulante, cerca de um terço deste provém da dieta (NELSON e COX, 2002). A síntese de colesterol é um processo com alto gasto energético: necessita de pelo menos 18 moléculas de ATP e 16 de NADPH por molécula de colesterol formada. Do ponto de vista evolutivo isto pode estar relacionado ao fato das células mamíferas não degradarem as moléculas de colesterol. Os contribuintes para a quantidade de colesterol no sangue incluem o colesterol sintetizado endogenamente e colesterol exógeno, absorvido pelo trato gastrointestinal (DANIELS et al., 2009). Neste contexto, o intestino e o fígado, em conjunto, possuem essencial papel no controle do metabolismo do colesterol (NELSON e COX, 2002).

1.1.2 Excreção e (re)absorção intestinal do colesterol

Um dos modos de eliminação do colesterol quando este se encontra em excesso ocorre por excreção pelo intestino como esterois neutros, principalmente colesterol (RUSSELL, 2003). O colesterol também é descartado nas fezes após ser metabolizado a ácidos biliares. Quando a concentração hepática de colesterol está elevada uma via de retroalimentação é ativada. Nos hepatócitos existem transportadores que catalisam a excreção dos sais biliares para a bile. Excretados na bile e lançados no duodeno (durante a digestão) uma parte dos sais biliares acaba por ser eliminado nas fezes.

O colesterol presente no lúmen intestinal deriva de muitas fontes, incluindo dieta, bile, secreção intestinal e descamação epitelial (VAN der WULP et al., 2013).

A absorção intestinal do colesterol requer emulsificação, hidrólise do colesterol esterificado e solubilização micelar. No intestino delgado, o conteúdo lipídico dietético hidrolisado é solubilizado pelos sais biliares em agregados macromoleculares (compostos por sais biliares, ácidos graxos, monoglicerídeos, fosfolípidos e colesterol) e conduzidos às membranas dos enterócitos (MARRINK e MARK, 2002; GOODMAN, 2010).

Boa parte dos sais biliares são reabsorvidos no íleo e o colesterol volta a circular no organismo (WONG et al., 2006), a ligação dos ácidos biliares no conteúdo micelar para absorção ou reabsorção depende de uma série de fatores, incluindo a concentração do mesmo no meio. Substâncias derivadas de alimentos podem perturbar este equilíbrio e resultar na insolubilização do colesterol nas micelas. A inibição da solubilização de colesterol nas micelas afeta a absorção celular e são de grande interesse nas intervenções de redução de colesterol, a exemplo de fitosteróis, substâncias com características moleculares similares ao colesterol, porém menos absorvíveis (KIRANA et al., 2005; WOOLLETT et al., 2006).

Uma vez no conteúdo micelar, derivados lipídicos permeiam a membrana ou temporariamente se agregam a ela. O colesterol é absorvido com ajuda de transportadores NPC1L1 (Niemann - Pick C1 - like1) e ABCA1 (ATP-binding cassette A1, ou cassete ligante de ATP A1), e o efluxo é parcialmente regulado por transportadores ABCG5 e ABCG8 (cassete ligante de ATP G5/8). Da mesma forma, os fitoesteróis provenientes da alimentação são absorvidos pelo transportador NPC1L1 (BRAFORDE e AWAD, 2007). Porém, após a sua entrada nos enterócitos, grande parte é direcionada através dos co-transportadores ABCG5 e ABCG8 de volta ao lúmen intestinal (YANKAH, 2006).

A mudança na expressão gênica ou inibição de transportadores também pode alterar a absorção e/ou efluxo do colesterol, o que pode conduzir a alterações no metabolismo lipídico (CARSTEADT, 1997; HOWLES, 2010). A figura 2 apresenta de forma simplificada o mecanismo de excreção e absorção de colesterol.

Figura 2. Mecanismo de absorção e excreção do colesterol. O colesterol presente no enterócito foi originado de absorção, síntese e circulação. Os círculos azuis representam moléculas de colesterol.

O receptor nuclear X alfa (liver X receptor alpha ou LXR α) é um fator de transcrição nuclear ativado por ligantes, sendo estes oxisteróis, e expressos em tecidos com uma elevada atividade metabólica, incluindo o hepático e o adiposo, e em macrófagos. LXR alfa e beta e RXR (receptor retinóide X) formam heterodímeros

envolvidos no controle do metabolismo dos lipídios, por isso é considerado o principal regulador da expressão de mRNA de *ABCG5* e *ABCG8* (CALKIN e TONTONNOZ, 2012; YU et al., 2014). Outros genes também são regulados por *LXR/RXR* incluindo *ApoE* (apolipoproteína E), *CETP* (proteína de transferência de ésteres de colesterol), *FAS* (ácido graxo sintase), *CYP7A1* (colesterol 7-alfa hidroxilase). (CALKIN e TONTONNOZ, 2012).

Por outro lado, *RXR* também forma heterodímero com *PPAR* alfa, de forma a promover o catabolismo dos ácidos graxos, portanto *LXR* e *PPAR* alfa competem por uma quantidade limitada de *RXR*, e este equilíbrio dinâmico determina a direção do metabolismo lipídico, uma vez que os dímeros formados são usados pelo organismo em direções opostas catabolismo ou lipogênese (EDWARDS et al, 2002; YU et al., 2014).

1.1.3 Síntese e captação do colesterol

O fígado é o principal órgão atuante na síntese e captação de colesterol. Dentre as funções do fígado no organismo destacam-se a captação de LDL e VLDL, dos quilomícrons remanescentes, a síntese e secreção de VLDL e HDL nascente, a síntese de ácidos biliares e colesterol.

A síntese endógena consiste em etapa de controle do metabolismo do colesterol. A enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGCR) catalisa a conversão de HMG-CoA a mevalonato, cujo passo é limitante na síntese de colesterol (GOLDSTEIN e BROWN, 1990; JO e DEBOSE-BOYD, 2010; MAZEIN et al., 2013). A figura 3 ilustra de forma resumida a síntese de colesterol a partir de moléculas de Acetil-CoA.

Figura 3. Cascata bioquímica do mevalonato. A enzima grifada em cinza indica o passo limitante na síntese do colesterol. A seta listrada indica que existem produtos intermediários formados previamente à síntese do colesterol.

A ação das estatinas, fármacos utilizados para tratamento da hipercolesterolemia, é proveniente da inibição da enzima HMGCR. Essa inibição reduz a secreção de lipoproteínas contendo apolipoproteína B (apo-B) e aumenta a síntese de receptores de LDL (ENDO, 1992).

Nos mamíferos, a regulação em resposta à concentração de colesterol é feita por um mecanismo de retroalimentação, que regula a transcrição de genes envolvidos na síntese e na captação de lipídeos, principalmente. Trata-se de um controle por uma pequena família de proteínas designadas pela sigla SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein), que são fatores de transcrição que regulam e coordenam a expressão desses genes (LEHNINGER, 2006; RADHAKRISHNAN et al., 2008). Uma dessas proteínas, a SREBP-2, se liga preferencialmente aos promotores de genes envolvidos na captação e biossíntese de colesterol, tais como

HMGCR e receptores de LDL (*LDLR*) (AMEMIAYA-KUDO et al., 2002; RADHAKRISHNAN et al., 2008). A figura 4 ilustra esse metabolismo.

Figura 4. Esquema de captação e eliminação de colesterol pelo fígado. Abreviaturas: ABCA1: transportador cassete de ATP-A1; ACAT2: acil-CoA colesterol aciltransferase; LRP: proteína relacionada ao LDLR; SR-B1: receptor sequestrante de classe B de tipo 1; MTP: proteína microsomal de transferência; fc colesterol livre; ce esterres de colesterol. Modificado de JIA et al., 2011.

O controle da concentração sérica do colesterol ocorre também por meio de regulação da captação das partículas de LDL (GOLDSTEIN e BROWN, 2009). O fígado, responsável pela excreção do colesterol via bile, é o principal sítio catabólico de LDL mediado por LDLR, 70% do LDL em circulação é removido pelo fígado (SPADY e DIETSCHY, 1988). As LRP (proteínas relacionadas a receptor de LDL) também auxiliam na captação de lipoproteínas no fígado, mas as LRP apenas se

ligam às apo E, e o receptor das LDL se liga às Apo E e às apo B-100. Por isso, LRP tem papel na captação de IDL e quilomícron remanescente, mas LDLR capta estas e também LDL. LRP e LDLR se projetam para fora da célula hepática, ligando-se às partículas circulantes, trazendo-as para dentro da célula (STRICKLAND et al., 2002).

1.2 O papel da dieta na colesterolemia

Hábitos alimentares inadequados afetam o metabolismo lipídico, levando à elevação das concentrações plasmáticas de LDL e à redução das concentrações de HDL, bem como ao aumento de inflamação e de oxidação (PIEGAS et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2004; YUSUF et al., 2004; HSU et al., 2013; HALLIKAINEN et al., 2013).

Ensaio clínicos indicam que uma dieta rica em soja, fibras, peixes, com baixa quantidade de gordura total e saturada é associada à menor concentração de colesterol (NCEP, 2001; HE et al., 2003; BERNSTEIN et al., 2010; HSU et al., 2013).

A caracterização dos componentes alimentares que exercem maior impacto benéfico sobre as concentrações plasmáticas de colesterol ainda é objeto de discussão. Diversas substâncias, tais como fibras solúveis, ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados, a presença de fitoquímicos como o esqualeno, agentes antioxidantes como isoflavonas, fitoesteróis, tocotrienóis, alicina, e proteínas de origem vegetal, são apontados como prováveis agentes hipolipemiantes (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998; BIDLACK et al., 2000; SHIN et al., 2004).

Do ponto de vista epidemiológico, estudos verificaram que populações que consomem grandes quantidades de proteína vegetal possuem menores índices de

mortalidade causados por doenças crônicas não-transmissíveis, comparados às populações com hábitos ocidentais (NAGATA et al., 2002; WU et al., 2002; SPECTOR et al., 2003).

A ação de proteínas vegetais isoladas vem sendo investigada por diversos autores, e como resultado, observa-se redução plasmática de colesterol em ratos, hamsters, coelhos e humanos por meio de intervenção nutricional (POTTER, 1995; MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998; AZADBAKHT et al., 2003; WANG et al., 2004).

A proteína vegetal mais estudada, *in vitro* e *in vivo*, é a da soja. DAMASCENO e colaboradores (2001) verificaram que coelhos alimentados com ração contendo 27% de proteína de soja e 1% de colesterol apresentaram menores concentrações de colesterol nas partículas LDL e β -VLDL comparados ao grupo que foi alimentado com 27% de caseína e 1% de colesterol. Além disso, em análise da extensão da lesão aterosclerótica, foi verificado que não houve diferença no volume das lesões dos dois grupos, mas a área da lesão do grupo alimentado com o isolado proteico de soja foi menor (DAMASCENO et al., 2000). Estudo de TACHIBANA e colaboradores (2005) em ratos demonstrou que a ingestão de isolado proteico de soja foi capaz de propiciar a modulação do metabolismo lipídico e energético, incluindo a síntese e a degradação do colesterol.

SIRTORI e colaboradores (1977) relataram que a substituição da proteína animal pela proteína de soja na dieta de humanos hipercolesterolêmicos levou a um decréscimo na concentração de colesterol total e de LDL no plasma. BORODIN e colaboradores (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 colesterol total (-6.5%, $p=0.0099$), triglicérides (-18%, $p=0.022$) e a fração não-HDL-c

(-11%, $p=0.0023$), e também aumentou a fração HDL-c (+9%, $p=0.0047$) de russos hipercolesterolêmicos. Estudos similares obtiveram resultados semelhantes (CARROLL e KUROWSKA, 1995; SIRTORI et al., 1995).

Mediante pesquisas que evidenciam esse efeito, desde 1999 o órgão *Food and Drug Administration* (FDA) alega que o consumo de 25 gramas de proteína de soja pode reduzir o risco da ocorrência de doenças cardiovasculares, através da redução do colesterol plasmático, quando a proteína for incluída em dieta contendo baixa quantidade de lipídios saturados e colesterol (ANDERSON et al., 1995; FAO, 1999).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2007) preconizou que o consumo diário de no mínimo 25 gramas de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol, e que seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis.

Apesar de constatado o efeito hipocolesterolemizante de proteínas vegetais, pouco se sabe sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos. Sugere-se que produtos da digestão proteica possam ser os responsáveis por este efeito (ARNOLDI et al., 2001).

1.3 Digestão proteica e peptídeos bioativos

Peptídeos, do grego “peptós” (digerido), são estruturas formadas por cadeias de aminoácidos. Tal qual são estruturadas as proteínas, ligações covalentes entre aminoácidos ocorrem com o grupo carboxil de um aminoácido e o grupo amina de outro aminoácido, o que gera a chamada ligação peptídica. Os menores peptídeos

são os dipeptídeos (formados por duas moléculas de aminoácidos e somente uma ligação peptídica), seguidos por tripeptídeos (contendo três aminoácidos e duas ligações peptídicas) e tetrapeptídeos (quatro aminoácidos e três ligações peptídicas). Essas três subclasses integram a classe oligopeptídeos, que consiste em sequências de 2 a 19 aminoácidos. Quando as estruturas possuem entre 20 a 49 aminoácidos as moléculas são chamadas de polipeptídeos (IUPAC, 1997). A figura 5 ilustra a ligação peptídica entre quatro aminoácidos.

Figura 5. Exemplo de tetrapeptídeo (VGSA). Em verde está apresentada a porção amino terminal, também chamada de N-terminal (aminoácido L-valina) e em azul a porção carboxi-terminal ou C-terminal (aminoácido L-alanina).

Os peptídeos se diferem das proteínas, portanto, baseados arbitrariamente em seu tamanho molecular, ou seja, a cadeia composta por menos de 50 aminoácidos é chamada de peptídeo, e a cadeia que contém acima de 50 aminoácidos é chamada de proteína. As proteínas nos seres vivos possuem diversos papéis biológicos, e geralmente se ligam a coenzimas, cofatores, proteínas e outras macromoléculas como DNA e RNA para exercer seu efeito biológico. Isso não significa que os peptídeos gerados da clivagem da ligação peptídica apresentem efeito biológico semelhante (ARDEJANI e ORNER, 2013).

Peptídeos encriptados são uma família de peptídeos incluídos na sequência de proteínas presentes em alimentos. A informação encriptada é liberada por ação proteolítica de enzima (ou combinado enzimático) agindo em paralelo ou de forma

sequencial. A maioria dos peptídeos encriptados possui funções distintas daquelas verificadas em suas proteínas de origem (PIMENTA e LEBRUN, 2007). O estudo da digestão do substrato proteico é realizado principalmente com técnicas *in vitro* e *in vivo*. A digestão consiste na hidrólise de proteínas em suas ligações peptídicas (MULLALLY et al., 1996; QIAO et al., 2004; ERDMANN et al., 2008).

A digestibilidade enzimática *in vitro* se baseia em digerir a amostra com enzimas em condições padronizadas. É estimada com o uso de enzimas proteolíticas que agem normalmente na digestão, procurando-se simular o que ocorre no estômago e no intestino, onde a digestão se processa (WALKER et al., 1994; LOURENÇO, 2000). Em condições como a utilização de enzimas peptidases, pH e taxas de enzima e substrato adequadas, a técnica *in vitro* gera resultados complementares às técnicas *in vivo* (MULLALLY et al., 1996; QIAO et al., 2004). A determinação enzimática da digestibilidade da proteína tem sido observada como correlata com estudos *in vivo* (HSU et al., 1977; HUR et al., 2011).

A enzima pepsina hidrolisa as ligações peptídicas cujos grupos carbonila são fornecidos por resíduos de leucina, fenilalanina, triptofano e tirosina. A enzima tripsina hidrolisa as ligações peptídicas cujos grupos carbonila são provenientes de resíduos de lisina ou arginina. A quimotripsina hidrolisa ligações peptídicas cujas cadeias laterais são hidrofóbicas e grandes, como no caso onde os grupos carbonila são fornecidos por resíduos de fenilalanina, tirosina ou triptofano. Os três casos ocorrem desde que não haja um resíduo de prolina ligado a esses aminoácidos. A elastase cliva ligações com resíduos pequenos e neutros, como de alanina, glicina ou valina. As carboxipeptidases A podem clivar resíduos alifáticos e as carboxipeptidases B podem clivar aminoácidos básicos (SMITH et al., 1994; LEHNINGER, 2006).

Em estudos *in vivo* a digestão proteica começa no estômago pela ação de pepsinas (particularmente A e C) a um pH ácido. Peptidases pancreáticas, tripsina, α -quimotripsina, elastase, e carboxipeptidases A e B, em um ambiente alcalino, hidrolisam os polipeptídeos no lúmen do intestino delgado, produzindo oligopeptídeos e alguns aminoácidos livres. Os aminoácidos são absorvidos com ajuda de transportadores e moléculas carreadoras, que os carregam através da superfície da membrana (ARHEWOH et al., 2005). Oligopeptídeos são submetidos a uma segunda hidrólise por peptidases presentes na membrana intestinal, produzindo tripeptídeos, dipeptídeos e mais aminoácidos livres. Essa hidrólise se dá por efeito das enzimas aminopeptidases (que liberam aminoácidos neutros ou aniônicos), endopeptidases, dipeptidases e carboxipeptidases (VERMEIRSEN et al., 2004).

A maior barreira enzimática aos peptídeos é o lumen do intestino delgado, que contém grandes quantidades de peptidases secretadas pelo pâncreas, e peptidases das células de mucosa, as quais são constantemente liberadas da membrana. A segunda maior barreira enzimática é a membrana borda em escova das células epiteliais, que contém ao menos 15 peptidases que provêm grande especificidade e conseguem clivar diversos peptídeos (WILSON e RUDEL, 1994).

Quando ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, parte da proteína é excretada nas fezes ou transformada em produtos do metabolismo pelos microrganismos do intestino grosso (NELSON e COX, 2002). A digestão parcial das proteínas por enzimas digestivas pode ainda liberar fragmentos de quatro a nove resíduos de aminoácidos ou maiores (SGARBIERI, 1987) e a absorção dos fragmentos intactos pode ocorrer na membrana da borda em escova (FREITAS, 1995; RUBAS e GRASS, 1991). Após serem absorvidos, os fragmentos podem sofrer ou não hidrólise intracelular (RUBAS e GRASS, 1991).

Fatores que interferem da digestão proteica incluem interações de proteínas com polifenóis, fitatos, carboidratos, lipídeos e inibidores de peptidases que podem afetar a digestibilidade de proteínas; fatores relacionados às propriedades estruturais da proteína (IKEDA et al., 1986; DUODU et al., 2003); diferentes liberações no trato digestório, ou seja, pela ação enzimática ou pela digestão microbiana intestinal (MÖLLER et al., 2008); a grande quantidade e variedade de peptídeos gerados pela digestão; a complexidade da matriz alimentar; a interferência de componentes do organismo sobre esses compostos (SATO e IWAI, 2008).

Os fatores citados podem gerar fragmentos com diversificada sequencias de aminoácidos, que, conseqüentemente, podem apresentar distintas atividades biológicas. Nas últimas décadas vários autores têm descoberto peptídeos bioativos em proteínas dietéticas (MATSUI et al., 1993; LI et al., 2002; YOSHIKAWA et al., 2003; SGARBIERI, 2004; de MEJIA e de LUMEN, 2006). Estes peptídeos podem agir como reguladores, com atividades tipicamente hormonais (KITTS e WEILER, 2003; KORHONEN e PIHLANTO, 2003), e exercer diversas funções biológicas por interação com células receptoras, regulando enzimas ou interferindo em ciclos de células. Peptídeos provenientes de alimentos podem atuar de forma imunomodulatória, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, opióide, anti-hipertensiva, hipocolesterolêmica, entre outras (HARTMAN e MEISEL, 2007).

COSTA e colaboradores (2007) verificaram efeito hipotensor dos peptídeos do leite em ratos hipertensos alimentados com isolado proteico desnaturado a 65°C. Em estudos que utilizaram diferentes enzimas para hidrolisar a proteína de soja foram encontrados agentes antioxidantes (PENA-RAMOS e XIONG, 2002), com propriedades anticâncer (KIM et al., 2000), bem como com atividade hipotensiva (WU e DING, 2001).

Tem-se ainda demonstrado o efeito hipocolesterolemizante do isolado proteico de soja (HORI et al., 2001; WANG e de MEJIA, 2005). Os peptídeos IAEK, VPDPR e IAVP têm comprovada ação hipocolesterolemizante, 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 HMGCR (NAGAOKA et al., 2001; DZIUBA et al., 2003; TAKENAKA et al., 2003; PAK et al., 2005a; PAK et al., 2005b). NAGAOKA e colaboradores (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.

Estudos em ratos alimentados com isolado proteico de soja mostraram seu efeito no aumento da expressão do *LDLR* ou na redução da expressão da *HMGCR*; ambos modulados pelo fator de transcrição *SREBF-2* (TOVAR et al., 2005; SHUKLA et al., 2007). Em outro estudo feito na tentativa de explicar os possíveis mecanismos responsáveis pelo efeito hipocolesterolemizante da proteína de soja, atribuiu-se, primordialmente, ao aumento do *clearance* de LDL plasmática através do aumento da atividade de LDLR (BAUM et al., 1998).

1.4 Biodisponibilidade de peptídeos

Entre 1960 e 1980 avanços significativos foram alcançados na descoberta da fisiologia dos (oligo)peptídeos com relação a sua absorção. De acordo com a literatura atual peptídeos liberados de proteínas alimentares no trato gastrointestinal podem escapar da digestão e serem absorvidos (HARTMAN e MEISEL, 2007).

Os peptídeos que não são excretados podem exercer suas ações tanto localmente, sobre a barreira intestinal, quanto após passagem ao sangue e/ou aos tecidos-alvo, porém, em ambos os casos, necessitam sobreviver à ação de diversas enzimas. WOODLEY (1982) e LEE (2002) sugeriram que a proteína administrada oralmente pode encontrar mais de quarenta formas enzimáticas diferentes apenas durante sua passagem pelo intestino delgado, por isso é importante a verificação da biodisponibilidade desses peptídeos (SEGURA-CAMPOS et al., 2011; BOUZERZOUR et al., 2012). A biodisponibilidade refere-se a um componente digerido e absorvido, que chega à circulação sistêmica ou local alvo, para ser capaz de executar função positiva ao corpo (PARADA e AGUILERA, 2007; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2009).

Alergias alimentares representam um indício de que peptídeos podem sobreviver à digestão gastrointestinal e chegar a circulação sistêmica (GILBERT et al., 2008; BOUZERZOUR et al., 2012). Apesar de ser possível, pesquisadores têm destacado que provavelmente uma pequena parte dos peptídeos entra na circulação sanguínea. Além disso, um número reduzido de estudos encontrou fragmentos maiores que seis aminoácidos no sangue (GRIMBLE, 1994; ROBERT e ZALOGA, 1994; CHABANCE et al., 1998; van PLATERINK et al., 2006; PICARIELLO et al., 2013).

A habilidade dos peptídeos em resistir ao ataque enzimático depende, em grande parte, de sua composição aminoacídica. Peptídeos contendo prolina e hidroxiprolina geralmente são capazes de resistir à degradação enzimática. Além disso, a sequência de aminoácidos determina a atividade do peptídeo, particularmente em se tratando dos aminoácidos localizados nas posições C- ou N-terminal. (MAENO et al., 1996; FITZGERALD e MEISEL, 2000).

Dipeptídeos e tripeptídeos podem ser absorvidos cruzando a membrana intestinal com ajuda de transportador específico. O PepT1 (transportador dependente de próton) usa o gradiente eletroquímico de prótons transmembrana como força de transporte, com ampla especificidade (YANG et al., 1999). Assim, o PepT1 facilita a saída de peptídeos pequenos do enterócito para a circulação sanguínea (SATAKE et al., 2002). Já a absorção dos peptídeos maiores que três ou quatro resíduos pelas células epiteliais pode ocorrer através de endocitose mediada ou não por receptores (LEE, 2002).

A rota paracelular de peptídeos encontra-se ao longo da parede intestinal (STEVENSON e KEON, 1998). Ela pode ser definida como uma rota aquosa pelo espaço intracelular entre células adjacentes, e restrita por tight junctions nas porções mais apicais das células. A natureza aquosa dessa rota favorece a absorção (por difusão passiva) de solutos pequenos e hidrofílicos (NOACH et al., 1994). Sabe-se que o fluxo pelas tight junctions tem volume considerável e que a permeabilidade e a seletividade dessas junções podem ser reguladas. A permeabilidade das junções envolve, além do tamanho, a carga do composto (CANO-CEBRIAN et al., 2005). As propriedades de permeação podem variar de acordo com o fluxo e tipo de soluto (FANNING et al., 1998; SATAKE et al., 2002; PAPPENHEIMER e MICHEL, 2003). PAPPENHEIMER e colaboradores (1994) demonstraram que a rota paracelular foi usada por um octapeptídeo no epitélio intestinal, SATAKE e colaboradores (2002) também observaram que esta rota foi eficiente para seus tetrapeptídeos.

A rota transcelular consiste da absorção de peptídeos pela porção apical da membrana borda em escova, movendo o peptídeo pelo enterócito até a membrana basolateral. (PAPPENHEIMER e MICHEL, 2003). Transportadores específicos na membrana basolateral permitem que moléculas passem por mecanismos de difusão

facilitada porque se tratam de moléculas que requerem mediação por um transportador proteico. A membrana basolateral contém várias proteínas com atividade de ATPase que funcionam como transportadores íon-específicos e impelem a absorção por mecanismos de transporte ativo contra um gradiente. No caso de peptídeos, sua absorção é interrompida se não houver energia disponível ou se o transportador estiver saturado (GARCÍA et al., 1996). A absorção via rota transcelular é complexa, mediada por vesículas com ligantes específicos (SHIMIZU et al., 1997). Uma vez nos enterócitos, os peptídeos podem ser hidrolisados a aminoácidos por uma série de peptideases intracelulares (WEBB, 1990).

Há ainda peptídeos chamados de célula-penetrantes (sigla CPP, em inglês). A descoberta dos CPP se iniciou em 1988, quando Frankel & Pabo descobriram que a proteína trans-ativadora da proteína de transcrição (Tat) do vírus da imunodeficiência humana (HIV) possuía a capacidade de se translocar através das membranas celulares. Em 1991 foi verificada a absorção celular efetiva de uma proteína de *Drosophila* e a sequência de peptídeos responsável pela permeação da membrana foi chamada de penetraína. Posteriormente foram adicionados uma série de peptídeos à família ainda crescente de CPP, que compreende classes catiônicas, anfipáticas, hidrofóbicas e aniônicas. Compreendem uma família que atravessa membranas celulares quando presente em concentrações submicromolares não tóxicas, normalmente não excedem 30 resíduos e muitas vezes carregam uma carga positiva, o que facilita as interações eletrostáticas com componentes de superfície celular carregados negativamente, como os glicosaminoglicanos e os ácidos siálicos, como um passo inicial antes da translocação da membrana (FRANKEL e PABO, 1988; DEROSI et al., 1994; FARRERA-SINFREU et al., 2005; ANGELES-BOZA et al., 2010; EZZAT et al., 2011; QIAN et al., 2013).

Independentemente da forma como atingem a corrente sanguínea, os peptídeos podem se confrontar com enzimas no sangue. O sangue contém grande quantidade de peptidases. WALSH e colaboradores (2004) reportaram que a 1,7 mg/mL de sangue o peptídeo α -lactoglobulina degrada durante 60-minutos de incubação. A concentração de peptídeos no sangue depende da quantidade absorvida, da sua resistência ao longo do tempo e de seu acúmulo no organismo e, apesar da grande quantidade de enzimas no sangue, o tempo de trânsito dos peptídeos nesse sistema é mais curto e a capacidade enzimática é menor quando comparado ao que ocorre no intestino (LEHR, 1994).

Para analisar as diferenças de biodisponibilidade com relação ao processamento de alimentos BARBÉ e colaboradores (2013) coletaram o conteúdo digestório e amostras de plasma de mini-pigs. Caseínas e β -lactoglobulinas, respectivamente, foram sensíveis e resistentes à hidrólise no estômago quando a matriz alimentar não foi aquecida, mas mostraram digestão similar após aquecimento da matriz alimentar, com maior susceptibilidade à hidrólise pela β -lactoglobulina. Em outro estudo leitões foram alimentados com fórmulas infantis. O conteúdo do estômago, do jejuno e do íleo foram analisados a intervalos de tempo determinados. Verificou-se que alguns peptídeos da caseína, especialmente de β -caseína, foram detectados tanto no jejuno quanto no íleo, resistindo portanto à hidrólise até esse ponto. Algumas sequências específicas, como regiões da β -lactoglobulina, poderiam ser resistentes e estáveis o suficiente para cruzar a barreira epitelial. Em estudo de MASUDA e colaboradores (1996) o peptídeo HLPLP foi identificado no sangue de humanos saudáveis que ingeriram leite fermentado enriquecido com este peptídeo.

Grande parte dos estudos envolvendo biodisponibilidade de peptídeos bioativos analisam fragmentos com capacidade hipotensiva. Em estudo de KOYAMA e colaboradores (2013), os autores utilizaram broto de trigo sarraceno ou um produto fermentado do broto de trigo sarraceno em dose oral de 1 mg/kg de peso de ratos hipertensos e verificaram redução em sua pressão arterial somente para os animais que ingeriram o produto fermentado. Em análise por cromatografia líquida verificaram que haviam diferenças entre os produtos fermentado e não fermentado. Seis peptídeos diferentes foram identificados. A ingestão oral de cada um desses peptídeos se mostrou eficaz na redução da pressão arterial dos animais.

JAUHIAINEN e colaboradores (2007) analisaram a absorção, a distribuição nos tecidos e a excreção do peptídeo IPP marcado com carbono 14 em ratos. Após administração oral, a radioatividade no plasma foi medida em diversos intervalos de tempo. O pico de absorção do peptídeo se deu após 2 horas da ingestão. A radioatividade proveniente do peptídeo foi encontrada em órgãos como fígado e rins, portanto os autores verificaram que este peptídeo é, de fato, parcialmente absorvido intacto e concluíram que sua distribuição no corpo do animal deve estar relacionada ao efeito de redução de pressão arterial constatado.

Alguns peptídeos da soja apresentam comprovada atividade hipocolesterolemizante. CHO e colaboradores (2007) descreveram peptídeos que estimulam a transcrição de receptores de LDL, induzindo a redução de partículas de LDL no sangue. PAK e colaboradores (2012) identificaram dois peptídeos bioativos na soja capazes de inibir a enzima HMGCR. Baseados na sequência desses dois peptídeos os pesquisadores desenvolveram doze novos peptídeos sintéticos que inibiram 14500 vezes mais a atividade da enzima em relação aos peptídeos naturais. Porém, ainda é desconhecida a biodisponibilidade desses peptídeos.

Constata-se, assim, que o efeito da digestão gastrointestinal dos peptídeos é extremamente complexo; estudos clínicos de biodisponibilidade são necessários para avaliar a bioatividade dos peptídeos e quantificar sua degradação em sistemas *in vitro* e *in vivo*.

1.5 Amaranto

O gênero *Amaranthus* inclui mais de 60 espécies. Evidências experimentais sugerem que sua origem provavelmente se deu com a espécie da América denominada *A. hybridus*. Hoje três espécies do gênero *Amaranthus* produzem os grãos mais consumidos e estudados, o *Amaranthus hypochondriacus* proveniente do México, o *Amaranthus caudatus* do Peru e o *Amaranthus cruentus* da Guatemala e do México. Pertencente à família Amaranthaceae, é uma planta angiospérmica (divisão Magnoliophyta) pertencente à ordem Caryophyllales, a qual se inclui nas Eudicotiledônias, desenvolvendo embriões com dois ou mais cotilédones (CHAN e SUN, 1997; VALDES-RODRIGUEZ et al., 1993; FERREIRA et al., 2007).

Trata-se de uma planta anual com diversas cores, como verde, roxa, púrpura, ou intermediários. O caule possui estrias e espessura diminuindo da base ao ápice, com comprimento variável, e a inflorescência é formada por panículas vistosas, eretas ou decumbentes. O fruto é uma cápsula pequena que se abre na maturação deixando cair a parte superior, descobrindo a parte inferior onde se encontra a semente (SANCHEZ, 1991). Foi domesticada há mais de 6000 anos e é cultivada desde o período pré-colombiano no México, na América Central e nos territórios andinos da América do Sul. Os povos maia, inca e asteca o utilizavam com frequência na alimentação e em rituais religiosos. (SAUER, 1950; MUJICA-SÁNCHEZ et al., 1997). Fotos da planta encontram-se na figura 6.

Figura 6. a) Da esquerda para a direita: *A. hybridus*, *A. retroflexus*, *A. caudatus*, *A. cruentus*. b) Plantação de amaranto no cerrado brasileiro. Cortesia do Dr. C. Spehar – Embrapa Cerrados.

Apresenta rápido crescimento (em cerca de noventa dias) e, diferente de outros vegetais, é cultivado durante o verão, portanto pode ser usado em entressafra. Trabalhos de pesquisa e desenvolvimento resultaram no lançamento de uma variedade brasileira de *Amaranthus cruentus* adaptada ao solo do Cerrado, denominada BRS-Alegria (SPEHAR et al., 1998, TEIXEIRA, 2003).

O amaranto vem despertando especial interesse por parte de grupos de pesquisa devido às suas particularidades agrícolas; por seu potencial de aplicação na indústria de alimentos funcionais como ingrediente para uma grande variedade de produtos (FERREIRA et al., 2007), e ainda por suas características nutricionais, uma vez que o grão foi considerado pelo Conselho Nacional de Pesquisas dos EUA como um dos mais promissores alimentos para este milênio (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989). A Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos também estimula a exploração comercial do grão de amaranto devido a sua elevada qualidade nutricional (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1984).

Apesar deste interessante perfil nutricional, informação sobre a produção global de amaranto não está disponível na base de dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), mas em 2004 foi estimada entre 600.000 e 1,7 milhões de toneladas (CORKE et al., 2016). Em paralelo, a produção mundial de cereais comumente utilizados no mundo em 2014, tal qual milho, arroz ou trigo, foi estimada em 1 bilhão, 740 milhões, e 728 milhões de toneladas, respectivamente (FAOSTAT, 2014).

1.5.1 Caracterização do grão

O amaranto é um pseudocereal da classe das dicotiledôneas e da família das Amarantáceas, apresentando simultaneamente características de cereal e de leguminosa, uma vez que verdadeiros cereais monocotiledôneas. Uma das semelhanças entre pseudocereais e cereais é a abundância em amido. A composição química média do grão apresenta de 13-18% de proteínas, 7-8% de lipídeos, 50-60% de amido e 8% de fibras alimentares (BECKER et al., 1981; GORINSTEIN et al., 2001). Apresenta alto teor de fibras solúveis (4,2%) em comparação a outros cereais como o trigo (2,3%), milho (2,0%) e aveia (1,9%) (EARLY e EARLY, 1987). Destacam-se ainda os teores de vitaminas e minerais (BRESSANI et al., 1994).

Outro fator que chama atenção no amaranto é seu perfil aminoacídico, pois contém boas quantidades de aminoácidos que são geralmente limitantes em cereais e legumes, como lisina e metionina. Sua composição fica próxima ao perfil recomendado para consumo humano (BECKER et al., 1981; NATIONAL ACADEMY

OF SCIENCES, 1984; SCHNETZLER e BREEN, 1994; GORINSTEIN et al., 2002; BERGANZA et al., 2003; TOMOSKOZI et al., 2009; FERREIRA e ARÊAS, 2010).

As principais frações proteicas do amaranto são albuminas, globulinas e glutelinas; suas proporções no conteúdo total de proteínas são 49–65 %, 22–42 % e 14–18 %, respectivamente. As globulinas são a principal forma de proteína de estocagem no amaranto, assim como na soja. As globulinas do amaranto são compostas por 11S globulina, globulina-P e uma pequena quantidade de 7S globulina (MARCONE et al., 1994; SEGURA-NIETO et al., 1994; MARTINEZ et al., 1997; GORINSTEIN et al., 2002).

1.5.2 Ação bioativa do amaranto

Além de suas características nutricionais, estudos têm demonstrado que a introdução do amaranto na dieta pode prevenir ou diminuir o risco da ocorrência de doenças por apresentar diversos efeitos biológicos benéficos ao organismo, como atividades antioxidante e hipocolesterolemizante (ARÊAS et al., 2016).

TIRONI e AÑÓN (2010) analisaram a presença de atividade antioxidante de proteínas e dos grãos de *Amaranthus mantegazzuanus*. Este estudo mostrou a presença de peptídeos antioxidantes no isolado proteico e nas frações albumina, globulina e glutelina, tendo nesta última maior atividade. QUEIROZ e colaboradores (2009) avaliaram o efeito de processamentos térmicos na atividade antioxidante do grão de amaranto. Os processamentos reduziram o teor de fenólicos totais do grão de amaranto. Os processos de extrusão, torração e explosão não alteraram a capacidade de inibição da oxidação lipídica do amaranto, já o cozimento aumentou essa inibição, ou seja, os produtos do amaranto possuem atividade antioxidante.

DANZ E LUPTON (1992) relataram redução na concentração de colesterol sérico em ratos após a introdução de dieta contendo grão de amaranto em quantidade suficiente para prover 8% de fibra alimentar à ração. BOURDAKIS e colaboradores (2015) confirmaram efeito preventivo da farinha de amaranto em camundongos com concentrações de colesterol total e LDL-c iniciais aumentadas no plasma.

GAMEL e colaboradores (2004) investigaram o efeito hipocolesterolemizante dos grãos das espécies *caudatus* e *cruentus* em ratos cuja ração continha amaranto suficiente para fornecer 10% de proteína durante oito dias, observando redução nas concentrações de colesterol total em ambos os casos.

Outras investigações também demonstraram que o amaranto é um alimento hipocolesterolemizante (CHATURVEDI et al., 1993; GRAJETA, 1997; 2002; BERGER et al., 2003ab). PLATE e ARÊAS (2002) verificaram que a fração lipídica do grão desempenha um papel menos importante na redução do colesterol plasmático e que os componentes do grão livres de lipídeos e, conseqüentemente, das demais substâncias lipossolúveis, respondiam por grande parte do efeito hipocolesterolemizante deste grão.

Tendo em vista as características da proteína da semente do amaranto, MENDONÇA (2006) estudou o potencial efeito do isolado proteico de amaranto na redução do colesterol em hamsters hipercolesterolemizados. Em grupo cuja ração continha 20% de isolado proteico verificou-se pronunciado efeito, com redução de 48% do colesterol total e 56% do colesterol não-HDL, quando comparado ao grupo controle com ração contendo 20% de caseína.

Ao utilizar como fração proteica da dieta uma mistura que simulava o perfil de aminoácidos do amaranto, MENDONÇA (2006) observou que os teores de colesterol plasmático não foram alterados significativamente em animais hipercolesterolemizados, quando comparado aos alimentados com uma mistura de aminoácidos que simulava o perfil da caseína. Desta forma, verificou que a proteína do amaranto possui pronunciado efeito hipocolesterolemizante, que não pode ser explicado pelo perfil de aminoácidos. A digestibilidade verdadeira das proteínas, próxima a 100%, aparentemente também não está relacionada a essa redução.

ASSIS-VAZ (2010) distribuiu ratos Wistar em quatro grupos, que receberam dietas diferenciadas pela fonte proteica. Os grupos experimentais (I e Icol) receberam dieta com 20 % de proteína de amaranto e os grupos controle (C e Ccol) receberam dieta com 20 % de caseína. A um grupo experimental (Icol) e a um grupo controle (Ccol) foi adicionado 1 % de colesterol. A dieta Icol promoveu menor concentração plasmática de colesterol total e triglicérides em comparação ao grupo Ccol. Observou-se no fígado dos animais dos grupos experimentais (I e Icol) menor concentração de lipídeos totais e colesterol.

SILVA-SÁNCHEZ e colaboradores (2008) buscaram peptídeos bioativos nas seqüências de proteínas de amaranto conhecidas e reportadas na base de dados NCBI Entrez Protein. As seqüências de proteínas foram confrontadas com as seqüências de peptídeos bioativos da base de dados Biopep (www.uwm.edu.pl/biochemia), que continha 1573 fragmentos reportados. O estudo biocomputacional demonstrou que o amaranto pode ser uma fonte potencial de peptídeos bioativos, mas ainda não há relatos na literatura sobre a presença de peptídeos hipocolesterolemizantes no amaranto (DAVIGNON et al., 1992).

2 Justificativa

Proteínas alimentares podem ser utilizadas para benefícios à saúde em diversos casos, pois em geral apresentam alta seletividade, causando poucos efeitos colaterais, possuem efeitos potentes e rápidos e não tratam somente o sintoma em casos de doença. Com a demonstração do efeito da proteína do amaranto como a fração responsável majoritariamente pelo efeito hipocolesterolemizante observado experimentalmente torna-se fundamental o esclarecimento dos mecanismos de ação biológica. A verificação da ocorrência de peptídeos hipocolesterolemizantes na sua digestão incompleta e a elucidação dos mecanismos pelos quais o amaranto e o isolado proteico promovem a redução do colesterol plasmático são etapas que precedem o incentivo à produção de seu isolado proteico e incorporação em uma dieta saudável e equilibrada, ou seja, para futura disseminação do seu uso pela população.

Pesquisas com peptídeos bioativos do amaranto estão apenas em seu início, e como primeira etapa no estudo é essencial a compreensão da relação entre estrutura e função. Considerando-se a diversidade e a complexidade das seqüências proteicas, é importante para o estudo de peptídeos o desenvolvimento de metodologias de separação eficientes para produtos hidrolisados, bem como a investigação da atividade de fragmentos com diferentes estruturas primárias. Assim, este estudo visa verificar parte do digestoma resultante da quebra do isolado proteico de amaranto. Como complemento deve-se verificar quais as vias metabólicas envolvidas na redução de colesterol proporcionada por sua ingestão.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Analisar a biodisponibilidade de peptídeos em modelos animais após ingestão de isolado proteico de amaranto e relacioná-la com parâmetros ligados ao metabolismo do colesterol.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar os peptídeos formados a partir da hidrólise *in vitro* do isolado proteico do amaranto.
- Avaliar a biodisponibilidade dos peptídeos do amaranto por identificação dos peptídeos no sangue de animais e comparação com os perfis peptídicos encontrados na análise *in vitro*.
- Analisar o impacto do consumo de dieta contendo o isolado proteico de amaranto nas concentrações de colesterol total e frações e triglicérides circulantes, na excreção de colesterol e ácidos biliares e no perfil de ácidos graxos do fígado de hamsters hipercolesterolemizados.
- Avaliar o efeito do consumo de dieta contendo o isolado proteico do amaranto na atividade enzimática e expressão gênica em vias relacionadas ao metabolismo de lípidos de hamsters.

4 Materiais e métodos

O esquema geral deste trabalho se encontra na figura 7.

Figura 7. Esquema geral da metodologia empregada neste estudo.

4.1 Obtenção da matéria prima

O grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria) foi obtido da empresa Celeiro (Planaltina – DF). Após o recebimento os grãos foram separados das sujidades manualmente, moídos em moinho de martelos (MML 100 Astecma – Brasil) e a farinha foi tamizada em peneira interna média de 1 mm (Granutest – Brasil). Esta foi armazenada a 4 °C até posterior utilização.

A farinha do grão de amaranto foi desengordurada com hexano PA na proporção 1:5 (m/v), de acordo com metodologia de MARTÍNEZ e AÑÓN (1996). A

mistura foi agitada por 6 horas em agitador magnético. Seguiu-se a filtração em papel filtro qualitativo e, posteriormente, a secagem em estufa a 40 °C para evaporação total do solvente. A farinha desengordurada foi peneirada em tamiz 0,42 mm (Granutest – Brasil) e armazenada a 4 °C.

O fluxograma do isolamento proteico da farinha de amaranto encontra-se resumido na figura 8.

Figura 8. Fluxograma do isolamento proteico da farinha de amaranto

A proteína do amaranto foi isolada pelo princípio de precipitação isoelétrica segundo MARTÍNEZ e AÑÓN (1996), com modificações de MENDONÇA (2006). A cada parte de farinha desengordurada foram adicionadas dez partes de água. O pH

foi elevado a 11 com NaOH 1 mol.L⁻¹. A mistura foi agitada em agitador magnético por 5 horas a temperatura ambiente. Posteriormente a mistura de pH 11 foi centrifugada a 9000 xg por 20 min a 10 °C.

Após novo ajuste do pH do sobrenadante a 5,7 com HCl 1 mol.L⁻¹, o homogenato foi agitado em agitador magnético por 10 minutos e permaneceu por doze horas à 4 °C. Uma nova centrifugação a 9000 xg foi realizada e o precipitado (isolado proteico) foi congelado. Após obtenção do isolado proteico este foi liofilizado e triturado em moedor de facas IKA M20.

4.2 Caracterização das farinhas e do isolado proteico

A farinha integral, a farinha desengordurada e o isolado proteico de amaranto foram analisados quanto ao conteúdo de umidade, por dissecação a 105 °C; de cinzas, por incineração da matéria orgânica a 550 °C; e de lipídeos, por extração a quente com éter de petróleo, de acordo com metodologias descritas pela AOAC (2010). Para a análise de proteínas foi utilizado o método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2010), os fatores de conversão de nitrogênio em proteína utilizados foram 5,85 para as farinhas e 6,12 para o isolado proteico, valores obtidos por cálculo de acordo com o perfil de aminoácidos das farinhas e do isolado proteico analisados (SOSULSKY e IMAFIDON, 1990; MENDONÇA, 2006). Os carboidratos totais foram determinados por diferença.

As análises do perfil de aminoácidos totais e de triptofano foram realizadas no laboratório CBO Análises, localizado na cidade de Campinas, São Paulo. A preparação das amostras para análise de aminoácidos totais envolveu as etapas de

hidrólise para liberação dos aminoácidos, preparação dos hidrolisados através de secagem e derivatização e separação dos derivados de feniltiocarbamil por cromatografia líquida de alta eficiência, de acordo com metodologia proposta por WHITE e colaboradores (1986). Para a realização da hidrólise foram pesados cerca de 0,2 g de proteína e norleucina (utilizada como padrão interno), a razão amostra/padrão interno requerida é aproximadamente 15:1. A seguir foram adicionados 100 mL de ácido clorídrico 6 mol.L⁻¹ contendo 0.1% de fenol, a mistura foi refluxada por 20 h a 110 °C. Após resfriamento o volume foi completado para 200 mL e a amostra foi filtrada em filtro de fibra de vidro.

Para remoção de proteínas de alta massa molecular e lipídeos, a amostra foi eluída em cartucho C18 Sep-pak. Um mililitro 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). A derivatização foi então iniciada pela adição de 20 µL de solução contendo etanol 95% v/v, água, trietilamina e fenilisotiocianato na proporção em volume 7:1:1:1, resultando nos derivados feniltiocarbamil.

Os derivados foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência 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 formada por 940 mL de acetato de sódio 0,14 mol.L⁻¹, pH 6,4, contendo 0,05% de trietilamina, e 60 mL de acetonitrila grau HPLC. O eluente B era formado por 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. Os derivados feniltiocarbamil foram detectados por absorção no UV, com utilização do 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 através de método descrito por SPIES (1967), usando-se hidrólise enzimática com pronase a 40 °C por 24 horas, uma vez que a hidrólise ácida destrói este aminoácido.

A solubilidade do isolado e das farinhas foi analisada pela preparação de uma suspensão contendo 0,4 g de proteína completada para 40 mL com água, tampão A (32,5 mmol.L⁻¹ de K₂HPO₄ e 2,6 mmol.L⁻¹ de KH₂PO₄, pH 7,5, e 0,4 mol.L⁻¹ de NaCl) ou tampão B (33,3 mmol.L⁻¹ de K₂HPO₄ e 1,7 mmol.L⁻¹ de KH₂PO₄, pH 8,5). As amostras foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos à temperatura ambiente (SCILINGO et al., 2002). Dez mililitros dos sobrenadantes das farinhas e dois mililitros dos sobrenadantes do isolado proteico foram coletados para quantificação das proteínas solúveis. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2010) e a solubilidade em cada solvente foi calculada pela fórmula:

$$\%S = \frac{100 \times mg \text{ proteína solúvel}}{mg \text{ proteína total}}$$

4.3 Análise *in vitro*

A digestão *in vitro* do isolado proteico foi realizada empregando-se método enzimático que contempla as enzimas pepsina e pancreatina, baseada no método sugerido por MINEKUS et al. (2014). Aproximadamente 2,5 g de isolado proteico foram pesados e adicionados de 7,5 mL de NaCl 30 mM, ajustando-se ao pH 3,0. Em seguida acrescentou-se pepsina na razão 1: 270 enzima/proteína (P7012,

Sigma), sendo a mistura levada ao banho por 2 horas a 37 °C, com agitação. Após este tempo o pH foi ajustado para 7,0 e adicionou-se pancreatina na razão 1:125 enzima/proteína (P7545, Sigma; atividade equivalente 8x U.S.P.), sendo a mistura levada ao banho por mais 2 horas a 37 °C, com agitação. Em seguida os tubos foram deixados por 20 min a 80 °C para inativação da enzima. As amostras foram centrifugadas a 10000 xg/15 min/15 °C. O sobrenadante foi coletado para análises posteriores.

4.3.1 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise do isolado proteico foi determinado de acordo com HOYLE e MERRIT (1994), com modificações de HARRIMAN et al. (2013). Aliquotas dos sobrenadantes dos hidrolisados foram agitadas com solução de TCA 20% na proporção 1:1 para obtenção da fração solúvel final em TCA 10%. Após repouso de 30 minutos a mistura foi centrifugada a 3000 xg e o conteúdo proteico solúvel do sobrenadante foi determinado pelo método de Kjeldahl. O resultado foi expresso em porcentagem de peptídeos solúveis em relação a proteína total da amostra. A análise foi realizada em triplicata.

4.3.2 Perfil eletroforético

O perfil eletroforético visou a verificação dos perfis de massa molecular da farinha do grão integral, da farinha desengordurada, do isolado proteico e do produto digerido (sobrenadante da hidrólise e sobrenadante em TCA) em comparação ao padrão de eletroforese Kaleidoscope Prestained (BioRad 161-0324). A eletroforese SDS-PAGE foi realizada de acordo com metodologia proposta por LAEMMLI (1970). O gel de análise apresentava 10% m/v de acrilamida em tampão TRIS-HCl pH 8,8. O

equipamento utilizado para eletroforese foi do tipo vertical, da Amersham Biosciences (Uppsala - Suécia) Hoefer miniVE. Cinquenta microgramas de proteína foram aplicadas em cada poço. A amperagem fixa foi 20 mA para cada gel de 1,0 mm. Após a corrida os géis foram corados com solução de azul de 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 determinadas as massas moleculares das frações proteicas por comparação aos padrões de massa molecular, a similaridade entre as amostras e a densidade óptica das bandas.

4.3.3 Identificação de peptídeos

Para a análise de peptídeos o hidrolisado liofilizado foi dissolvido em ácido fórmico 0,5% e depositado em placas de 96 poços em injetor automático SIL-20A para análise em espectrômetro de massas LC/MS equipado com ionizador ESI e analisador de massas IT-TOF (Shimadzu, Japão). Os peptídeos foram separados em coluna Discovery C18 1.5 (2 × 50 mm) usando como fase móvel 0,5% ácido fórmico (A) e acetonitrila 90% contendo 0,5% de ácido fórmico (B) em um gradiente linear de B para A de 0 a 100% durante 15 min, sob fluxo constante de 0,2 mL.min⁻¹.

Após confirmação dos estados de carga, foi realizado o sequenciamento *de novo* de peptídeos, onde o íon de interesse foi selecionado em uma janela de massa de 0,5 m/z e fragmentado. Os espectros foram obtidos na faixa de 100 a 3000 m/z. A aquisição dos dados se deu pelo software LCMS Solution Suite (Shimadzu). O espectro gerado foi analisado pelo software Peaks Mass Spectrometry (BioinformaticsSolutions Inc., Canadá), esse software foi usado para o

sequenciamento *de novo*. A sequência peptídica gerada foi comparada com um espectro teórico, obtido pelo Protein Prospector.

4.4 Experimento *in vivo* 1

O esquema geral do Experimento *in vivo* 1 se encontra na figura 9 a seguir.

Figura 9. Esquema geral do experimento *in vivo* 1.

O experimento *in vivo* 1 foi conduzido em fase aguda para conhecimento da biodisponibilidade dos peptídeos hipocolesterolemizantes formados na digestão da proteína do amaranto. O ensaio biológico foi desenvolvido no Biotério de experimentação para ratos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O protocolo experimental seguiu as normas do *Canadian Concilon Animal Care* (OLFERT et al., 1993) e foi submetido ao Comitê de Ética no uso de Animais da Faculdade (CEUA FMUSP protocolo de pesquisa 088/14).

Os animais foram alojados em gaiolas com maravalha autoclavada, em local arejado. A temperatura foi controlada entre 20 e 25°C, umidade relativa de 55 %, com janelas escurecidas para o controle do ciclo de claro/escuro de 12 horas.

Foram utilizados 13 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, rodentia, mammalia), com 21 dias de idade (recém desmamados), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP.

Durante o período de sete dias de adaptação, os animais receberam ração comercial NUVILAC CRI (Nuvital Nutrientes AS, Colombo-PR) e água *ad libitum*. Após este período eles foram submetidos a jejum de 8 horas e distribuídos por amostragem casual sistemática, conforme discriminado na figura 9, em: basal (n=1), referente ao tempo pré dose (tempo zero); três grupos “isolado” (n=9), nas concentrações de 250, 375 e 500 mg de isolado/kg peso do animal e um grupo controle (n=3), considerando os tempos de sacrifício em 20, 60 e 120 minutos após gavagem.

4.4.1 Coleta e análise de sangue

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com cloridrato de xilasina (Rompun, Bayer®) – 1 mg/kg de peso (pré anestésico) e cloridrato de ketamina (Ketalar, Pfizer®) – 10 mg/kg de peso (anestésico geral). O sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubos BD Vacutainer® distintos para a obtenção do soro (tubo amarelo, BD SST II Advancer) e do plasma (tubo lilás, com EDTA) após centrifugação por 10 minutos a 1200 xg, sob temperatura ambiente. A centrifugação ocorreu até a primeira hora após coleta.

Os sobrenadantes liofilizados foram dissolvidos em ácido fórmico 0,5% e o procedimento foi seguido como descrito no item 4.3.3 para identificação dos peptídeos do sangue dos animais (plasma e soro). Das sequências obtidas foram excluídas aquelas iguais entre animais intervenção versus controles e basais; e aquelas encontradas somente em controles e basais.

4.5 Experimento *in vivo* 2

O segundo experimento *in vivo*, de maior duração em relação ao primeiro, foi proposto para que fosse possível inferir sobre os mecanismos de ação dos peptídeos do amaranto no metabolismo lipídico. Este ensaio foi conduzido no Biotério de experimentação para ratos do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP).

Na figura 10 é mostrado o esquema geral do Experimento *in vivo* 2. O protocolo experimental seguiu as normas do *Canadian Concilon Animal Care* (OLFERT et al., 1993) e foi submetido ao Comitê de Ética no uso de animais do

Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT-USP), protocolo CPE IMT 000290A de 2014 e ao Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina FMUSP, protocolo 196 de 2014.

Figura 10. Esquema geral do experimento *in vivo* 2.

Os animais foram alojados individualmente em gaiolas com maravalha autoclavada, em local arejado. Temperatura e umidade relativa foram controladas, bem como o ciclo de claro/escuro de 12 horas.

Foram utilizados 24 hamsters (*Mesocricetus auratus*), linhagem Golden Syrian, com 28 dias de idade e padrão sanitário convencional, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Os animais passaram por um período de sete dias de adaptação durante o qual receberam ração comercial NUVILAC CRI (Nuvital Nutrientes AS, Colombo-PR) e água *ad libitum*. Posteriormente os animais foram distribuídos por amostragem casual sistemática em 3 grupos, segundo quadro 1 a seguir.

Quadro 1. Discriminação dos grupos de animais, segundo tipo de dieta administrada, n=8 em cada grupo. Experimento *in vivo* 2.

Grupo	Sigla	Descrição do grupo
Controle Normo	N	Consumidor da dieta contendo caseína e nutrientes balanceados para dieta saudável de acordo com preconização para roedores.
Controle Hiper	H	Consumidor da dieta contendo caseína e nutrientes hipercolesterolemizantes.
Intervenção Hiper	I	Consumidor da dieta contendo isolado proteico de amaranto e nutrientes hipercolesterolemizantes.

A formulação das rações é baseada nas recomendações nutricionais do *National Research Council* (1995), conforme exposta no quadro 2, e acrescidas de mistura de minerais e vitaminas adequada ao crescimento de hamsters, de acordo

com as recomendações para roedores do Instituto Americano de Nutrição para Crescimento Animal - AIN-93 (REEVES et al., 1993).

Quadro 2. Necessidades nutricionais de hamsters em fase de crescimento (animal com 35 a 130 g).

Componentes da dieta	Quantidade (g.100 g⁻¹)
Fibras	5 a 15
Carboidratos	65
Lipídeos	4 a 20
Proteínas	18 a 24

Fonte: National Research Council (1995).

A formulação da dieta que induziria a hipercolesterolemia foi baseada em outros estudos que desenvolveram ensaios com hamsters e demonstraram bons resultados para este efeito (TERPSTRA et al., 1991; LUCAS et al., 2001; FROTA et al., 2008; VILLANUEVA et al., 2011).

As rações foram fabricadas por encomenda, com ingredientes purificados. Elas foram peletizadas e embaladas a vácuo pela PragSoluções Serviços e Comércio LTDA, Jaú, São Paulo, e armazenadas em freezer (-20 °C) para conservação.

Para avaliar o efeito do consumo da proteína de amaranto em animais com moderado aumento da colesterolemia foi adicionado colesterol (Sigma) e 13,5% de óleo de coco às rações H e I (FROTA et al., 2007; ZHANG et al., 2009). Na figura 11 encontra-se a foto das três rações utilizadas neste experimento.

Figura 11. Rações ofertadas aos animais durante 21 dias do experimento, da esquerda para a direita: ração N, ração H, ração I.

A composição das dietas está disposta no quadro 3.

Quadro 3. Composição das dietas administradas, segundo grupo de animais.

Ingredientes (g/kg dieta)	Dietas		
	N	H	I
Caseína^a	287	287	-
Isolado amaranto^b	-	-	271
Sacarose	50	50	50
Amido de milho	368	368	380
Celulose	100	100	100
Óleo de soja	147	11	11
Gordura de côco	-	135	135
Colesterol	-	1	1
Bitartarato de colina	3	3	3
Mistura mineral	35	35	35
Mistura vitamínica	10	10	10

Considerando: ^a 83,7 % de proteína; ^b 88,6 % de proteína.

A caseína foi usada como fonte proteica das rações N e H. O isolado proteico do amaranto, previamente produzido em escala laboratorial, foi fornecido para a

produção da ração experimental I. Sendo o fosforo um nutriente importante no processo de expressão proteica, o mesmo foi quantificado no isolado proteico e na caseína, obtendo-se os valores de 0,32 e 1,81 %, respectivamente. Os valores foram ajustados na composição da ração I com fosfato de potássio monobásico. No quadro 3 está relacionada a composição da dieta dos três grupos.

4.5.1 Composição centesimal das dietas

Os teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos foram determinados, em triplicata, de acordo com métodos da AOAC (2010).

O teor de colesterol total foi determinado de acordo com a metodologia proposta por CSALLANY et al. (1989) e TERPSTRA et al. (1998). As rações foram homogeneizadas em solução de saponificação (hidróxido de potássio 11g.100mL⁻¹ diluído em etanol 55% (v/v). Após banho-maria por 15 minutos a 80 °C e resfriamento, foi realizada a partição, sendo selecionada para análise a fase orgânica. A quantificação do colesterol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em equipamento da marca Shimadzu (Tokio, Japão) com coluna cromatográfica Cyano (Phenomenex). O volume de injeção foi de 20 µL. A fase móvel foi preparada com n-hexano/isopropanol (97:3 v/v), com fluxo isocrático de 1 mL/min. O detector utilizado foi o diode array, no comprimento de onda de 206 nm. A quantificação foi realizada utilizando curva de calibração com padrão da Steraloids Inc-USA. As análises foram realizadas em triplicata.

Os ácidos graxos foram determinados como ésteres metílicos de ácidos graxos através de cromatografia gasosa. A extração dos lipídeos foi feita por através de técnica de BLIGH-DYER (1959). A formação de ésteres metílicos seguiu o

método sugerido por HARTAM e LAGO (1973). A identificação se deu em cromatógrafo a gás Shimadzu (GC-2010, Tokio, Japão), equipado com coluna capilar de 100m (Supelco SP-2560), diâmetro interno de 0,25mm. O forno foi operado com temperatura inicial de 140 °C por 5 minutos e final de 230 °C, com rampa de 4 °C/min, temperatura do injetor 250 °C e detector 260 °C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio, com fluxo de 1,0 mL/min, razão de divisão 1:30. Foi injetado o volume de 1 uL de amostra. Os picos dos principais ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados através do tempo de retenção comparado com padrão Sigma (St Louis, USA), para fatty acid methyl esters mixture (189-19). A análise foi qualitativa, sendo a proporção de cada ácido graxo calculada dividindo-se a área do seu pico pela área total da corrida.

4.5.2 Consumo alimentar

A ingestão das dietas foi determinada diariamente durante os 21 dias de experimento. A quantidade ingerida foi calculada por meio da diferença entre a quantidade ofertada e as sobras deixadas no comedouro.

4.5.3 Ganho de peso

Durante o período experimental os animais foram pesados em balança digital semi-analítica modelo MA-BS 2000 Marconi, duas vezes por semana no mesmo horário, para avaliar o ganho de peso.

A partir da razão entre ganho de peso e a quantidade de ração ingerida foi calculado o Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) de cada dieta.

4.5.4 Coleta de material biológico

Nos três últimos dias de experimento foi realizada a coleta diária das fezes dos animais. Para a coleta, as gaiolas foram adaptadas com dois pisos, a fim de separar as fezes da maravalha e da urina. As fezes foram pesadas em balança analítica e liofilizadas em liofilizador (Operon Modelo FDB-5503, Japão) por 72 horas a -60 °C, e armazenadas a -20 °C para a posterior realização das análises.

A coleta do sangue foi efetuada por punção cardíaca sob anestesia. Foram utilizados como anestésicos cloridrato de quetamina (10 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg de peso) (KIM e SHIN, 1998). Esta se deu juntamente com o sacrifício dos animais. Optou-se por não deixar os animais em jejum, uma vez que eles possuem a capacidade de armazenar alimentos em suas bochechas e que não se verificou diferença no perfil lipídico de hamsters submetidos a jejum de 18 horas ou não submetidos à jejum (WEIGAND e DAGGY, 1991).

O sangue foi coletado e acondicionado em tubos BD Vacutainer® (Tubo Gel BD SST® II Advance®, com ativador de coágulo e gel separador (BD, Brasil) e transportado em até duas horas após a coleta para o Laboratório de Análises Especiais LAE – LIM 03 (Patologia Clínica / Medicina Laboratorial), onde foi centrifugado (3000 x g, 15 minutos, 4 °C) para análise dos lipídeos no soro. Os animais morreram devido a exsanguinação total.

O fígado foi retirado e pesado em balança analítica (Shimadzu Modelo AX 200). Os lobos foram cortados em pequenos pedaços (de 30 a 100 mg, dependendo da análise), pesados, identificados, acondicionados em micro tubos e congelados em gelo seco até o transporte para o Laboratório de Composição Centesimal dos

Alimentos da FSP/USP, onde estes foram armazenados em ultra freezer a -80 °C até a realização das análises.

Todo o material biológico não utilizado nos experimentos foi descartado, segundo as Normas de Segurança Laboratorial, no descarte de material biológico da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os materiais utilizados para análises estão discriminados no quadro 4, a seguir.

Quadro 4. Análises realizadas, segundo material biológico. Experimento *in vivo* 2.

Material	Análise
Sangue	Colesterol total e frações, triglicérides Identificação de peptídeos
Fígado	Colesterol total Lipídeos totais Ácidos graxos <i>Srebf2, Ldlr, Abca1, Abcg1, Abcg5, Abcg8, Lxra, Ampk</i> (expressão) Hmgcr (atividade enzimática, expressão)
Fezes	Colesterol total Ácidos biliares

4.5.5 Determinação dos lipídeos séricos

Os exames foram realizados no Laboratório de Análises Especiais LAE – LIM 03 (patologia clínica/medicina laboratorial). As concentrações de colesterol total (CT), triglicérides (TG) e HDL-c foram determinadas por método colorimétrico

enzimático, utilizando kits enzimáticos pelo sistema COBAS modelo C 111 (ROCHE).

O conteúdo de colesterol associado à VLDL foi calculado como TG/5, e o colesterol associado a LDL foi calculado por meio da fórmula de FRIEDEWALD et al. (1972), onde:

$$\text{LDL-c} = \text{CT} - \text{HDL-c} - \left(\text{TG}/5\right)$$

A partir desses resultados foi calculada a razão TG/HDL-c. Os índices de Castelli I (colesterol/HDL-c) e II (LDL-c/HDL-c) também foram obtidos para estimar o risco cardiovascular dos animais.

4.5.6 Identificação de peptídeos no soro dos animais

Parte do soro dos hamsters foi liofilizado e dissolvido em ácido fórmico 0,5%, o procedimento foi seguido como descrito no item 4.3.3 para identificação dos peptídeos do sangue dos animais. Das sequencias obtidas foram excluídas aquelas iguais (mesmos resíduos de aminoácidos e mesma massa molecular) entre animais intervenção (I) versus controles (N e H); e aquelas encontradas somente em controles.

4.5.7 Análises nas fezes

Assim como ocorre com as rações, as cores das fezes do grupo I são mais escuras que as cores dos grupos N e H, e as fezes do grupo H possuem aspecto mais lipídico que as fezes do grupo N.

Para a análise de colesterol nas fezes alíquotas de 50 mg (previamente liofilizadas, trituradas em moinho IKA – WERKE Modelo M20 e homogeneizadas) foram submetidas à saponificação com 700 µL de metanol e 220 µL de solução de NaOH 5M, em banho-maria a 80 °C, com agitação constante, durante duas horas. Após resfriamento, adicionou-se solução saturada de NaCl, e o colesterol foi extraído três vezes com 700 µL de éter de petróleo (TERPSTRA et al., 1998). A amostra foi então seca e ressuspensa em 1 mL de n-hexano grau HPLC para a separação, identificação e quantificação do colesterol, conforme descrito anteriormente no item 4.5.1. A análise foi realizada em triplicata.

Os ácidos biliares foram quantificados utilizando o *kit* comercial enzimático colorimétrico *Total Bile Acids Assay*, da marca Diazyme (San Diego, USA). Alíquotas de 50 mg de fezes foram homogeneizadas com 1 mL de tert-butanol a 50 % (v/v) e mantidas em banho-maria, com agitação, a 37 °C por 20 minutos, para extração das frações lipídicas. As amostras foram então centrifugadas (10.000 x g por 2 minutos) para obtenção do sobrenadante, contendo os ácidos biliares (VAN DER MEER et al., 1985). Na sequência, em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (fundo plano, transparente, Greiner Bio-one GmbH) foram pipetados 135 µL do reagente R1 (Thio-NAD > 0.1 mM, Buffer), 2 µL do sobrenadante (amostra) ou padrão (contido no *kit*) ou água deionizada (branco), a placa foi agitada e incubada a 37 °C por 3 minutos (em leitor de placas, modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc) e mediu-se a absorbância do branco a 405 nm. Foram então pipetados 45 µL do reagente R2 (3-α-HSD > 2kU/L, NADH > 0.1mM, Buffer) contidos no *kit*, seguidos de agitação da placa. As amostras e o padrão foram então submetidos às leituras de absorbância em leitor de placas a 37 °C a 405 nm nos tempos 60 e 120 minutos.

Na presença de Tio-NAD, a enzima 3- α hidroxisteróide desidrogenase converte os ácidos biliares em 3-cetoesteróides e Tio-NADH. A taxa de formação de Tio-NADH é determinada pela mudança de absorbância a 405 nm, mensurada entre os 60 e 120 segundos de reação. Para o cálculo da quantidade de ácidos biliares nas amostras, foi utilizada a equação fornecida pelo *kit* e depois ajustada para grama de fezes secas, onde:

$$\text{Total de Ácidos Biliares } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min Amostra} - \Delta A_{405\text{nm}}/\text{min Branco}}{\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min Padrão} - \Delta A_{405\text{nm}}/\text{min Branco}} \times \text{Padrão}$$

A análise foi realizada em triplicata.

4.5.8 Análises no fígado

Para obtenção do extrato lipídico dos fígados utilizou-se a metodologia proposta por BLIGH e DYER (1959) com adaptações. Esta análise determina as substâncias solúveis nos solventes apolares clorofórmio e metanol. Amostras entre 300 a 400 mg de fígado foram adicionadas de 500 μL de metanol e 100 μL de KCl 0,88 % (m/v), homogeneizadas e adicionadas de 1000 μL clorofórmio. A seguir, o extrato foi filtrado em papel qualitativo e lavado cinco vezes com 1000 μL de clorofórmio para a extração total dos lipídeos. A quantidade de lipídeos extraídos foi determinada gravimetricamente e a análise foi realizada em triplicata (BLIGH e DYER, 1959).

A análise de ácidos graxos no fígado dos hamsters se deu por extração de lipídeos de acordo com a metodologia de BLIGH E DYER (1959), com modificações. Às amostras de 100 mg de fígado foi adicionado KCl 0,88%, a mistura foi homogeneizada com mini turrax até homogeneização completa. Após essa etapa

ocorreu adição de metanol, homogeneização, adição de clorofórmio e nova homogeneização. Coleta-se a fase inferior (clorofórmio). O preparo dos ésteres metílicos se deu por Hartman e Lago (1973), também com modificações (Método056/IV, IAL, 2005), com adição de solução NaOH 0,5M em metanol, aquecimento a 60-70°C por 5 min, adição de solução esterificante (cloreto de amônio + 300 mL de metanol+ 15 mL de H₂SO₄), novo aquecimento a 60-70°C por 5 min. Após essas etapas adiciona-se solução saturada de NaCl e n-hexano para partição. A parte orgânica foi então injetada em cromatógrafo gasoso, conforme descrito no item 4.5.1.

O método proposto por KATSANIDIS e ADDIS (1999) foi utilizado para determinação do colesterol hepático, com algumas modificações. Amostras entre 300 a 400 mg de fígado foram homogeneizadas em solução de saponificação (KOH 11% m/v, diluído em etanol 55% v/v). A seguir foram colocadas em banho-maria a 80 °C, com agitação constante, durante 15 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 500 µL de hexano e em seguida 300 µL de água deionizada (a adição de água ocasiona um aumento da polaridade da fase aquosa e promove a partição do colesterol na fase orgânica), sendo selecionada para análise a fase orgânica. A amostra foi então seca e ressuspensa em 1 mL de n-hexano grau HPLC para a separação, identificação e quantificação do colesterol, tal qual citado no item 4.5.1.

Para inferir o efeito sobre a síntese, metabolismo e transporte do colesterol, também foi avaliada a expressão do RNAm hepático utilizando-se os seguintes ensaios (códigos de assay da Applied Biosystems): *HMGCR* (Hs00168352_m1), *SREBF2* (Hs01081784_m1), *LDLR* (Hs00181192_m1), *ABCA1* (Hs01059118_m1), *ABCG1* (Hs01555189_m1), *ABCG5* (Hs00223686_m1), *ABCG8* (Hs00223690_m1), *AMPK* (Hs01562315_m1), *LXRα* (Hs00172885_m1), *HPRT1* (Hs02800695_m1).

Para a extração do RNA total foi utilizado o conjunto de reagentes RNeasy mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) seguindo as indicações do fornecedor. O rendimento do RNA total foi avaliado por espectrofotometria no ultravioleta (UV) utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop® (NanoDrop Technologies INC., Wilmington, DE, EUA) e o grau de pureza do RNA determinado pela relação $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$. A integridade do RNA foi avaliada utilizando-se o equipamento bioanalyzer® 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

O cDNA foi gerado a partir de 1 µg de RNA, utilizando-se 200 ng de iniciadores aleatórios (random primers) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), DTT 10 mmol/L (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), dNTPs 500 µmol/L (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), 200 U de transcriptase reversa (RT) (SuperScript™ II RT RNase H-) e tampão de RT [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). O ensaio de transcrição reversa foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, EUA) com as seguintes etapas: 25 °C por 10 min, 42 °C por 50 min e 70 °C por 15 min. O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C até a realização do PCR.

A expressão do RNA dos genes foi realizada por reação de transcrição reversa seguida de amplificação por PCR em tempo real, por procedimento previamente descrito por GENVIGIR et al. (2010). A medida quantitativa da expressão do RNA dos genes estudados foi realizada por PCR em tempo real utilizando o sistema de amplificação TaqMan® RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) empregando-se o equipamento ABI Prism 7500 FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa. Com a finalidade de escolher o gene

endógeno mais adequado para nosso modelo, vários genes foram testados e analisados no programa GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002). Os iniciadores e as sondas marcadas com fluoróforo foram fornecidos em solução 20 vezes concentrada pelo serviço “Assay by design” e/ou “Assay on demand” (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA). O gene endógeno escolhido foi HPRT1.

As análises de quantificação relativa da expressão de RNAm dos genes estudados foram realizadas utilizando o método do ΔC_t , com base na fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Previamente, foram calculadas as eficiências de todos os ensaios, sendo considerados adequados valores entre 90 e 110 % (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

A atividade da enzima Hmgcr no fígado foi medida por meio do Kit CS 1090 da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA) com adaptações baseadas no trabalho de CONG et al. (2012). Fragmentos de cerca de 50 mg de tecido hepático dos animais foram homogeneizados em 250 μ L de tampão contendo 100 mM de tampão de fosfato (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 em pH 7,5), 200 mM de KCl, 5 mM de EGTA, 5 mM de EDTA, 10 mM de DTT, 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de aprotinina e 0,5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de leupeptina no gelo, por 45 segundos, em mini turrax, e centrifugados por 5 minutos a 3100 rpm e 4 °C.

Para a análise da atividade da Hmgcr foram utilizados 20 μ L do sobrenadante. As leituras foram obtidas a partir de Leitor de Placas da marca Spectramax® M5 da Molecular Devices e o software Softmax® Pro5. A absorbância a 340 nm foi monitorizada em intervalos de tempo de 20 segundos, para um tempo total de 25 minutos. Uma unidade da atividade da Hmgcr corresponde a conversão de 1 μmol de NADPH a NADP formado por minuto a 37 °C. A concentração de proteína hepática foi determinada por meio do kit de ensaio de Proteínas BCA Pierce (Thermo Scientific, USA). Os resultados foram obtidos em triplicata.

4.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias e desvio-padrão. As variáveis contínuas foram comparadas pelo teste t de Student para duas amostras ou Análise de Variância (ANOVA) para três amostras. Quando ANOVA revelou diferença significativa, utilizou-se o teste de Tukey de comparação múltipla. O nível de significância estabelecido, para todos os testes estatísticos aplicados, foi de $p=0,05$. O software utilizado foi o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 13.0 para Windows.

5 Resultados e discussão

5.1 Caracterização das farinhas integral, desengordurada e do isolado proteico

5.1.1 Composição química

Os resultados das análises de composição centesimal da farinha integral, da farinha desengordurada e do isolado proteico encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal das amostras analisadas (base úmida).

Parâmetro	Farinha integral	Farinha desengordurada	Isolado proteico
Umidade (g.100g ⁻¹)	9,1 ± 0,1	10,7 ± 0,1	5,8 ± 0,3
Cinzas (g.100g ⁻¹)	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,0	1,0 ± 0,3
Proteínas (g.100g ⁻¹)	14,9 ± 0,6	13,8 ± 0,9	89,0
Lipídeos (g.100g ⁻¹)	5,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	2,5 ± 0,7
Carboidratos* (g.100g ⁻¹)	68,1	72,7	1,7

Resultados das triplicatas expressos em média ± desvio padrão.

* calculados por diferença.

Ao final do desengorduramento com hexano foi constatada a grande remoção dos lipídeos presentes na farinha integral, e após o isolamento a grande remoção de carboidratos. O teor de proteínas encontrado no grão de amaranto é considerado alto em relação a outros cereais (TEUTÔNICO E KNORR, 1985; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989), o que viabilizou o isolamento de sua proteína.

Com relação a pureza alguns estudos consideram isolado proteico a farinha de amaranto que contém cerca de 80 a 85% de proteínas (SALCEDO-CHÁVEZ et al., 2002; SCILINGO et al., 2002). A concentração mínima de proteína preconizada para o isolado proteico de soja é 88% (ABIA, 1991). Desta forma, considera-se que foi obtida pureza proteica para que o produto do isolamento seja considerado isolado proteico de amaranto.

Foi analisado ainda o perfil de aminoácidos durante o processamento para verificação de possível extração de frações proteicas. Houve pouca variação na composição aminoacídica das proteínas na farinha integral e no isolado proteico, com modificações (mudança em mais de 20% da concentração da farinha integral) relacionadas a redução de cerca de 24% do teor de glicina e 26% de valina e aumento de prolina em 22% no isolado proteico, tendo esses três aminoácidos características apolares. O maior destaque de redução de concentração se deu no aminoácido triptofano (mais da metade foi removido). A análise de triptofano pode ter resultado em menor solubilização do isolado proteico para quantificação em relação a farinha integral.

Os resultados do perfil de aminoácidos estão descritos na tabela 2. MENDONÇA (2006) encontrou valores próximos desses aminoácidos no isolamento proteico que promoveu a redução do colesterol plasmático em hamsters. Vale destacar que os teores dos aminoácidos essenciais da farinha de amaranto e do isolado proteico estão acima ou semelhantes ao preconizado pela FAO (2007) para manutenção da saúde (tabela 2), mesmo com a teórica perda significativa de triptofano. As proteínas do amaranto, como verificado neste e em outros estudos (VENSKUTONIS e KRAUJALIS, 2013; MOTA et al., 2016), possuem melhor balanço

aminoacídico e maior valor biológico que a maioria dos cereais. Portanto não houve a necessidade da adição de aminoácidos à ração dos hamsters (item 4.5.1).

Tabela 2. Perfil de aminoácidos totais da farinha integral e do isolado protéico.

Aminoácido	Farinha integral de amaranto mg/100g proteína	Isolado proteico de amaranto mg/100g proteína	Recomendação FAO (2007) mg/100g proteína
Ácido Aspartico	8,3	8,4	
Ácido Glutâmico	18,6	17,3	
Serina	6,4	5,5	
Glicina	9,0	6,8	
Histidina	2,6	3,2	1,5
Taurina	0,0	0,0	
Arginina	9,8	11,5	
Treonina	3,6	3,6	2,3
Alanina	4,3	4,6	
Prolina	4,5	5,8	
Valina	4,4	3,5	3,9
Metionina	2,0	2,4	
Cistina	2,0	1,8	
Soma Metionina+Cistina	4,0	4,2	2,5
Isoleucina	3,7	3,8	3,0
Leucina	6,1	6,5	5,9
Tirosina	3,3	4,0	
Fenilalanina	4,6	4,7	
Soma Tirosina+Fenilalanina	7,9	8,7	6,3
Lisina	6,2	5,2	4,5
Triptofano	2,2	1,0	0,6

Aminoácidos em negrito são ditos essenciais, uma vez que nosso organismo não consegue sintetizá-los. Devem ser obtidos por dieta em quantidade recomendada pela FAO (2007).

5.1.2 Solubilidade

Os dados de solubilidade das amostras encontram-se na tabela 3. Verifica-se que a farinha integral e a farinha desengordurada foram mais solúveis em água que o isolado proteico. Isso provavelmente ocorreu pela perda de frações hidrossolúveis e, principalmente, pela formação de aglomerados proteicos durante o isolamento. Em concentrados proteicos de *Amaranthus cruentus* que continham de 58 a 70% de proteína, a solubilidade em água variou de 15 a 60% (BEJOSANO e CORKE, 1999). A solubilidade de isolado proteico de *Amaranthus hypochondriacus* foi de cerca de 39%, utilizando-se pH 9 para solubilização e 5 para precipitação durante o isolamento (SCILINGO et al., 2002).

Tabela 3. Perfil de solubilidade das amostras em diferentes solventes.

Parâmetro	Farinha integral	Farinha desengordurada	Isolado proteico
Solubilidade em água (g/100g)	20,5bx ± 1,0	21,3bx ± 0,9	3,5ax ± 0,0
Solubilidade no tampão A (g/100g)	27,6by ± 0,9	34,4cy ± 1,7	20,6ay ± 0,1
Solubilidade no tampão B (g/100g)	32,9abz ± 1,5	35,9by ± 1,4	30,0az ± 0,5

Resultados das triplicatas expressos como média ± desvio padrão.

Na mesma linha letras diferentes (a,b,c) representam diferença estatística.

Na mesma coluna letras diferentes (x, y, z) representam diferença estatística.

Verifica-se que a capacidade de solubilização da proteína em água depende dos reagentes utilizados no isolamento por precipitação isoeletrica e de suas

concentrações. A agregação ditada pelo balanço de forças entre as moléculas de proteína parcialmente desnaturadas, de modo geral, depende do pH, o qual controla a carga líquida da proteína, e da força iônica, que limita as interações eletrostáticas (AYMARD et al., 1999). A pH próximo ao ponto isoelétrico da proteína e sob força iônica alta, condições deste estudo, a repulsão eletrostática entre as moléculas é baixa, propiciando a formação de agregados (KAVANAGH et al., 2000; IKEDA e MORRIS, 2002).

As frações em soluções salinas tornaram-se mais disponíveis para a clivagem enzimática após o desengorduramento devido à liberação das moléculas anteriormente ligadas a substâncias lipossolúveis, indicando que o desengorduramento a frio com hexano foi eficiente nesse sentido.

Porém, após o isolamento proteico as amostras apresentaram, comparadas à farinha integral, a mesma solubilidade em tampão B e tornaram-se menos solúveis em tampão A. A causa pode ser a formação de agregados proteicos insolúveis (CONDE et al., 2005). Os resultados indicam que o desengorduramento e o isolamento proteico podem promover modificações nas estruturas terciária e quaternária das proteínas, admitindo maior ou menor disponibilidade à hidrólise enzimática.

O tampão A é o melhor solvente para a globulina 11S e albuminas e o tampão B para algumas frações das globulinas-P. SCILINGO e colaboradores (2002), da mesma forma, encontraram para o isolado proteico os maiores valores de solubilidade no tampão B (75%), seguido pelo tampão A (61%), e baixa solubilidade

proteica em água, explicado pela presença de uma quantidade significativa de globulinas, que são insolúveis nesse meio.

São diversos os agentes que influenciam na digestibilidade proteica *in vitro*. Os fatores antinutricionais, grandes responsáveis pela baixa digestibilidade proteica, são em grande parte eliminados durante o processo de isolamento, aumentando o grau de digestibilidade das proteínas vegetais (PAREDES-LÓPEZ et al., 1994). Mas algumas proteínas, como as prolaminas, são hidrofóbicas, e enzimas proteolíticas atuam em ambiente aquoso, dificultando sua ação nos sítios de clivagem. (GUO et al., 2007). Desta forma, optou-se por utilizar um meio salino durante a digestão enzimática, que permite que as enzimas acessem os sítios de clivagem das proteínas mais facilmente.

5.2 Experimento *in vitro* - caracterização do produto de digestão

A adição de TCA foi o método escolhido para análise do grau de hidrólise. Precipitou-se a fração não digerida da proteína e a fração solúvel em TCA constituiu os aminoácidos e peptídeos de baixa massa molecular, maiores candidatas a permear as células intestinais. Proteínas são mais insolúveis quando presentes em baixo pH, apesar do aumento da força iônica proporcionado pela adição desse ácido. (CONDE et al., 2005).

O grau de hidrólise do isolado proteico apresentou média de $65,7\% \pm 1,7\%$. Em estudo de SETHI e KULKARNI (1993) o isolado protéico de soja hidrolisado com pepsina e pancreatina apresentou digestibilidade *in vitro* entre 71-76 g/100g de proteína. Essa diferença pode estar relacionada não somente a matéria prima, como

também à proporção enzima:substrato ou ao tempo de incubação utilizados. Destaca-se, entretanto, que a hidrólise deste estudo promoveu redução no tamanho molecular de grande parte das cadeias proteicas, de forma que elas se tornaram mais solúveis em TCA.

5.2.1 Perfil eletroforético

A análise eletroforética das farinhas integral e desengordurada, do isolado proteico e dos sobrenadantes após hidrólise está representada pela figura 12 (a, b). Foi possível separar as cinco frações proteicas de maior massa molecular no padrão (miosina – 196 kDa, beta-galactosidase – 131 kDa, albumina bovina sérica – 91 kDa, anidrase carbônica – 42 kDa e inibidor de tripsina de soja – 32 kDa).

Figura 12. (a) Foto do gel de eletroforese; (b) Perfil densiométrico e massas moleculares do gel. Amostras: (1) farinha integral, (2) farinha desengordurada, (3) isolado proteico, (4) mistura de enzimas da hidrólise in vitro, (5) sobrenadante após hidrólise (6) sobrenadante com TCA (7) padrão de massa molecular.

Comparando-se as farinhas e o isolado proteico verificou-se que pouco do perfil foi modificado pelos processamentos. As frações com massa molecular 263, 118 e 53 kDa aparecem após o isolamento, provavelmente devido à formação de aglomerados de frações de menores massas. Porém a intensidade óptica dessas bandas é pequena em relação às outras frações, representando 2,5; 3,0 e 2,1% do total, respectivamente.

Observou-se que as frações majoritárias foram mantidas, havendo perda apenas da fração de massa molecular de 60 kDa, que nas farinhas representam cerca de 5% da intensidade óptica em cada amostra.

As espécies menores que 100 kDa são formadas em sua maioria por albuminas (SCILINGO et al., 2002). Contudo, MARCONE e YADA (1991) encontraram pelo menos seis subunidades de globulina de massas entre 67 e 14 kDa. A globulina-P é composta por moléculas unitárias com massas moleculares e composição polipeptídica similares às da 11S globulina (COOKE, 1984; MARTÍNEZ et al., 1997; GORINSTEIN et al., 2002). As glutelinas também apresentam características moleculares similares às das globulinas 11S do amaranto (GORINSTEIN et al., 2002), o que resulta em algumas frações ópticas muito densas, como ocorreu no presente estudo. Após a hidrólise, o perfil eletroforético foi drasticamente modificado, sendo que frações acima de 30 kDa não foram observadas.

5.2.2 Identificação de peptídeos por espectrometria de massas

Nos alimentos, grande parte das proteínas encontra-se com o N-terminal bloqueado, geralmente acilado, o que permite que as moléculas possuam maior estabilidade. Com relação à digestão e absorção destes fragmentos, há remoção do grupo acila pela ação de endopeptidases, capazes de liberar peptídeos com N-terminal acetilado, seguida pela enzima N-acilpeptídeo hidrolase, que catalisa a liberação de acetato e do aminoácido ou peptídeo livres (BRACHET et al., 1991).

As sequencias mais abundantes encontradas no hidrolisado do isolado proteico de amaranto estão apresentadas no quadro 5. Após obtenção das frações identificadas a partir da hidrólise foi feita a confrontação com banco de dados. Buscou-se verificar se as mesmas já haviam sido encontrados no amaranto, para tanto foi utilizado o BLAST com busca no gênero *Amaranthus*, taxid 3564. O BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool) é uma ferramenta básica de alinhamento local de sequências.

Ao informar a sequência de interesse, o BLAST indica se a mesma já foi identificada em banco de dados baseados em pesquisas e literatura científica. Seu acesso pode ser feito por meio da página <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>>. O quadro 5 conta ainda com uma coluna que elenca sequencias peptídicas similares às encontradas neste estudo. Foram selecionados fragmentos com cobertura e identidade acima de 70% em relação ao peptídeo identificado. Verifica-se no quadro 5 que as frações obtidas na hidrólise não obtiveram 100 % de correlação para o amaranto. Isso indica que não houve correspondência com os peptídeos já identificados, porém não exclui a possibilidade de representarem peptídeos do amaranto que ainda não foram

identificados. Lá estão relatadas sequencias similares às divulgadas para outras espécies de amaranto, portanto é necessária a confirmação das sequencias do *Amaranthus cruentus* para posterior divulgação dessa identificação no BLAST.

Quadro 5. Identificação das frações majoritárias de peptídeos encontrados no hidrolisado proteico de amaranto.

Sequencia peptídica	Massa molecular observada (Da)	Solubilidade em água ^a	Peptídeos similares BLAST e massa molecular calculada (Da) ^b
FFSASC	660,3	Baixa	FFSANA (<i>A. retroflexus</i>) 655,7
NLLAGYD	764,4	Baixa	LLLAGYL (<i>A. tricolor</i>) 762,0
DLLNSSR	803,4	Alta	DLLSTSR (<i>A. hypocondriaucus</i> e <i>A. tricolor</i>) 790,9 DLLNNSQ (<i>A. hypocondriaucus</i> e <i>A. tricolor</i>) 802,8
QTLNSRS	804,4	Alta	QTLNKTV (<i>A. hypocondriaucus</i> e <i>A. tricolor</i>) 802,9
WGSAPNLRK	1140,6	Alta	-
TKQAKAGSSSSPL	1260,7	Alta	-
SMNVGVGSGPAPAES	1358,6	Baixa	-
LNGSLPEDNFSGLYM	1655,8	Baixa	-
GKVSLLLDNFSGLYM	1655,9	Baixa	-
RQSLVDKNFSGLYM	1656,8	Alta	-
LDNFMASAQLDNNFPK	1823,9	Alta	-

^a Cálculo da hidrofobicidade dos resíduos (I, V, L, F, C, M, A, W) integrantes das sequencias de peptídeos na Innovagen's peptide property calculator.

^b Massa Molecular calculada usando Innovagen's peptide property calculator.
Letras destacadas em vermelho visam mostrar similaridade entre peptídeos.

É possível observar ainda que alguns dos peptídeos listados no quadro 5 podem competir com o colesterol por sua absorção levando-se em conta sua hidrofobicidade. Estruturas micelares podem ser formadas com preferencial rearranjo dos sais biliares em torno dessas estruturas hidrofóbicas, competindo com o colesterol. Mais estudos estruturais são necessários para determinar como esses peptídeos específicos se associam ao colesterol e a sais biliares. Em se tratando de peptídeos que exercem efeito sistêmico, em geral moléculas lipofílicas atravessam a membrana celular por transporte transcelular, enquanto as hidrofílicas tendem a utilizar mecanismos paracelulares. Moléculas mais apolares tendem a ser mais facilmente transportáveis, apresentando maior permeabilidade (BERJENO e RUIZ-GARCIA, 2002). Para análise da biodisponibilidade dos peptídeos do amarantho estes dados de identificação serão posteriormente confrontados aos peptídeos identificados nos experimentos *in vivo* 1 e 2.

5.3 Experimento *in vivo* 1 – biodisponibilidade de peptídeos

Ratos são bons preditores para estimar a absorção de compostos (ZHAO et al., 2003) uma vez que refletem a mucosa humana no que diz respeito ao espaço paracelular. Estudos verificaram que a absorção de algumas partículas foi maior em ratos em relação a hamsters e camundongos, e similar a de humanos (DELIE, 1998; ANTUNES et al., 2013).

Os ratos apresentaram dezenas de diferentes sequências de peptídeos tanto no plasma como no soro, sendo que os peptídeos selecionados para análise foram aqueles que apresentaram um grau de confiança analítico (ALC) maior que 20%.

Foram identificados nestes parâmetros 9 fragmentos no plasma e 54 no soro do grupo C, incluindo fragmentos repetidos (mesma sequência em mais de um animal do mesmo grupo). Já para o grupo I foram encontrados 16 peptídeos no plasma e 49 no soro, incluindo fragmentos repetidos. Verificou-se, ainda, que soro e plasma apresentaram poucas semelhanças no perfil de fragmentos. As diferenças podem ter ocorrido porque sem atuação de anticoagulante no tubo para obtenção de soro, plaquetas e fibrinogênio são consumidos. Além disso, no processo de coagulação para preparo do soro fragmentos podem ser liberados por plaquetas e outras células (ISAAQ et al., 2007). Para fins de comparação com a base de dados (BLAST) foram selecionados os peptídeos cujas sequências não eram similares (mesmos aminoácidos na cadeia) às encontradas nos animais controle. Aminoácidos e dipeptídeos foram excluídos da análise.

Nos quadros 6 e 7 estão apresentados os peptídeos do grupo intervenção presentes no plasma ou no soro dos animais, respectivamente, e selecionados para análise no BLAST.

Quadro 6. Sequência de peptídeos no plasma dos ratos do grupo intervenção.

Sequência peptídica	Massa molecular (Da)^a	BLAST <i>Rattus</i>^b	BLAST <i>Amaranthus</i>^c
HEWN	584,2	Sim	Não
MAMDVQADL	992,4	MPLDVQAD	Não
MDCCGG	584,1	MDCCN	MSCCGG
TYM	413,2	Sim	Não
YTM	413,2	Sim	Não
WEDLR	717,3	Sim	WELLR
YCSC	474,1	Sim	Não

^a Massa molecular analisada pelo equipamento.

Quadro 7. Sequencia de peptídeos no soro dos ratos do grupo intervenção.

Sequencia peptídica^a	Massa molecular (Da)^b	BLAST <i>Rattus</i>	BLAST <i>Amaranthus</i>
ALGV	358,2	Sim	Sim (<i>A. retroflexus</i>)
WRDL	588,3	Sim	TSRDL
SEVRGESES	978,4	SQVRSESDS	ETSGEEES
CLSEPKSES	978,4	CLSEPKMSS	Não
CLSQLLSES	978,5	KLSQLLSED/DLEQLLSES	Não
TTPSTGMDAN	993,4	DEPSTGMDPV	Não
SDDPRAGYLS	1079,5	DFDPRASYLE	Não
CLADDVKESLA	1162,6	CLSDEVKESKR	CLKLVVADNELG
GFSLDVQESSP	1164,5	GLSLDIQEFVC	SLDIKQESSP
MASLDVCARPMA	1263,6	SLEVSLCAPPMA	Não

^a Massa molecular analisada pelo equipamento.

Para fins de comparação entre os fragmentos encontrados e as bases de dados de peptídeos de ratos e de amaranto foi realizado BLAST da espécie *Rattus norvegicus*, taxid 10116, e do gênero *Amaranthus*, taxid 3564. Foram selecionados fragmentos com cobertura e identidade acima de 70% em relação ao peptídeo identificado, sendo sim = sequencia com 100% de cobertura e identidade, não = sequencia com cobertura e identidade abaixo de 70%.

Assim como para os peptídeos do isolado proteico, o fato do BLAST não resultar em 100% de cobertura das sequencias não indica que estas não ocorram no amaranto, elas podem simplesmente não ter sido descritas na literatura. O rato, por outro lado, teve suas proteínas muito bem estudadas, o que pode ter acarretado na maior cobertura de sequencias.

Destaca-se no quadro 7 a sequência ALGV, com baixa massa molecular (358,4 Da) e baixa solubilidade em água de acordo com a ferramenta peptide calculator e que, portanto, possui grande potencial de absorção. O fato deste peptídeo estar encriptado em proteína de ratos não significa que ele seja clivado e disponível para circulação no sangue, mas isso pode ocorrer com a proteína do amaranto pós digestão gastrointestinal.

Peptídeos semelhantes ao ALGV são apontados na literatura como hipocolesterolemizantes. O peptídeo IAEK induz a supressão da absorção do colesterol diminuindo a solubilidade micelar do mesmo (NAGAOKA e col., 2001), e a sequência IAVP, isolada da proteína 11S da soja, atua como inibidor da HMG-CoA redutase, ação similar a uma estatina, competindo pelo mesmo sítio ativo que a NADPH (PAK e col., 2005a). O peptídeo IAVP, tal qual ALGV, possui característica hidrofóbica e massa molecular semelhante (398,5 Da).

Nesta pesquisa não houve coincidência entre os fragmentos mais abundantes encontrados no hidrolisado *in vitro* do amaranto (item 5.2.2) e os fragmentos mais abundantes presentes em plasma ou soro de ratos. Em trabalho anterior nosso grupo de pesquisa utilizou metodologia de hidrólise *in vitro* diferente da metodologia usada nesta pesquisa, identificando três peptídeos principais (GGV, IVG/LVG e VGVI/VGVL). Desses, GGV, IVG e VGVL inibiram a atividade da enzima HMGCR, sendo o último o mais potente inibidor testado (SOARES et al., 2015). Estes peptídeos são similares a ALGV, assim a investigação mais aprofundada deste fragmento merece destaque.

5.4 Experimento *in vivo* 2 – metabolismo do colesterol

Optou-se por utilizar hamster por se tratar de um roedor pequeno, sensível a dietas suplementadas com colesterol e ricas em gorduras (DORFMAN, 2005; YIN et al, 2012), muito empregado em estudos que avaliam o efeito de drogas e dietas no metabolismo lipídico e aterosclerose. O perfil de lipoproteínas do hamster assemelha-se mais com o dos humanos do que outros roedores, pois aproximadamente 50% do colesterol plasmático é transportado nas partículas LDL, e apresentam na circulação a proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), característica que não está presente em ratos e camundongos selvagens (NISTOR et al., 1987; LOCK et al., 2005). Estes animais também regulam a secreção de ácidos biliares e sintetizam colesterol hepático e ácidos biliares de maneira similar aos humanos (BRAVO et al., 1994; ZHANG et al., 2009).

5.4.1 Composição centesimal das dietas do experimento *in vivo* 2

A composição centesimal das três dietas é mostrada na Tabela 4. A distribuição dos macronutrientes foi considerada semelhante entre as três dietas e refletiu concordância com a composição planejada. Apesar de estatisticamente haver maior quantidade de lipídeos na dieta do grupo N, os grupos H e I (hipercolesterolemizados) apresentaram quantidade semelhante deste nutriente e de colesterol, portanto este dado não foi considerado um viés para o estudo, podendo ser fruto de variações analíticas e de processamento. Assim, foi considerado que as rações diferiram entre si não em relação à quantidade, mas sim ao tipo de lipídeos utilizados. A composição de ácidos graxos das dietas utilizadas neste estudo pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 4. Composição centesimal das dietas do experimento 2 (base úmida).

Parâmetro	Grupo N	Grupo H	Grupo I
Proteínas (g.100g ⁻¹)	22,2 ± 0,6	23,2 ± 0,6	23,2 ± 0,4
Lipídeos (g.100g ⁻¹)	15,4b ± 0,4	13,5a ± 0,6	14,1a ± 0,1
Colesterol (mg.100g ⁻¹)	-	31,0 ± 3,3	30,9 ± 2,8
Carboidratos* (g.100g ⁻¹)	51,1	53,0	50,8
Energia (kcal)	432	427	423
Energia (kJ)	1807	1788	1770

Para os resultados (triplicatas) expressos em média ± desvio padrão as letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05).

- não detectado.

* calculados por diferença.

Tabela 5. Perfil de ácidos graxos (% da área total) das dietas.

Ácido Graxo	Grupo N % área	Grupo H % área	Grupo I % área
8:0 caprílico	-	9,3	12,5
10:0 cáprico	1,9	5,8	5,7
12:0 láurico	-	53,9	48,7
14:0 mirístico	-	12,3	11,0
16:0 palmítico	13	5,8	6,2
18:1n9 oleico	20,7	8,4	9,9
18:2n6 linoleico	56,8	4,4	5,9
18:3n3 linolênico	7,5	-	-
Soma SAFA	14,9	87,1	84,1
Soma MUFA	20,7	8,4	9,9
Soma PUFA	64,3	4,4	5,9
P/S index	4,32	0,05	0,07

- não detectável

SAFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados. P/S index: razão entre ácidos graxos poli-insaturados e saturados.

Estas diferenças no perfil de ácidos graxos se dão pela presença de óleo de coco e colesterol nas dietas hipercolesterolemizantes, comparado à dieta N, à base de óleo de soja. Os ácidos graxos saturados presentes nas dietas H e I, como caprílico, cáprico, láurico e mirístico, além do palmítico (que aparece nas três rações), são associados a alterações no metabolismo do colesterol, como por exemplo, diminuição dos LDLR no fígado e aumento da trigliceridemia (LOTTENBERG, 2009). Os ácidos graxos dietéticos têm um efeito considerável nas concentrações plasmáticas de LDL-c. Os PUFA's da família n-6 e os MUFA's possuem efeito benéfico, e entre os ácidos graxos saturados o esteárico parece ter um efeito neutro enquanto que os ácidos láurico, mirístico e palmítico são hipercolesterolêmicos (FERNANDEZ e WEST, 2005).

A ração do grupo N foi formulada de modo que mantivesse “normal” o perfil lipídico dos animais (com óleo de soja como fonte lipídica), de acordo com a AIN-93 (REEVES et al., 1993), e as rações dos grupos H e I foram planejadas de modo que alterassem o perfil lipídico dos animais, induzindo a hipercolesterolemia (com gordura saturada e colesterol como fonte lipídica). A gordura de coco foi escolhida para ser utilizada nas dietas hipercolesterolêmicas devido ao fato de conter alta proporção de ácidos graxos saturados e por seu consumo estar associado à elevação de colesterol total e LDL-c (COX et al., 1995; Eyres et al., 2016).

5.4.2 Consumo das rações e ganho de peso dos animais

A Tabela 6 apresenta os dados de consumo alimentar e peso dos animais. Não houve diferença estatística entre os grupos para nenhum dos parâmetros indicados, confirmando a homogeneidade entre os animais estudados.

Tabela 6. Parâmetros de peso dos animais, ingestão de dieta e coeficiente de eficácia alimentar em hamsters após 21 dias de administração de dietas.

Parâmetro	Grupo N (n=8)	Grupo H (n=8)	Grupo I (n=8)
Peso inicial (g)	103,8 ± 8,1	105,8 ± 8,4	106,9 ± 10,2
Ganho de peso total (g)	21,3 ± 7,0	19,4 ± 4,6	20,1 ± 3,4
Ingestão total de ração (g)	107,4 ± 25,5	97,4 ± 12,0	115,7 ± 13,1
Ingestão diária média (g)	6,4 ± 1,7	6,3 ± 1,0	7,0 ± 0,8
CEA (%)	19,6 ± 4,0	19,9 ± 3,8	17,3 ± 3,4

Valores expressos em média ± desvio padrão.
CEA (Coeficiente de eficácia alimentar).

A distribuição dos animais em grupos no início do experimento foi feita de maneira a homogeneizar os grupos, por isso não houve diferença nos pesos iniciais. A ingestão diária e total de ração foi equivalente entre os animais dos grupos N, H e I. Também não houve diferença de ganho de peso e no coeficiente de eficácia alimentar (CEA) entre grupos.

Ressalta-se que os valores de digestibilidade verdadeira da proteína do amaranto e da caseína encontrados por MENDONÇA (2006), a partir da oferta à hamsters de dietas de composição similar às usadas no trabalho atual, não refletiram diferença estatística entre si. Esta informação exclui a teoria de que efeitos do isolado proteico do amaranto no metabolismo do colesterol poderiam ser decorrentes da menor digestibilidade proteica. O processo de isolamento e suas características como desnaturação proteica e eliminação de fatores antinutricionais provavelmente são os fatores que permitem a digestão proteica quase completa do isolado de amaranto.

5.4.3 Perfil de lipídeos séricos

Na figura 13 estão apresentadas as concentrações séricas médias de colesterol total, colesterol associado à HDL, à LDL, à VLDL-c, e triglicérides dos animais de cada grupo experimental.

A dieta H induziu a hipercolesterolemia conforme esperado e já relatado em estudos prévios conduzidos com o mesmo delineamento experimental (FROTA et al., 2008; DIAS, 2012; FONTANARI et al., 2012). Em modelo clássico de homeostase do colesterol, após sua fração dietética ser entregue ao fígado por quilomícrons remanescentes, uma quantidade deste é esterificada e armazenada no fígado. Em paralelo pode ocorrer a supressão da síntese do colesterol, porém esse modelo é alterado por ingestão simultânea de triglicérides saturados.

Figura 13. Concentrações séricas de lipídios nos grupos estudados.

*indica diferença estatística; colchete indica o par analisado, $p < 0,05$.

n=8 para todos os grupos.

Grupo N: dieta de acordo com AIN-93.

Grupo H: dieta hipercolesterolemizante.

Grupo I: dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

A ação de ácidos graxos saturados consiste em aumentar o efeito supressor da dieta via LDLR e, em contrapartida, elevar a concentração plasmática de LDL-c. Portanto, já era esperado que os animais que consumiram uma combinação de pequena quantidade de colesterol (0,03% de colesterol na dieta dos animais corresponde a cerca de 75mg de colesterol por 1000 kcal de ingestão diária em humanos, uma dieta ocidental típica contém aproximadamente 300-500mg de colesterol por dia) com grande proporção de ácidos graxos saturados fossem diagnosticados com concentrações elevadas de LDL-c, próximo ao que ocorre com humanos que consomem dieta ocidental (SPADY e DIETSCHY, 1988; BJÖRKHEM, 2013; WANG, 2007). Constam na figura 14 os índices que estimam o risco cardiovascular dos animais.

Figura 14. Índices de risco cardiovascular associados às concentrações séricas de lipídios nos grupos estudados.

*indica diferença estatística; colchete indica o par analisado, $p < 0,05$.

$n=8$ para todos os grupos.

Grupo N: dieta de acordo com AIN-93.

Grupo H: dieta hipercolesterolemizante.

Grupo I: dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

Observa-se que o isolado proteico de amaranto apresentou perfil menos aterogênico em relação ao grupo hipercolesterolemizado sem isolado proteico de amaranto, evidenciado a partir da diferença estatística observada entre os grupos I e H, e similaridade de médias entre os grupos N e I em todos os parâmetros avaliados, corroborando com o efeito redutor da colesterolemia do amaranto.

Em relação à razão TG/HDL-c, os grupos N e I não mostraram diferença significativa em relação ao grupo H. Esta razão é proposta como um marcador aterogênico prático e de fácil utilização. Porém, para os marcadores LDL/HDL e col/HDL foi observada diferença estatística entre os grupos H e I, e semelhança entre N e I. Desta forma verifica-se que o isolado proteico foi efetivo na proteção cardiovascular, uma vez que os índices de Castelli I e II são considerados bons preditivos a respeito de risco coronariano, pois o aumento do HDL-c está mais prevalentemente relacionado à regressão da formação de placas aterogênicas que a redução absoluta de LDL-c ou colesterol total (MILLÁN et al., 2009).

5.4.4 Colesterol e ácidos biliares nas fezes

Houve diferença significativa na excreção de colesterol entre os grupos I e H. Porém, conforme observado previamente por nosso grupo de pesquisa (MEDONÇA, 2006), o grupo I não apresentou maior excreção de ácidos biliares em relação ao grupo H e apresentou menor excreção deste em relação ao grupo N. Os teores de colesterol e ácidos biliares excretados nas fezes dos animais encontram-se na figura 15.

Figura 15. Concentrações de colesterol total e ácidos biliares em função do grupo analisado.

*indica diferença estatística; colchete indica o par analisado, $p < 0,05$.

$n=8$ para todos os grupos.

Grupo N: dieta de acordo com AIN-93.

Grupo H: dieta hipercolesterolemizante.

Grupo I: dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

Experimentos com modelos animais sugerem que uma quantidade significativa de colesterol é secretada diretamente no intestino, um processo conhecido como excreção transintestinal de colesterol (TICE). O colesterol plasmático pode atravessar o intestino delgado no sentido basolateral-apical, estimulado pela presença de sais biliares e fosfolípidos no lumen intestinal (VAN der VELDE et al., 2010; BLANCHARD et al., 2014; VRINS, 2010). Ainda não se sabe se esse é um processo mediado por transportadores, e é necessária ainda a caracterização do doador do colesterol do plasma para o intestino, a identificação de transportadores localizados na membrana basolateral nas células intestinais, a elucidação dos mecanismos intracelulares de transporte até a membrana apical, a e identificação de transportadores da membrana apical para possíveis aceptores no lumen intestinal (BURA et al., 2013; VRINS et al., 2012).

Especula-se que remanescentes de VLDL ou produtos catabolizados de VLDL podem servir de doadores plasmáticos, liberando colesterol para as células intestinais. Além disso, estudos cinéticos verificaram que uma parte das partículas de LDL são internalizadas nas células intestinais, os receptores de LDL poderiam mediar esse transporte. O transporte ABCG5/G8 poderia facilitar o último passo desse descarte, além de outras proteínas presentes na membrana borda em escova (VAN der VELDE et al, 2007; BRUFAU et al 2008, UTO-KONDO et al, 2014).

Verificou-se ainda que essa rota, que pode ser modulada farmacologicamente com uso de ezetimiba e estatinas, é um processo que envolve diversos órgãos, incluindo o fígado (LE MAY et al, 2013, SCHONEWILLE et al, 2016; TEMEL e BRAWN, 2015). A maioria dos ácidos biliares excretados no intestino é reabsorvida, e por este motivo é baixa a excreção de ácidos biliares nas fezes (DONGOWSKI e EHWALD, 1999).

Em paralelo, ao avaliar o efeito do hidrolisado proteico de amaranto na solubilização micelar de colesterol, CARLOS-MENEZES (2013) observou que a amostra reduziu em cerca de 44% essa solubilização, portanto esta é uma outra possibilidade de mecanismo de ação do amaranto. Peptídeos com resíduos de aminoácidos com N-terminal hidrofóbico e C-terminal hidrofílico, ou seja, com uma estrutura anfipática, favorecem a associação com fosfolipídios, agindo na integridade da micela com consequente redução da solubilidade micelar de colesterol (HOWARD e UDENIGWE, 2013). Este mecanismo necessita ser avaliado futuramente, podendo até ser complementar a TICE.

5.4.5 Lipídeos totais, colesterol e perfil de ácidos graxos no fígado

Abaixo são apresentados os dados relativos às análises de lipídeos e colesterol total hepáticos (figuras 16 e 17, respectivamente). Com relação aos lipídeos hepáticos, observamos deposição de lipídeos significativamente menor nos grupos N e I em relação ao grupo H, concordando mais uma vez com os dados que indicam efeito protetor do amaranto contra o acúmulo de lipídeos hepáticos. O mesmo ocorreu para o colesterol hepático.

OLIVEIRA et al. (2011), verificaram que hamsters alimentados com dietas com 0,5 % de colesterol e 10 % de gordura de coco apresentaram teores hepáticos de colesterol esterificado, fosfolipídeos e triglicérides aumentados, ou seja, o resultado de H em relação a N já era esperado.

Figura 16. Concentração de lipídeos totais nos fígados dos hamsters.

*indica diferença estatística; colchete indica o par analisado, $p < 0,05$.

n=8 para todos os grupos.

Grupo N: dieta de acordo com AIN-93. Grupo H: dieta hipercolesterolemizante.

Grupo I: dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

Lipídeos hepáticos totais: substâncias solúveis em clorofórmio e metanol (triglicérides na grande maioria, seguidos de colesterol e éster, fosfolipídeos e vitaminas lipossolúveis).

Figura 17. Concentração de colesterol total nos fígados dos hamsters.

*indica diferença estatística; colchete indica o par analisado, $p < 0,05$.

n=8 para todos os grupos.

Grupo N: dieta de acordo com AIN-93. Grupo H: dieta hipercolesterolemizante.

Grupo I: dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

Colesterol hepático total: quantificado a partir do extrato lipídico saponificado.

Ao analisarmos em conjunto os resultados dos lipídeos plasmáticos, hepáticos e da excreção fecal de colesterol, infere-se que para os animais do grupo I ocorreu o aumento do desvio de colesterol para a excreção via transporte direto, mantendo assim as concentrações plasmáticas e hepáticas de lipídios similares ao normal (grupo N), e/ou diminuição da solubilização micelar do colesterol e, consequentemente, menor absorção.

Em humanos, assim como em hamsters, a concentração de LDL-c representa um balanço entre a concentração de LDL-c do plasma e a taxa de remoção de LDL-c pelos tecidos do corpo, ambos mediados ou não por receptores. No fígado, porém, somente o transporte dependente de receptor é sujeito à regulação por adição de colesterol e triglicérides na dieta. Os ácidos graxos saturados diminuem a concentração de ésters de colesterol e aumentam as taxas de síntese de esteróis em circunstâncias nas quais o transporte dependente de receptor de LDL é suprimido (SPADY et al, 1986; MEDDINGS e DIETSCHY, 1986; SPADY e DIETSCHY, 1985).

Colesterol e ácidos graxos provenientes da dieta regulam a atividade de LDLR via regulação do pool de ésteres de colesterol e ácidos graxos livres. O pool é afetado pela ACAT, enzima limitante na esterificação do colesterol. (RUMSEY et al., 1995, SPADY et al, 1993, DAUMERIE et al., 1992).

O perfil de ácidos graxos de acordo com os grupos experimentais encontra-se na figura 18, e índices relacionados aos ácidos graxos encontram-se na tabela 7. Observou-se que o perfil de ácidos graxos mirístico e oleico do grupo H foi maior que do grupo I. Apesar de não serem verificadas diferenças no perfil do ácido graxo esteárico a relação oleico/esteárico foi maior no grupo H em relação a N e I.

Figura 18. Perfil dos ésteres metílicos dos ácidos graxos mais abundantes encontrados no fígado dos hamsters.

*indica diferença estatística; colchete indica o par analisado, $p < 0,05$.

$n=8$ para todos os grupos.

Grupo N: dieta de acordo com AIN-93.

Grupo H: dieta hipercolesterolemizante.

Grupo I: dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

O ácido oleico foi um dos que se apresentou em maior abundância no fígado do grupo H. Isto pode ser devido ao aporte de ácidos graxos derivados da síntese endógena, cujo produto é o ácido palmítico (C16:0), o qual pode ser alongado a esteárico e dessaturado a oleico. Maiores proporções de oleico indicam que as enzimas elongases e desaturases deste grupo estão, portanto, mais ativas. Comparado com ácido palmítico, o oleico promove maior acúmulo de triglicérides e outros fatores de transcrição ligados ao acúmulo de lipídeos no fígado. (HERRERA, 1991; EUNJOO, 1994; DZISIAK, 2004).

Tabela 7. Parâmetros relacionados ao perfil de ácidos graxos no fígado dos hamsters.

Parâmetro	Grupo N	Grupo H	Grupo I
SAFA %	50,2 ± 8,1	55,7 ± 6,8	52,9 ± 3,6
MUFA %	12,7a ± 2,5	25,7b ± 5,0	15,2a ± 2,9
PUFA %	37,1b ± 6,6	18,7a ± 2,7	31,9b ± 1,8
P/S index	0,78b ± 0,30	0,34a ± 0,08	0,61b ± 0,07
oleico/esteárico	0,72a ± 0,29	1,53b ± 0,63	0,84a ± 0,23
araquidônico/linoleico	0,37a ± 0,12	0,54b ± 0,11	0,73c ± 0,10

SAFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados.

P/S index: razão entre ácidos graxos poliinsaturados e saturados.

Resultados das triplicatas de cada animal expressos como média ± desvio padrão.

Na mesma linha letras diferentes (a,b,c) representam diferença estatística.

*indica diferença estatística; colchete indica o par analisado, $p < 0,05$.

n=8 para todos os grupos. Grupo N: dieta de acordo com AIN-93. Grupo H: dieta hipercolesterolemizante. Grupo I: dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

Em contrapartida, o grupo I verificou quantidades elevadas de ácidos graxos da família n-6 em relação ao grupo H. A porcentagem de linoleico foi menor, mas a de araquidônico maior no grupo I em relação ao grupo N. PUFAs são comprovadamente benéficos uma vez que reduzem agregações das plaquetas e os

triglicérides e, conseqüentemente, o risco de doenças cardíacas. Eles se classificam em AG ômega 6 (n-6) e ômega 3 (n-3). Atualmente, os AG considerados essenciais são o α -linolênico e linoleico. O ácido araquidônico é um derivado de um ácido graxo essencial, o ácido linoleico, encontrado em animais (CURI et al., 2002; LINS et al., 1993).

A cascata do ácido araquidônico é uma via metabólica do organismo humano que usa o ácido araquidônico para a síntese de mediadores lipídicos de grande importância na fisiologia e patologia humanas, denominados eicosanóides. Este ácido graxo é precursor das prostaglandinas, tromboxanas e prostaciclina, que são um grupo de substâncias que participam na regulação da pressão sanguínea, frequência cardíaca, dilatação vascular, coagulação sanguínea, lipólise, integridade das membranas celulares, sistema nervoso central e inibem a agregação plaquetária. A cascata do ácido araquidônico depende da oxidação deste composto lipídico e é divisível em duas vias principais: a dependente da ciclooxigenase (COX) e a dependente da lipooxigenase (LOX) (BONAA et al, 1990; LINS et al., 1993).

A importância da cascata do ácido araquidônico radica no conjunto de funções desempenhadas pelos eicosanóides na bioquímica das células humanas. O seu papel mais destacado é promover a via pró-inflamatória, mas seu papel estende-se para funções como papel na hemostasia e termorregulação (BONAA et al, 1990; CALDER e GRIMBLE, 2002). Apesar de sua importância do organismo, se abundante esse ácido graxo contribui para a formação de trombos e ateromas, desenvolvimento de processos alérgicos e inflamatórios. Uma dieta rica em n-6 resulta em quadro pró-trombótico e pró-agregatório. Assim, é importante que futuros estudos analisem esses parâmetros nos seres vivos que participarem de estudos com amarantho (BONAA et al, 1990; CALDER e GRIMBLE, 2002).

5.4.6 Expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico

Previamente à análise, como parâmetro de qualidade, o rendimento do RNA total foi avaliado e o grau de pureza do RNA determinado pelas relações A260nm/A280nm e A260nm/230nm. Além disso, com a finalidade de escolher o gene endógeno mais adequado para o modelo biológico estudado vários genes foram testados e analisados no programa GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Os genes escolhidos para teste de gene endógeno foram *B2m*, *Gapdh*, *Hmbs*, *Ubc* e *Hprt1*. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com auxílio do *software* SPSS adotando-se o nível de significância de $p < 0,05$. As diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey. O gene *HRPT1* foi definido como o mais estável nos diferentes grupos estudados, de acordo com a metodologia comparativa proposta pelo índice M do *software* Gnorm.

Foram ainda calculadas ainda as eficiências de todos os ensaios dos genes de interesse (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Com a finalidade de monitorar a precisão dos resultados das reações de amplificação realizadas por RT-PCR, as amostras foram analisadas em duplicata. As eficiências das reações dos ensaios Taqman® foram calculadas mediante a realização de curvas padrão utilizando diluições seriadas do cDNA, onde a inclinação da curva (*coeficiente angular*) determina a eficiência da reação (um *coeficiente angular* de -3,32 indica 100% de eficiência). A maioria dos ensaios mostraram ter eficiência (E) entre 90% e 110% com uma alta reprodutibilidade (R^2 próximo a 1), sendo desta forma considerados adequados para a realização dos experimentos de qPCR. Os ensaios que não obtiveram eficiência satisfatória foram dos genes *Abcg5*, *Ldlr* e *Abcg1*, portanto estes não foram utilizados no ensaio de expressão gênica.

Os genes estudados com relação à expressão gênica foram, portanto, *Hmgcr*, *Srebf2*, *Abca1*, *Abcg8*, *Lxra* e *Ampk*. Os dados mostram que: a digestão humana é capaz de liberar peptídeos hipocolesterolêmicos, mas o possível mecanismo de ação desses peptídeos provavelmente não se dá a nível gênico estudado.

Os resultados das análises desses genes são apresentados abaixo (figuras 19, 20 e 21).

Figura 19. Expressão relativa de mRNA dos genes *Abca1* e *Abcg8* em função do grupo estudado.

n=8 para todos os grupos; p>0,05.

Grupo N: dieta de acordo com AIN-93.

Grupo H: dieta hipercolesterolemizante.

Grupo I: dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

O gene *ABCA1* hepático é crítico para manter os níveis circulantes de partículas de HDL-c por lipidação direta de apoA1, retardando o catabolismo de apoA1 pelo rim e prolongando o seu tempo de residência no plasma. A deleção de *ABCA1* hepática e intestinal resulta numa diminuição de aproximadamente 90 % nos níveis plasmáticos de HDL-c (TIMMINS et al., 2005; BRUNHAM et al., 2006). Apesar da menor concentração de HDL-c encontrada no sangue dos animais do grupo I em

relação aos animais do grupo H não foi possível verificar diferenças estatísticas na expressão, apesar de haver uma tendência da média do grupo H ser maior que os demais (perfis semelhantes nas figuras 13 e 19 – *Abca1*). A verificação da expressão no intestino dos animais pode ajudar a elucidar este mecanismo.

Figura 20. Expressão relativa de mRNA dos genes *Lxra* e *Ampk* em função do grupo estudado. Não houve diferença estatística entre os grupos para ambos os genes.

n=8 para todos os grupos; $p>0,05$. Grupo N: dieta de acordo com AIN-93. Grupo H: dieta hipercolesterolemizante. Grupo I: dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

Os transportadores ABCG5 e ABCG8 formam um heterodímero obrigatório que limita a absorção intestinal e contribui para a secreção de colesterol e esteróis vegetais dos hepatócitos para a bile (YU et al., 2014), por isso acredita-se que a expressão de *Abcg5* teria o mesmo comportamento observado para *Abcg8*, ou seja, sua expressão não teria sido modificada. O grupo N excretou maior concentração de ácidos biliares que o grupo I, em contrapartida os grupos H e I receberam colesterol

da dieta. Estes dois contrapontos podem ter resultado em uma igualdade na expressão do gene *Abcg8*.

Os receptores nucleares ativam ou reprimem a expressão gênica por ligação a regiões reguladoras de genes alvo (CALKIN e TONTONNOZ, 2013). LXR α é um receptor nuclear ativado por oxisteróis considerado como o principal regulador da expressão de *ABCG5* e *ABCG8* (YU et al., 2014). Ademais, já foi inferido que LXR regula negativamente a via de LDLR, refletindo mais um mecanismo de regulação da captação de colesterol (ZELCER et al., 2009). Assim como ocorreu para o gene *Abcg8*, a expressão de *Lxr α* não foi modificada pela dieta, mas isso não significa que a expressão de *Ldlr* não possa estar alterada no fígado dos animais.

A AMPK é um regulador central da homeostase energética, que coordena as vias metabólicas e, assim, balanceia o suprimento de nutrientes com a demanda de energia. Como um sensor de energia celular, AMPK é ativada em resposta a uma variedade de condições que esgotam os níveis de energia celular, tais como a restrição de nutrientes (especialmente glicose (KIM et al., 2016). A AMPK fosforila e inativa a acetil-CoA-carboxilase, que atua na etapa limitante da síntese *de novo* de ácidos graxos (HARVEY e FERRIER, 2012).

Apesar na diferença do perfil de ácidos graxos do fígado não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do gene *Ampk*. Acredita-se que, considerando a ampla capacidade de atuação deste regulador e uma vez que as dietas formuladas atendiam as recomendações energéticas (fato corroborado pelo ganho de peso dos animais ao longo do experimento), a *Ampk* não sofreu interferências em virtude das dietas oferecidas.

Figura 21. Expressão relativa de mRNA dos genes *Srebf2* e *Hmgcr* em função do grupo estudado.

n=8 para todos os grupos; $p>0,05$. Grupo N: dieta de acordo com AIN-93. Grupo H: dieta hipercolesterolemizante. Grupo I: dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

O SREBP2 é conhecido por regular a expressão hepática de HMGCR e LDLR, as principais proteínas envolvidas no enriquecimento do colesterol no fígado (SINGH et al., 2013). No trabalho atual houve uma tendência, não significativa, da expressão do *SREBF2* ser maior no grupo N quando comparada aos demais. Neste sentido há corroboração da ideia de que com altas taxas de colesterol dietético há inibição do SREBP2. Da mesma forma, pode ser notada uma tendência (não significativa) de maior expressão do gene *Hmgcr* no grupo N em relação aos demais. Assim, verifica-se que a alteração na produção de RNAm do gene nem sempre está diretamente relacionada ao rendimento de sua atividade biológica. Por isso é necessário aprofundamento e confirmação dos dados por meio de outras metodologias, como medida de sua atividade.

5.4.7 Atividade da enzima Hmgcr

A figura 22 ilustra os resultados de análise da atividade enzimática da Hmgcr. Verifica-se que a atividade enzimática foi menor no grupo I em relação ao grupo H e igual ao grupo N. Em outras palavras, o isolado proteico de amaranto foi capaz de manter a atividade máxima da enzima em condições normais mesmo com a adição de grande quantidade de ácidos graxos saturados na dieta, ou seja exerceu influência sobre a capacidade enzimática.

Figura 22. Atividade da enzima Hmgcr em relação a cada um dos grupos analisados.

*indica diferença estatística; colchete indica o par analisado; $p < 0,05$.

$n=8$ para todos os grupos. Grupo N: dieta de acordo com AIN-93. Grupo H: dieta hipercolesterolemizante. Grupo I: dieta hipercolesterolemizante com isolado proteico de amaranto.

O feedback de regulação da biossíntese de colesterol é um processo fisiológico que permite que os seres humanos e outros animais se adaptem às mudanças nos níveis de colesterol dietético e mantenham seus níveis de colesterol sérico e tecidual dentro de limites benéficos ao organismo, sendo esperado em

condições de excesso de colesterol que a HMGCR seja inibida, limitando-se assim a produção de mais colesterol (NESS, 2015). Porém, verifica-se que dieta rica em gordura, em especial saturada, causa ativação da Hmgcr levando ao aumento da síntese *de novo* do colesterol. WU et al. (2013) demonstraram que, apesar de teor de colesterol 16 vezes maior na dieta hiperlipídica versus a dieta controle, a síntese de colesterol hepático manteve-se elevada nos animais do primeiro grupo. Os autores concluíram que a ativação da Hmgcr foi uma resposta metabólica ao maior consumo de ácidos graxos na dieta.

Esse resultado corrobora com a maior concentração de colesterol plasmático e lipoproteínas carreadoras de colesterol no grupo H, uma vez que a maior atividade da Hmgcr acarreta em maior quantidade de colesterol. Esse sistema é resultado, ao menos parcial, da produção de colesterol via Hmgcr no grupo H devido a uma inabilidade do organismo em manter a homeostase do colesterol. O amaranto atua de forma que a síntese endógena do colesterol, bem como o colesterol circulante, mantenha concentrações dessa molécula em valores considerados normais.

Estatinas como a pravastatina são inibidores competitivos que interagem com sítios de ligação da HMGCR por dividirem uma porção de molécula que se assemelha entre si, evitando que o substrato se ligue à enzima por mecanismo estérico. Como visto no item 5.3 deste trabalho e em pesquisa prévia deste grupo de pesquisa (SOARES et al., 2015) há indícios de que os peptídeos encriptados no amaranto agiriam de forma a se ligar a sítios de ligação desta enzima, representando uma classe de inibidores de HGMCR cuja ação se assemelha às estatinas.

O efeito de redução de colesterol e triglicérides da proteína da soja foi associada, tal qual ocorreu para o amaranto, à maior expressão de *Hmgcr*, e também à maior expressão de lanosterol sintase (*Lss*) e farnesil-difosfatase-farnesil-transferase 1 (*Fdft1*) (1,6 a 2.5 vezes maior que o controle com proteína de leite), e menor expressão de esteroil-CoA desaturase-1 (*Scd1*) (37 a 46% menor). Os autores postularam que a fonte proteica afetou de forma diferenciada a microbiota de hamsters sírios dourados machos, e a proteína de soja poderia estar reduzindo a lipogênese por alterações na comunidade microbiana do intestino (BUTTEIGER et al., 2016).

GULLÓN et al. (2016) avaliou a fermentabilidade do amaranto por modelo *in vitro* que usa fezes humanas no meio fermentativo. Os resultados mostraram que o amaranto possui potencial prebiótico, pois promoveu aumento na população de grupos seletos presentes na microbiota intestinal, como *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus/Enterococcus*. Além da redução da concentração de LDL-c, trabalho de FILLERIA et al (2017) verificou a prevenção da oxidação de LDL por peptídeos liberados na digestão gastrointestinal.

Assim, uma redução do risco de ocorrência de evento cardiovascular poderia se dar por meio de várias vias. Os peptídeos do amaranto, além de reduzirem a atividade da enzima HMGCR, poderiam atuar no lúmen intestinal, diminuindo a solubilização micelar do colesterol, promover maior excreção transintestinal de colesterol, reduzir a expressão do gene *LDLR* e da enzima ACAT, ser fermentado no lumen intestinal. Verifica-se ainda diminuição na biossíntese *de novo* de ácidos graxos, relacionada a colesterolemia e a trigliceridemia.

5.4.8 Peptídeos presentes no soro dos hamsters

Para este modelo biológico foi analisado somente o soro dos animais, pois nos ratos foi o modelo que apresentou maior abundância de peptídeos, e pelo fato de hamsters serem animais pequenos, com pouco sangue. Assim como ocorreu para os ratos, dezenas de fragmentos foram identificados no sangue dos animais, a maioria presente nos grupos controle e intervenção.

No quadro 8 estão apresentados os peptideos do grupo intervenção presentes no plasma ou no soro dos animais, respectivamente, e selecionados para análise no BLAST.

Quadro 8. Sequencia de peptídeos no plasma dos ratos do grupo intervenção.

Sequencia peptídica^a	Massa molecular (Da) ^b	BLAST^c hamster sírio dourado	BLAST^d Amaranthaceae
NLW	432,2	sim	sim
LDW	433,1	sim	sim
FFK	221,1	sim	sim
PLLE	471,3	sim	sim
KLAN	445,3	sim	sim
KRVR	558,5	sim	sim
TGGLRQ	632,3	QGGLRQ	TGGLRD

^a Selecionados fragmentos cujas sequencias não eram similares àquelas encontradas nos animais controle, cuja sequencia apresentava no máximo um resíduo de diferença no BLAST do gênero *Amaranthus* em relação à sequencia experimental e cuja sequencia não apresentava 100% de cobertura e identidade somente com hamster.

^b Massa Molecular analisada pelo equipamento.

^c BLAST da espécie *Syrian golden* hamsters, taxid 10036. Foram selecionados fragmentos com cobertura e identidade acima de 70% em relação ao peptídeo identificado. Sim = sequencia com 100% de cobertura e identidade. Não = sequencia com cobertura e identidade abaixo de 70%.

^d BLAST do gênero *Amaranthus*, taxid 3564. Foram selecionados fragmentos com cobertura e identidade acima de 70% em relação ao peptídeo identificado. Sim = sequencia com 100% de cobertura e identidade. Não = sequencia com cobertura e identidade abaixo de 70%.

Para fins de comparação com a base de dados (BLAST) foram selecionados os peptídeos cujas sequências não eram similares (mesmos aminoácidos na cadeia) às encontradas nos animais controle (grupos N e H). Aminoácidos e dipeptídeos foram excluídos da análise.

Assim como ocorre para os peptídeos dos ratos, os peptídeos do soro dos animais não são os mesmos encontrados no hidrolisado proteico *in vitro*, ou mesmo no sangue dos ratos do experimento *in vivo* 1. Porém, diversas sequências foram localizadas como encriptadas em proteínas do amaranto já descritas na literatura.

YOSHIKAWA (2015) estudou diversos peptídeos bioativos derivados de proteínas animais ou vegetais que interagem com receptores para atividades endógenas como opióide, neurotensina, etc. Entre eles a rubiscolina, opioide da planta rubisco, mostrou efeitos na consolidação da memória e na modulação da saciedade. Soymorphin, um peptídeo derivado da conglícinina, mostrou-se anorexígeno, hipoglicêmico e hipotriglicéidêmico.

Sabe-se que a atividade do hidrolisado proteico depende, como visto, de suas propriedades físico-químicas, incluindo hidrofobicidade, mas faltam estudos que associem estrutura e função inferindo sua eficácia em indivíduos hiperlipidêmicos (HOWARD e UDENIGWE, 2013; UDENIGWE e ROUVINEN-WATT, 2015).

Os peptídeos que atuam no lúmen intestinal podem ser sequências diferentes daquelas que atuam em tecidos-alvo como enterócitos e hepatócitos; e essas diferentes moléculas com interações físico-químicas diversas resultam em um benefício extremamente importante ao ser vivo que consome isolado proteico de amaranto.

6 Considerações finais e limitações do estudo

Cada vez mais alimentos contendo amaranto vêm sendo formulados e comercializados no mercado nacional, parcialmente graças aos estudos com amaranto, que promovem disseminação do conhecimento sobre esse grão para os profissionais da saúde e para a população em geral. Seu consumo tem ocorrido nas formas estourada ou farinha termicamente processada, as quais são comercializadas como parte integrante de produtos de panificação de diversas empresas do setor alimentício. Assim deve-se verificar se todas as formas termicamente processadas do amaranto agem para redução do colesterol.

Sugere-se novo estudo com o peptídeo sintético ALGV a fim de se verificar sua ação *in vitro* e *in vivo* perante o metabolismo do colesterol, bem como investigação sobre os tecidos alvo deste peptídeo. Os seis peptídeos encontrados no sangue de hamsters e que apresentaram 100% de cobertura e similaridade a base de dados de proteínas de amaranto também merecem investigação sobre seus efeitos.

Deve ser investigada ainda a expressão dos receptores de LDL tanto no fígado quanto no intestino dos hamsters, uma vez que o mecanismo de aumento da colesterolemia via ácidos graxos saturados está relacionado a esse sistema. Infelizmente o assay adquirido para essa análise não gerou resultados com alto índice de confiança para esse modelo animal.

Além disso, trabalhos futuros devem verificar o efeito da dieta com amaranto nos genes relacionados à esterificação de colesterol no fígado (*Acat*) e captação e/ou liberação de colesterol no intestino, como *Abcg5/g8*, *Npc1l1* e *Ldlr*. Uma vez que houve maior excreção de colesterol nas fezes, mas o mesmo não ocorreu para

os ácidos biliares, sugere-se que o efeito da proteína de amaranto pode se dar via excreção transintestinal de colesterol, diminuição da solubilização micelar do colesterol e/ou alteração na expressão dos genes relacionados acima. Todos esses mecanismos devem ser investigados.

Os animais que receberam a ração contendo amaranto ao longo do período do experimento foram progressivamente reduzindo o consumo diário de ração, esta mesma constatação foi feita por MENDONÇA (2006). A dieta dos animais deste estudo foi pareada em relação aos animais que consumiam menor quantidade de ração, desta forma não houve diferença estatística no consumo entre grupos. Futuramente sugere-se a investigação de possíveis peptídeos do amaranto relacionados à regulação do comportamento alimentar, como peptídeos anoréticos.

Complementarmente, estudos em humanos e avaliação da fermentabilidade do amaranto na microbiota intestinal devem ser incentivados de forma a confirmar os achados em sistemas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para que produtos contendo peptídeos hipocolesterolemizante sejam desenvolvidos visando a promoção da saúde cardiovascular da população.

7 Conclusões

Foram identificados fragmentos peptídicos provenientes da digestão *in vitro* do isolado proteico de amaranto. As 11 sequências majoritárias não apresentaram 100% de similaridade e cobertura em relação ao banco de dados analisado, provavelmente pelo fato de haver uma lacuna de informações sobre proteínas do gênero *Amaranthus*.

Dezenas de sequências peptídicas em ratos após administração aguda de amaranto foram analisadas. Um maior número de peptídeos foi encontrado no sangue em relação ao plasma dos animais. Os fragmentos peptídicos encontrados no sangue dos ratos em maior abundância não coincidiram com os fragmentos do teste *in vitro*. Destaca-se, entretanto, a identificação do peptídeo ALGV, presente em proteína do amaranto de acordo com banco de dados, e similar a fragmentos com ação hipocolesterolemizante. No sangue de hamsters foram encontrados seis peptídeos com 100% de cobertura e similaridade a base de dados de proteínas de amaranto.

Verificou-se que o isolado proteico de amaranto foi capaz de suprimir a hipercolesterolemia quando a dieta hipercolesterolemizante foi introduzida em paralelo a este ingrediente. Parâmetros lipídicos do sangue, das fezes e do fígado apontam para uma redução do risco cardiovascular significativa em relação ao grupo hipercolesterolemizado, e similaridade com o grupo normal. Foi observada maior excreção de colesterol nas fezes, menor quantidade de colesterol e lipídios totais no fígado e menor concentração de colesterol total, triglicérides e LDL no sangue dos hamsters ao final do ensaio, porém não houve maior excreção de ácidos biliares. Não houve mudança na expressão dos genes analisados, mas o amaranto reduziu a atividade da enzima Hmgcr.

O perfil de ácidos graxos também foi modificado de forma a se aproximar do grupo normosaturado, porém deve-se verificar parâmetros inflamatórios relacionados a ingestão de amaranto devido ao aumento de ácido araquidônico em relação aos demais grupos estudados. Em suma, verifica-se biodisponibilidade dos peptídeos do amaranto e ação hipocolesterolemizante e hipolipemiante por diversas vias metabólicas.

8 Referências bibliográficas

ABIA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação de alimentos**. São Paulo. 1991. v. 2/A, p. 7-33.

AKOSAH, K. O.; GOWER, E.; GROON, L.; ROONEY, B. L.; SCHAPER, A. Mild hypercholesterolemia and premature heart disease: do the national criteria underestimate disease risk? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 35, p. 1178-84, 2000.

AMEMIAYA-KUDO, M.; SHIMANO, H.; HASTY, A.H.; YAHAGI, N.; YOSHIKAWA, T.; MATSUZAKA, T. Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c and -2 different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. **Journal of Lipid Research**, v. 43, p. 1220-1235, 2002.

ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M.; COOK-NEWELL, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. **New England Journal of Medicine**, v. 333, p. 276–82, 1995.

ANGELES-BOZA, A. M.; ERAZO-OLIVERAS, A.; LEE, Y. J.; PELLOIS, J. P. Generation of endosomolytic reagents by branching of cell-penetrating peptides: Tools for the delivery of bioactive compounds to live cells in cis or trans. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, p. 2164–2167, 2010.

ANTUNES, F.; ANDRADE, F.; FERREIRA, D.; NIELSEN, H. M.; SARMENTO, B. Models to Predict Intestinal Absorption of Therapeutic Peptides and Proteins. **Current Drug Metabolism**, v. 14, p. 4-20, 2013.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos IX**: Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em 11 jan. 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>>. Acesso em: 17 ago. 2007.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC International**. 18th ed. Gaithersburg, Md.: AOAC, 2010.

ARDEJANI, M. S.; ORNER, B. P. Obey the Peptide Assembly Rules. **Science**, v. 340, n. 6132, p. 561–562, 2013.

AREAS, J. A. G.; CARLOS-MENEZES, A. C. C. C.; SOARES, R. A. M. Amaranth. In CABALLERO, B; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. **Encyclopedia of Food and Health**, Academic Press, Oxford, 2016.

ARHEWOH, I. M.; AHONKHAI, E. I.; OKHAMAFE, A. O. Optimising oral systems for the delivery of therapeutic proteins and peptides. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 13, p. 1591–1597, 2005.

ARNOLDI, A.; D'AGOSTINA, A.; BOSCHIN, G.; LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; SIRTORI, C. R. Soy protein components active in the regulation of cholesterol homeostasis: Biologically active phytochemicals in food. **Royal Society of Chemistry - Special Publications**, v. 269, p. 103–106, 2001.

ASSIS-VAZ, L. C. M. A. **Efeito da ingestão de proteína de amaranto no metabolismo do colesterol em ratos**. São Paulo, 2010. Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo.

AYMARD, P.; NICOLAI, T.; DURAND, D.; CLARK, A. Static and dynamic scattering of b-lactoglobulin aggregates formed after heat-induced denaturation at pH 2. **Macromolecules**, v. 32, n. 8, p. 2542-2552, 1999.

AZADBAKHT, L.; SHAKERHOSSEINI, R.; ATABAK, S.; JAMSHIDIAN, M.; MEHRABI, Y.; ESMAILL-ZADEH, A. Beneficiary effect of dietary soy protein on lowering plasma levels of lipid and improving kidney function in type II diabetes with nephropathy. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 1292–1294, 2003.

BARBÉ, F.; MÉNARD, O.; LE GOUAR, Y.; BUFFIÈRE, C.; FAMELART, M. H.; LAROCHE, B.; LE FEUNTEUN, S.; DUPONT, D.; RÉMOND, D. The heat treatment and the gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids, **Food Chemistry**, v. 136, p. 1203–1212, 2013.

BASSO, R. Bioquímica do metabolismo dos lípides. In: SILVA, S. M. C. S. D.; MURA, J. D. P. **Tratado de Alimentação, Nutrição & Dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2007.

BAUM, J. A.; TENG, H.; ERDMAN Jr., J. W.; WEIGEL, R. M.; KLEIN, B. P.; PERSKY, V. W.; FREELS, S.; SURYA, P.; BAKHIT, R. M.; RAMOS, E.; SHAY, N. F.; POTTER F. M. Long-term of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low-density-lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic, postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 545-551, 1998.

BECKER, R.; WHELLER, L. E.; LORENZ, K.; STAFFORD, A. E.; GROSJEAN, O. K.; BETSCHART, A. A.; SAUNDERS, R. M. A compositional study of amaranth grain. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 1175-1180, 1981.

BEJOSANO, F. P.; CORKE, H. Properties of protein concentrates and hydrolysates from *Amaranthus* and Buckwheat. **Industrial Crops Production**, v. 10, p. 175-83, 1999.

BERGANZA, B. E.; MORAN, A. W.; RODRIGUES, M. G.; COTO, N. M.; SANTAMARIA, M.; BRESSANI, R. Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 58, n. 3, p. 1-6, 2003.

BERGER, A.; GREMAND, G.; BAUNIGARTENER, M.; REIN, D.; MONNARD, I.; KRATKY, E.; GEIGER, W.; BURRI, J.; DIONISI, F.; ALLAN, M.; LAMBELET, P. Cholesterol-lowering properties of amaranth grain and oil in hamsters. **International Journal for Vitamins and Nutrition Research**, v. 73, n. 1, p. 39-47, 2003a.

BERGER, A.; MONNARD, I.; DIONISI, F.; GUMY, D.; HAYES, K. C.; LAMBELET P. Cholesterol-lowering properties of amaranth flakes, crude and refined oils in hamsters. **Food Chemistry**, v. 81, p. 119-24, 2003b.

BERNSTEIN, A. M.; SUN, Q.; HU, F. B.; STAMPFER, M. J.; MANSON, J. E.; WILLETT, W. C. Major dietary protein sources and risk of coronary heart disease in women. **Circulation**, v. 122, n. 9, p. 876–883, 2010.

BETTERIDGE, D. J. Diabetes, lipoprotein metabolism and atherosclerosis. **Brazilian Medical Bulletin**, v. 45, p. 285-311, 1989.

BIDLACK, W. R.; OMAJE, S. T.; MESKIN, M. S. **Phytochemical Bioactive Agents**. Lancaster (UK): Technomic, 2000.

BLANCHARD C, MOREAU F, CARIOU B, LE MAY C. Trans-intestinal cholesterol excretion (TICE): a new route for cholesterol excretion. **Medical Science**, v. 10, p. 896-901, 2014.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J.; **Canadian Journal of Biochemical and Physiology**, v. 37, p. 911, 1959.

BONAA, K. H.; BJERVE, K. S.; STRAUME, B.; GRAM, I. T.; THELLE, D. Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on blood pressure in hypertension. A population-based intervention trial from the Tromso Study. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 12, p. 795-801, 1990.

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.

BOURDAKIS, D. KAGIAFA, S. PAPADATOS. A low fat, low-caloric diet enhances the hypolipidemic effect of hypolipidemic mentication in overweight patients. **Atherosclerosis**, v. 241, 2015.

BOUZERZOUR, K.; MORGAN, F.; CUINET, I.; BONHOMME, C.; JARDIN, J.; LE HUËROU-LURON, I.; DUPONT, D. In vivo digestion of infant formula in piglets: protein digestion kinetics and release of bioactive peptides. **British Journal of Nutrition**, n. 12, p. 2105-2114, 2012.

BRACHET, P.; GAERTNER, H.; TOME, D.; DUMONTIER, A. M.; GUIDONI, A.; PUIGSERVER, A. Transport of N-alfa(or N-gama)-L-methionyl-L-lysine and acetylated derivatives across the rabbit intestinal epithelium. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 2, p. 387-94, 1991.

BRAFORD, G. P.; AWAD, B. A. Phytosterols as anticancer compounds. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 2, p. 161-170, 2007.

BRESSANI, R. Composition and Nutritional Properties of Amaranth. In: Paredes-López, O. In: **Amaranth: biology, chemistry and technology**. PAREDES-LOPEZ, O. Boca Raton (USA): CRC Press, 1994.

BRODIN, B.; NIELSEN, C.; STEFFANSEN, B.; FROKJAER, S. Transport of peptidomimetic drugs by the intestinal di/tri-peptide transporter, PepT1. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 90, p. 285–296, 2002.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated path-way for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, p. 34–47, 1986.

BRUFAU, G.; GROEN, A. K.; KUIPERS, F. Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 31, p. 1726–1733, 2011.

BURA, K. S.; LORD, C.; MARSHALL, S.; MCDANIEL, A.; THOMAS, G.; WARRIER, M.; ZHANG, J.; DAVIS, M. A.; SAWYER, J. K.; SHAH, R.; WILSON, M. D.; DIKKERS, A.; TIETGE, U. J.; COLLET, X.; RUDEL, L. L.; TEMEL, R. E.; BROWN, J. M. Intestinal SR-BI does not impact cholesterol absorption or transintestinal cholesterol efflux in mice. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 6, p. 1567-77, 2013.

BUTTEIGER, D. N.; HIBBERD, A. A.; MCGRAW, N. J.; NAPAAN, N.; HALL-PORTER, J. M.; KRUL, E. S. Soy Protein Compared with Milk Protein in a Western Diet Increases Gut Microbial Diversity and Reduces Serum Lipids in Golden Syrian Hamsters. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 4, p. 697-705, 2016.

CALDER, P. C.; GRIMBLE, R. F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56 (Suppl. 1), p.14–9, 2002.

CALKIN, A.C.; TONTONNOZ, P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 213-24. 2012.

CANO-CEBRIAN, M. J.; ZORNOZA, T.; GRANERO, L.; POLACHE, A. Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: a target for drug delivery. **Current Drug Delivery**, v. 2, p. 9–22, 2005.

CARROLL, K. K.; KUROWSKA, E. M. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. **Journal of Nutrition**, v. 125 n. 3, p. 594S-7S, 1995.

CARSTEA, E. D.; MORRIS, J. A.; COLEMAN, K. G.; et al. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. **Science**, v. 277, n. 5323, p. 228-231, 1997.

CASTELLI, W. P. Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease—the Framingham Heart Study. **Canadian Journal of Cardiology** v. 4(Suppl A), p. 5A–10A, 1988.

CHABANCE, B.; MARTEAU, P.; RAMBAUD, J. C.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; BOYNARD, M.; PERROTIN, P.; GUILLET, R.; JOLLES, P.; FIAT, A. M. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. **Biochimie**, v. 80, n. 2, p. 155–165, 1998.

CHAN, K. M.; SUN, M. genetic diversity and relationships detected by isozyme and rapid analysis of crop and wild species of amaranthus. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, 1997.

CHATURVEDI, A.; SAROJINI, G.; DEVI, N. L. Hypocholesterolemic effect of amaranth seeds (*Amaranthus esculantus*). **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 44, n. 1, p. 63-70, 1993.

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.

CHRISTIE, W. **AOCS Lipid Library**. Disponível em < http://aocs.files.cms-plus.com/CSS/AM16/AM16_Template_Bulk/lipidimportpdf/lipidlibrary/Lipids/cholest/file.pdf>. Acesso em maio 2017.

CONDE, J. M.; ESCOBAR, M. M. Y.; JIMÉNEZ, J. J. P.; RODRÍGUEZ, F. M.; PATINO, J. M. R. Effect of enzymatic treatment of extracted sunflower proteins on solubility, amino acid composition, and surface activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8038-45, 2005.

COOKE, R. J. The characterization and identification of cultivars by electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 5, p. 59-72, 1984.

CORKE, H.; CAI, Y. Z.; WU, H. X. Amaranth: overview In: Wrigley C, CORKE H, SEETHARAMAN K, FAUBION J, editors. **Encyclopedia of Food Grains**. Oxford: Academic Press. p 287–96, 2016.

COSTA, E. L.; GONTIJO, J. A. R.; NETTO, F. M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 632-640, 2007.

CURI R, POMPÉIA C, MIYASAK CK. **Entendendo a Gordura** os Ácidos Graxos. Manole, 598 p, 2002.

DAMASCENO, N. R. T.; ABDALLA, D. S. P.; GOTO, H.; GIDLUNG, M.; OKAWABATA, F. S.; DIAS, C. T. S. Casein and soy protein isolate in experimental atherosclerosis: Influence on hyperlipidemia and lipoprotein oxidation. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 45, p. 38-46, 2001.

DAMASCENO, N. R. T.; GOTO, H.; RODRIGUES, F. M. D.; DIAS, C. T. S.; OKAWABATA, F. S.; ABDALLA, D. S. P.; GIDLUND, M. Soy protein isolate reduces the oxidizability of LDL and the generation of oxidized LDL autoantibodies in rabbits with diet-induced atherosclerosis. **Journal of Nutrition**, v.130, n. 11, p. 2641-7, 2000.

DANIELS, T. F.; KILLINGER, K. M.; MICHAL, J. J.; WRIGHT, R. W.; JIANG, Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis, and cardiac health. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 474-488, 2009.

DANZ, R. A.; LUPTON, J. R. Physiological effects of dietary amaranth (*Amaranthus cruentus*) on rats. **Cereal Foods World**, v. 37, n. 7, p. 489-94, 1992.

DAUMERIE, C. M.; WOOLLETT, L. A.; DIETSCHY, J. M. Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 89 p. 10797-10801, 1992.

DAVIGNON, J.; MONTIGNY, M.; DUFOUR, R. HMG-CoA reductase inhibitors: a look back and a look ahead. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 8, p. 843-64, 1992.

DE LUMEN, B. O. Lunasin: A cancer-preventive soy peptide. **Nutrition Reviews**, v. 63, n. 1, p. 16- 21, 2005.

DE MEJIA, E.; DE LUMEN, B. O. Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases. **Sexuality, Reproduction and Menopause**, v. 4, n. 2 p. 91-5, 2006.

DELIE, F. Evaluation of nano- and microparticle uptake by the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 221-233, 1998.

DEROSSI, D.; JOLIOT, A. H.; CHASSAING, G.; PROCHIANTZ, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 10444–10450, 1994.

DORFMAN, S. E.; WANG, S.; VEGA-LÓPEZ, S.; JAUHIAINEM, M.; LICHTENSTEIN, A. H. Dietary fatty acids and cholesterol differentially modulate HDL cholesterol metabolism in Golden Syrian hamsters. **The Journal of Nutrition**, v.135, n.3, p. 492-8, 2005.

DUODU, K. G.; TAYLOR, J. R. N.; BELTON, P. S.; HAMAKER, B. R. Factors affecting sorghum protein digestibility. **Journal of Cereal Science**, v. 38, p. 117–131, 2003.

DZISIAK, D. New oils reduce saturated and trans fats in processed foods. **Cereal Foods World**, v.49, n.6,p.331-333, 2004.

DZIUBA, J.; IWANIAK, A.; MINKIEWICZ, P. Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides. **Polimery**, v. 48, n. 1, p. 50–3, 2003.

EARLY, D.; EARLY, J. C. Transferencia de tecnología indígena para la preparación de la kiwicha (*Amaranthus*). Primera parte: El amaranto y su potencial. **Boletín**, v. 4, p. 8-12, 1987.

ECKEL, R. H.; KRAUSS, R. M. American Heart Association call to action: Obesity as a major risk factor for coronary artery disease. For the AHA Nutrition Committee. **Circulation**, v. 97, p. 2099–100, 1998.

EDWARDS, P. A.; KENNEDY, M. A.; MAK, P. A. LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. **Vascular Pharmacology**, v. 38, n. 4, p. 249–56, 2002.

ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **Journal of Lipid Research**, v. 33, p. 1569-82, 1992.

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.

EUNJOO, H. K. Linoleic acid hydroperoxide induced peroxidation of endothelial cell phospholipids and cytotoxicity. **Free Radical Biological Medicine**, v.17, n.4, p.285-295, 1994.

EYRES, L.; EYRES, M. F.; CHISHOLM, A.; BROWN, R. C. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. **Nutrition Reviews**, v. 74(4), p. 267-80, 2016.

EZZAT, K.; EL ANDALOUSSI, S.; ZAGHLOUL, E. M.; LEHTO, T.; LINDBERG, S.; MORENO, P. M. D.; VIOLA, J. R.; MAGDY, T.; ABDO, R.; GUTERSTAM, P.; et al. PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 5284–5298, 2011.

FANNING, A. S.; JAMESON, B. J.; JESAITIS, L. A. The tight junction protein zo-1 establishes a link between the transmembrane protein occluding and the actin cytoskeleton. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 45, p. 29745–29753, 1998.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health claims; Soy protein and coronary heart disease**. Washington (USA): Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1999. Disponível em: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/fr991026.html>>. Acesso em: 22 set. 2015.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Protein and amino acid requirements in human nutrition**. Report of a joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. WHO Technical Report Series, No. 935. Geneva, 2007.

FAOSTAT. 2014. **Data on production quantity of crops all over the world in 2014**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/E>. Acessado em abril de 2016.

FARRERA-SINFREU, J.; GIRALT, E.; CASTEL, S.; ALBERICIO, F.; ROYO, M. Cell-penetrating cis- γ -amino-l-proline-derived peptides. **Journal of the American Chemical Society**, v.127, p. 9459–9468, 2005.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, p. 751–760, 2009.

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

FERREIRA, T. A.; ARÊAS, J. A. G. Calcium bioavailability of raw and extruded amaranth grains. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 532-538, 2010.

FIELDING, P. E.; FIELDING, C. J. Dynamics of lipoprotein transport in the human circulatory system. In: Vance D. E.; Vance, J. E. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**, 5 ed., Amsterdam: Elsevier Science, 2008.

FILLERÍA, S. F. G.; TIRONI, V. A. Prevention of in vitro oxidation of low density lipoproteins (LDL) by amaranth peptides released by gastrointestinal digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 197–206, 2017.

FRANKEL, A.; PABO, C. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. **Cell**, p. 1189–1193, 1988.

FREITAS, O.; DOS SANTOS, J.; GREENE, L.; DUTRA DE OLIVEIRA, J. Bases bioquímicas do suporte nutricional enteral. **Archivos Latinoamericanos de nutrición**, v. 45, n. 2, p. 84-9, 1995.

FROTA, K. M. G. **Efeito do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) e da proteína isolada no metabolismo lipídico em hamsters hipercolesterolemizados**. 2007. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana Aplicada) - FCF/FEA/FSP, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GAMEL, T. L.; LINSSEN, J. P.; ALINK, G. M.; MOSALLEM, A. S.; SHEKIB, L. A. Nutritional study of raw and popped seed proteins of *Amaranthus caudatus* L. and *Amaranthus cruentus* L. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 84, n. 10, p. 1153-58, 2004.

GANAPATHY, V.; LEIBACH, F.H. Protein digestion and assimilation. In Yamada, T. **Textbook of Gastroenterology**. Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia, 1999.

GARCÍA, M. N.; FLOWERS, C.; COOK, J. D. The Caco-2 cell culture system can be used as a model to study food iron availability. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 251–258, 1996.

GILBERT, E. R.; WONG, E. A.; WEBB, K. E. J. Board-invited review: peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 9, p. 2135-55. 2008.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. History of Discovery: The LDL Receptor. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 4, p. 431–438, 2009.

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.

GORINSTEIN, S.; DELGADO-LICON, E.; PAWELZIK, E.; PERMADY, H. H.; WEISZ, M.; TRAKHTENBERG, S. Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, amino acid analysis, circular dichroism, and differential scanning calorimetry measurements. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 5595-5601, 2001.

GORINSTEIN, S.; PAWELZIK, E.; DELGADO-LICON, E.; HARUENKIT, R.; WEISZ, M.; TRAKHTENBERG, S. Characterization of pseudocereal and cereal protein by protein and amino acid analyses. **Journal of Food Science and Agriculture**, v. 82, p. 886-891, 2002.

GRAJETA, H. Effects of amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds on lipid metabolism in rats. **Bromatologia i Chemia Toksykologiczna**, v. 30, p. 25, 1997.

GRIMBLE, G. K. The significance of peptides in clinical nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v. 14, p. 419–447, 1994.

GULLÓN, B.; GULLÓN, P.; TAVARIA, F.K.; YÁÑEZ, R. Assessment of the prebiotic effect of quinoa and amaranth in the human intestinal ecosystem. **Food & Function**, 7 (9), pp. 3782–3788, 2016.

GUO, X.; YAO, H.; CHEN, Z. Effect of heat, rutin and disulfide bond reduction on in vitro pepsin digestibility of Chinese tartary buckwheat protein fractions. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 118-22, 2007.

HALLIKAINEN, M.; HALONEN, J.; KONTTINEN, J.; LINDHOLM, H.; SIMONEN, P.; NISSINEN, M. J.; GYLLING, H. Diet and cardiovascular health in asymptomatic normo- and mildly-to-moderately hypercholesterolemic participants - baseline data from the BLOOD FLOW intervention study. **Nutrition Metabolism** (Lond)., v. 10, n. 1, p. 62. 2013.

HARTMAN, L., LAGO, R. A. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, 1973, vol. 22(8), p. 475-497.

HARTMAN, 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.

HE, K.; MERCHANT, A.; RIMM, E. B. Dietary fat intake and risk of stroke in male US healthcare professionals: 14 year prospective cohort study. **British Medical Journal**, v. 327, n. 7418, p. 777–781, 2003.

HERRERA E. **Formación de grasas**: biosíntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos. In: Herrera E, editor. Bioquímica: Aspectos estructurales y vías metabólicas. Madrid: Interamericana; 1991. p.591-614.

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.

Howles, P. N. Cholesterol absorption and metabolism. **Methods in Molecular Biology**, v. 602, p. 157-79, 2010.

HOYLE, N.T. AND J.H. MERRIT. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, 59: 76-79, 1994.

HSU, H. W.; VAVAK, D. L.; SATTERLEE, L. D.; MILLER, G. A. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. **Journal of Food Science**, v. 42, p. 1269-73, 1977.

HSU, S.; TON, V. K.; DOMINIQUE ASHEN, M.; MARTIN, S. S.; GLUCKMAN, T. J.; KOHLI, P.; SISSON, S. D.; BLUMENTHAL, R. S.; BLAHA, M. J. A clinician's guide to the ABCs of cardiovascular disease prevention: the Johns Hopkins Ciccarone Center for the Prevention of Heart Disease and American College of Cardiology Cardiosource Approach to the Million Hearts Initiative. **Clinical Cardiology**, v. 36, n. 7, p. 383-393. 2013.

HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, J. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1–12. 2011.

IKEDA, K.; OKU, M.; KUSANO, T.; YASUMOTO, K. Inhibitory potency of plant antinutrients towards the in vitro digestibility of buckwheat protein. **Journal of Food Science**, v. 51, p. 1527–1530, 1986.

IKEDA, S.; MORRIS, V.J. Fine-stranded and particle aggregates of heat-denatured whey proteins visualized by atomic force microscopy. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 2, p. 382-389, 2002.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2nd ed. (the "Gold Book"). McNaught, A. D.; Wilkinson, A. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.

JAUHIAINENA, T.; WUOLLEA, K.; VAPAATALOB, H.; KEROJOKIA, O.; NURMELAA, K.; LOWRIEC, C.; KORPELAA, R. Oral absorption, tissue distribution and excretion of a radiolabelled analog of a milk-derived antihypertensive peptide, Ile-Pro-Pro, in rats. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 10, p. 1216–1223, 2007.

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.

KAVANAGH, G. M.; CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. Heat-induced gelation of globular proteins: Part 3. Molecular studies on low pH b-lactoglobulin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, n. 1, p. 41-50, 2000.

KIM, S. E.; KIM, H. H.; KIM, J. Y.; KANG, Y. I.; WOO, H. J.; LEE, H. J. Anticancer activity of hydrophobic peptides from soy proteins. **BioFactors**, v. 12, n. 1–4, p. 151–5, 2000.

KIM, S.; KINSELLA, J. Effects of reduction with dithiothreitol on some molecular properties of soy glycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 623-7, 1986.

KIM, T. Y.; BRUN, Y. V.; REILLY, J. P. Effects of tryptic peptide esterification in MALDI mass spectrometry. **Analitical Chemistry**, v. 77, n. 13, p. 4185-93, 2005.

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.

KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1309-1323, 2003.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1297–1308, 2003.

KOYAMA, M.; NARAMOTO, K.; NAKAJIMA, T.; AOYAMA, T.; WATANABE, M.; NAKAMURA, K. Purification and identification of antihypertensive peptides from fermented buckwheat sprouts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 61, n. 12, p. 3013-3021, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227: p. 680-5, 1970.

LE MAY, C.; BERGER, J. M.; LESPINE, A.; PILLOT, B.; PRIEUR, X.; LETESSIER, E.; HUSSAIN, M. M.; COLLET, X.; CARIOU, B.; COSTET, P. Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by pcsk9 and statin involving abcb1. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 33, p. 1484–1493, 2013.

LEE, H. J. Protein drug oral delivery: the recent progress. **Archives in Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 5, p. 572–584, 2002.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier; 2006.

LEHR, C. M. Bioadhesion technologies for the delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 11, p. 119–160, 1994.

LI, C.; MATSUI, T.; MATSUMOTO, K.; YAMASAKI, R.; KAWASAKI, T. Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein. **Journal of Peptide Science**, v. 8, n. 6, p. 267–274, 2002.

LOCK, A. L.; HORNE, C. A. M.; BAUMAN, D. E.; SALTER, A. M. Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile cholesterol-fed hamsters. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 8, p. 1934-9, 2005.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal: Funep, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, A. Y. H.; LIN, J. H. Applications and limitations of interspecies scaling and in vitro extrapolation in pharmacokinetics. **Drug Metabolism and Disposal**, 26(12), 1202-1212, 1998.

MAENO, M.; YAMAMOTO, N.; TAKANO, T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1316–1321, 1996.

MAGALHÃES, M. E. C.; BRANDÃO, A. A.; FREITAS, E. V.; POZZAN, R.; BRANDÃO, A. P. Novas perspectivas no tratamento de dislipidemias. **Revista SOCERJ**, p. 105-111, 2004.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 9. ed. São Paulo: Roca, 1998.

MANSUR, A. P.; FAVARATO, D. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 99, n. 2, p. 755-761, 2012.

MANSUR, A. P.; FAVARATO, D.; SOUZA, M. F. M.; AVAKIAN, S. D.; ALDRIGHI J. M.; CÉSAR, L. A. M.; RAMIRES, J. A. F. Tendência do risco de morte por doenças

circulatórias no Brasil de 1979 a 1996. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 76, n. 6, p. 497-503, 2001.

MARCONE, M. F.; NIEKAMP, F. K.; LEMAGUER, M.; YADA, R. Y. Purification and characterization of the physicochemical properties of the albumin fraction from the seeds of *Amaranthus hypochondriacus*. **Food Chemistry**, v. 51, p. 287-294, 1994.

MARCONE, M. F.; YADA, R. Y. Isolation, purification and characterization of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 2281-9, 1991.

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

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

MARTÍNEZ, E. N.; CASTELLANI, O. F.; AÑÓN, M. C. Common molecular features among amaranth storage proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3832-9, 1997.

MASUDA, O.; NAKAMURA, Y.; TAKANO, T. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 3063–3068, 1996.

MATHUR, K. S.; PATNEY, N. L.; KUMAR, V.; SHARMA, R. D. Serum cholesterol and atherosclerosis in man. **Circulation**, v. 23, p. 847–52, 1961.

MATSUI, T.; MATSUFUJI, H.; SEKI, E.; OSAJIMA, K.; NAKASHIMA, M.; OSAJIMA, Y. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus-licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, n. 6, p. 922-925, 1993.

MAZEIN, A.; WATTERSON, S.; HSIEH, W. Y.; GRIFFITHS, W. J.; GHAZAL, P. A comprehensive machine-readable view of the mammalian cholesterol biosynthesis pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 1 p. 56-66, 2013.

McGILL Jr, H. C.; McMAHAN, C.A.; ZIESKE, A. W.; HERDERICK, E. E.; MALCOM, G. T.; TRACY, R. E.; et al. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 1307S-1315S, 2000.

MEDDINGS, J. B.; DIETSCHY, J. M. Regulation of plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol: interpretation of data on low-density lipoprotein turnover in man. **Circulation**, v. 74, n. 4, p. 805–814, 1986.

MEGIAS, C.; DEL MAR, Y. M.; PEDROCHE, J.; LQUARI, H.; GIRON-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLAN, F.; VIOQUE, J. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1928–32, 2004.

MENDONÇA, S. **Efeito hipocolesterolemizante da proteína do amaranto (*Amaranthus cruentus* BRS-Alegria) em hamsters**. 2006. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MENDONÇA, S., SALDIVA, P. H., CRUZ, R. J., ARÊAS, J. A. G. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 738-742, 2009.

MENEZES, A. C. C. C. **Efeito do hidrolisado proteico do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS Alegria) processado na solubilização micelar do colesterol e na ação da HMGR**. 2015. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food and Function**, v. 5, p. 1113-24, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção a Saúde. **Dislipidemias em pacientes de alto risco de desenvolver eventos cardiovasculares**. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas. Consulta Pública SAS/MS nº 13, de 12 de novembro de 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. **Saúde Brasil 2006: Uma análise da situação de saúde no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 620 p.

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.

MOTA, C.; SANTOS, M.; MAURO, R.; SAMMAN, N.; MATOS, A. S.; TORRES, D.; CASTANHEIRA, I. Protein content and amino acids profile of pseudocereals. **Food Chem** v. 193, p.55–61, 2016.

MUJICA-SÁNCHEZ, A.; BERTI-DÍAZ, M.; IZQUIERDO, J. **El cultivo del amaranto (amaranthus spp.)**: produccion, mejoramiento genético y utilización. FAO oficina regional de la FAO para America Latina y el Caribe: Santiago, Chile, 1997.

MULLALLY, M. M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Synthetic peptides corresponding to alfa-lactalbumin and beta-lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. **Biological Chemistry Hoppe-Seyle**, v. 377, n. 4, p. 259-260, 1996.

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.

NAGAOKA, S.; FUTAMURA, Y.; MIUA, K.; AWANO, T.; YAMAUCHI, K.; KANAMARU, Y.; TADASHI, K.; KUWATA, T. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk b-lactoglobulina. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 281, n. 1, p. 11-17, 2001.

NAGATA, C.; TAKATSUKA, N.; KAWAKAMI, N.; SHIMIZU, H. A prospective cohort study of soy product intake and stomach cancer death. **Brazilian Journal of Cancer**, v. 87, n. 1, p. 31–36, 2002.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Amaranth**: modern prospects for an ancient crop. BOSTID Reports. National Academy of Sciences. Washington: National Academy Press, 1984.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient Requirements of Laboratory Animal**. 4th Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. 192p, 1995.

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

NCEP. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Educational Program Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. **Journal of the American Medical Association**, v. 285, p. 2486-2497, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NISTOR, A.; BULLA, A.; FILIP, D. A.; RADU, A.; The hyperlipidemic hamsters as a model of experimental atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 68, n.1-2, p. 159-63, 1987.

NOACH, A.; HURNI, M.A.; DE BOER, A.G.; BREIMER, D.D. The Paracellular Approach: Drug Transport and its Enhancement via the Paracellular Pathways. In: De Boer, A.G.. **Drug Absorption Enhancement**. Chur: Harwood Academic Publishers, 1994.

OLFERT, E.; CROSS, B.M.; MCWILLIAN, A.A. **Guide to care and use for experimental animal**. 2 ed., v.1, Canadian Council, 1993.

OLIVEIRA, G. M. M.; KLEIN, C. H.; SOUZA E SILVA, N. A. Mortalidade por doenças cardiovasculares em três estados do Brasil de 1980 a 2002. **Revista Panamericana de Salud Pública** / Pan American Journal of Public Health, v. 19, n. 2, p. 85-93, 2006.

OPAS. **Doenças cardiovasculares**. Revisado em setembro de 2016. <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=839?>. Ministério da Saúde. Acesso em 05 abr 2017.

PAK, V. V.; KOO, M. S.; LEE, N.; KIM, M. S.; KWON, D. Y. Structures-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. 454-60, 2005a.

PAK, V. V.; KU, M.; LI, N.; KIM, M. S.; KASYMOVA, T. D.; KWON, D. Y. Structures of Peptides Leu-Pro-Tyr-Pro and its derivates and the nicotinamide part of NADPH by a semi-empirical PM3 method. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n. 1, p. 69, 2005b.

PAK, V. V.; KOO, M.; KWON, D. Y.; YUN, L. Design of a highly potent inhibitory peptide acting as a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase. **Amino Acids**, v. 43, n. 5, p. 2015-2025, 2012.

PAPPENHEIMER, J. R.; DAHL, C. E.; KANOVSKY, M. L.; MAGGIO, J. E. Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D-amino acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 1942–1945, 1994.

PAPPENHEIMER, J. R.; MICHEL, C. C. Role of villus microcirculation in intestinal absorption of glucose: coupling of epithelial with endothelial transport. **Journal of Physiology**, v. 553, p. 561–574, 2003.

PARADA, J.; AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. R21-R32, 2007.

PAREDES-LÓPEZ, O.; GUZMÁN-MALDONADO, S. H.; ORDORICA-FALOMIR, C. Food proteins from emerging seed sources. In: **New and Developing Sources of Food Proteins**; HUDSON, B. J. Chapman and Hall: London (UK), 1994. p. 241-279.

PENA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2952–2956, 2002.

PICARIELLO, G.; MAMONEA, G.; NITRIDE, C.; ADDEOB, F.; FERRANTIA, P. Protein digestomics: Integrated platforms to study food-protein digestion and derived functional and active peptides. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 120–134, 2013.

PIEGAS, L. S.; AVEZUM, A.; PEREIRA, J. C.; NETO, J. M. R.; HOEPFNER, C.; FARRAN, J. A.; RAMOS, R. F.; TIMERMAN, A.; ESTEVES, J. P.; AFIRMAR Study Investigators. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. **American Heart Journal**, v. 146, p. 331-338, 2003.

PIMENTA, D. C.; LEBRUN, I. Cryptides: Buried secrets in proteins. **Peptides**, v. 28, p. 2403–2410, 2007.

PLATE, A. Y. A.; ARÊAS, 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.

POTTER, S. M. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 3, p. 606S, 1995.

QI, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; KALAPATHY, U. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 1110-5, 1997.

QIAN, Z.; LIU, T.; LIU, Y. Y.; BRIESEWITZ, R.; BARRIOS, A. M.; JHIANG, S. M.; PEI, D. Efficient delivery of cyclic peptides into mammalian cells with short sequence motifs. **ACS Chemical Biology**, v. 8, p. 423–431, 2013.

QIAO, Y.; LIN, X.; ODLE, Z.; WHITTAKER, A.; van KEMPEN, T. A. T. G. Refining in vitro digestibility assays: Fractionation of digestible and indigestible peptides. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 1669–1677, 2004.

QUEIROZ, Y. D., SOARES, R. A. M., CAPRILES, V. D., TORRES, E. A. F. S., & ARÊAS, J. A. G. Effect of processing on the antioxidant activity of amaranth grain. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 59, n. 4, p. 419-424, 2009.

RADHAKRISHNAN, A.; GOLDSTEIN, J. L.; MCDONALD, J. G.; BROWN, M. S. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. **Cell Metabolism**, v. 8, n. 6, p. 512-521, 2008.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; TAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

ROBERT, P. R.; ZALOGA, G. P. Dietary bioactive peptides. **New Horizons**, v. 2, p. 237–243, 1994.

ROSA, R. D. S.; SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; SOUZA, M. D. F. M. D.; LIMA, A. K. D.; MOURA, L. D. Internações por diabetes mellitus como diagnóstico principal na rede pública do Brasil, 1999-2001. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 10, n. 4, p. 465-78, 2007.

RUBAS, W.; GRASS, G. M. Gastrointestinal lymphatic absorption of peptides and proteins. **Advances in Drug Delivery Reviews**, v. 7, p. 15-69, 1991.

RUMSEY, SC, GALEANO, NF, LIPSCHITZ, B & DECKELBAUM, RJ. Oleate and other long chain fatty acids stimulate low density lipoprotein receptor activity by enhancing acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase activity and altering intracellular regulatory cholesterol pools in cultured cells. **Journal of Biology and Chemistry**, v, 270, p.10008-10016, 1995.

RUSSELL, D. W. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. **Annual Reviews in Biochemistry**, v. 72, p. 137-174, 2003.

SALCEDO-CHAVEZ, B.; OSUNA-CASTRO, J. A.; GUEVARA-LARA, F.; DOMIANGUEZ-DOMIANGUEZ, J.; PAREDES-LOPEZ, O. Optimization of the Isoelectric Precipitation Method To Obtain Protein Isolates from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6515-20, 2002.

SANCHEZ, MA. **Potencial agroindustrial del amaranto**. Centro de estudios económicos y sociales del tercer mundo. Mexico, 1991.

SANTOS, R. D. III diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.77, p. 4-48, 2001.

SAS/MS - Secretaria de Atenção à Saúde, Ministério da Saúde. **Dislipidemias em pacientes de alto risco de desenvolver eventos cardiovasculares**. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas. Consulta Pública SAS/MS nº 13, de 12 de novembro de 2002.

SATAKE, M.; ENJOH, M.; NAKAMURA, Y.; TAKANO, T.; KAWAMURA, Y.; ARAI, S.; SHIMIZU, M. Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in

human intestinal Caco-2 cell monolayers. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, v. 66, p. 378–384, 2002.

SATO, K.; IWAI, K. Identification of food-derived bioactive peptides in blood and other biological samples, **Journal of AOAC International**, v. 91, p. 995–1001, 2008.

SAUER, JD. The grain amaranthus. A survey of their history and classification. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v.37, 1950.

SCANFF, P.; YVON, M.; THIROUIN, S.; PELISSIER, J. P. Characterization and kinetics of gastric emptying of peptides derived from milk proteins in the preruminant calf. **Journal of Dairy Research**, v. 59, n. 4, p. 437–47, 1992.

SCHNETZLER, K. A.; BREEN, W. M. Food uses and amaranth product research: A comprehensive review. **Amaranth**. Biology, Chemistry, and Technology. Boca Raton, USA: CRC Press: 1994.

SCHONEWILLE, M.; FREARK DE BOER, J.; MELE, L.; WOLTERS, H.; BLOKS, V. W.; WOLTERS, J. C.; KUIVENHOVEN, J. A.; TIETGE, U. J. F.; BRUFAU, G.; GROEN, A. K. Statins increase hepatic cholesterol synthesis and stimulate fecal cholesterol elimination in mice. **Journal of Lipid Research**, v. 57, p. 1455–1464, 2016.

SCILINGO, A. A.; ORTIZ, S. E. M.; MARTÍNEZ, E. N.; AÑÓN, M. C. Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. **Food Research International**, v. 35, p. 855–62, 2002.

SEGURA-CAMPOS, M.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D.; HERNANDEZ-ESCALANTE, V. M. Bioavailability of bioactive peptides. **Food Reviews International**, v. 27, p. 213–226, 2011.

SEGURA-NIETO, M.; BARBA DE LA ROSA, A. P.; PAREDES-LOPEZ, O. Biochemistry of amaranth proteins. In: PAREDES-LOPEZ, O. **Amaranth**: biology, chemistry and technology. Boca Raton: CRC Press, 1994.

SETHI, P.; KULKARNI, P. R. In vitro protein digestibility of *Leucaena leucocephala* seed kernels and protein isolate. **Food Chemistry**, v. 46, p. 159-62, 1993.

SGARBIERI, V. C. Métodos de avaliação da qualidade nutricional dos alimentos. In: SGARBIERI, V. C. **Alimentação e nutrição**: Fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: Almed, 1987. p. 250-261.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, 2004.

SHIMIZU, M.; TSUNOGAI, M.; ARAI, S. Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2. **Peptides**, v. 18, p. 681–687, 1997.

SHIN, D. H.; HEO, H. J.; LEE, Y. J.; KIM, H. K. Amaranth squalene reduces serum and liver lipid levels in rats fed a cholesterol diet. **British Journal of Biomolecular Sciences**, v. 61, n. 1, p. 11-4, 2004.

SHUKLA, A.; BRANDSCH, C.; BETTZIECHE, A.; HIRCHE, F.; STANGL, G.; EDER K. Isoflavone-poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down-regulation of hepatic genes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, p. 313–321, 2007.

SILVA-SÁNCHEZ, C.; BARBA DE LA ROSA, A. P.; LEÓN-GALVÁN, M. F.; DE LUMEN, B. O.; de LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; de MEJÍA, E. G. Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1233–1240, 2008.

SIQUEIRA, A. F. A.; ABDALLA, D. S. P.; FERREIRA, S. R. G. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolômica**, v. 50, n. 2, 2006.

SIRTORI, C. R.; AGRADI, E.; CONTI, F.; MANIERO, O.; GATTI, E. Soybean-protein diet in the treatment of Type-II hyperlipoproteinemia. **Lancet**, v. 1, p. 275-7, 1977.

SIRTORI, C. R.; LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; MONETTI, M.; PAZZUCCONI, F.; GATTI, E. Soy and cholesterol reduction: clinical experience. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 3, p. 598S-605S, 1995.

SMITH, B. J. Enzymatic methods for cleaving proteins. In: Walker, J. M. **Methods in Molecular Biology**. New Jersey: Humana Press, 1994.

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.

SOARES, R. A. M.; MENDONÇA, S.; CASTRO, L. I. A.; MENEZES, A. C. C. C.; ARÊAS, J. A. G. Major Peptides from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) Protein Inhibit HMG-CoA Reductase Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 4150-4160, 2015.

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, p. 1351-6, 1990.

SPADY, D. K, WOOLLETT, L. A.; DIETSCHY, J. M. Regulation of plasma LDL-cholesterol levels by dietary cholesterol and fatty acids. **Annual Reviews in Nutrition**, v. 13, p. 355-381, 1993.

SPADY, D. K.; BILHEIMER, D. W.; DIETSCHY, J. M. Rates of receptor-dependent and -independent low density lipoprotein uptake in the hamster. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 80, n. 11, p. 3499–3503, 1983.

SPADY, D. K.; DIETSCHY, J. M. Dietary saturated triacylglycerols suppress hepatic low density lipoprotein receptor activity in the hamster. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 82, n. 13, p. 4526–4530, 1985.

SPADY, D. K.; DIETSCHY, J. M. Interaction of dietary cholesterol and triglycerides in the regulation of hepatic low density lipoprotein transport in the hamster. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 81, p. 300-309, 1988.

SPADY, D. K.; MEDDINGS, J. B.; DIETSCHY, J. M. Kinetic constants for receptor-dependent and receptor-independent low density lipoprotein transport in the tissues of the rat and hamster. **Jornal of Clinical Investment**, v. 77, n. 5, p. 1474–1481, 1986.

SPADY, D. K.; TURLEY, S. D.; DIETSCHY, J. M. Rates of low density lipoprotein uptake and cholesterol synthesis are regulated independently in the liver. **Journal of Lipid Research**, v. 26, n. 4, p. 465–472, 1985.

SPECTOR, D.; ANTHONY, M.; ALEXANDER, D.; ARAB, L. Soy consumption and colorectal cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 47, n. 1, p. 1–12, 2003.

SPEHAR, C. R.; SANTOS, R. L. B.; JACOBSEN, S. E. Andean grain crop introduction to the Brazilian Savannah. In: EMBRAPA solos. **Proceedings of the International conference on sustainable agriculture on tropical and subtropical highlands with special reference to Latin America**. Rio de Janeiro: Embrapa-Solos/INT/UFRJ/Karlsruhe Universitat, 1998.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 10, p. 1412-1415, 1967.

STEVENSON, B. R.; KEON, B. H. The tight junction: morphology to molecules. **Annual Review of Cell and Developmental and Biology**, v. 14, p. 89–109, 1998.

STRICKLAND, D. K.; GONIAS, S. L.; ARGRAVES, W. S. Diverse roles for the LDL receptor family. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 13, n. 2, 2002.

SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. **Saúde Brasil 2006**: uma análise da situação de saúde no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 620 p.

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

TACHIBANA, N.; MATSUMOTO, I.; FUKUI, K.; ARAI, S.; KATO, H.; ABE, K.; TAKAMATSU, K. Intake of soy protein isolate alters hepatic gene expression in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4253–7, 2005.

TAKENAKA, Y.; NAKAMURA, F.; YAMAMOTO, T.; YOSHIKAWA, M. 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.

TEIXEIRA, D. L.; SPEHAR, C. R.; SOUZA, L. A. R. Agronomic characteristics of amaranth for cultivation in the Brazilian Savannah. **Pesquisa Agronômica Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 45-51, 2003.

TEMEL, R. E.; BROWN, J. M. A new model of reverse cholesterol transport: enTICEing strategies to stimulate intestinal cholesterol excretion. **Trends in Pharmacology Sciences**, v. 36, p. 440–451, 2015.

TEUTÔNICO, R. A.; KNORR, D. Amaranth: composition, properties and applications of a rediscovered food crop. **Food Technology**, v. 39, p. 49-60, 1985.

THORNTON, J. M. Disulphide bridges in globular proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 151, p. 261-87, 1981.

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., BARACSKAI, I., SCHÖNLECHNE, R., BERGHOFER, E., & LÄSZTITY, R. 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, A. R.; TORRE-VILLALVAZO, I.; OCHOA, M.; ELÍAS, A. L.; ORTÍZ, V.; AGUILAR-SALINAS, C. A.; TORRES, N. Soy protein reduces hepatic lipotoxicity hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. **Journal of Lipid Research**, v. 46, p. 1823-1832, 2005.

TUGRUL, T. K. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. **Biopharmacol and Drug Disposal**, v. 16, n. 5, p. 351-380, 1995.

TURNER, G. C.; DU, F.; VARSHAVSKY, A. Peptides accelerate their uptake by activating an ubiquitin-dependent proteolytic pathway. **Nature**, v. 405, n. 6786, p. 579–83, 2000.

TURPEINEN, O. Effect of cholesterol-lowering diet on mortality from coronary heart disease and other causes. **Circulation**, v. 59, p. 1-7, 1979.

UDENIGWE, C. U.; ROUVINEN-WATT. The Role of Food Peptides in Lipid Metabolism during Dyslipidemia and Associated Health Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 9303-9313, 2015.

UEMURA, K.; PISA, Z. Trends in cardiovascular disease mortality in industrialized countries since 1950. **World Health Stat Q**, v. 41, p. 155-78, 1988.

UTO-KONDO, H.; AYAORI, M.; SOTHERDEN, G. M.; NAKAYA, K.; SASAKI, M.; YOGO, M.; KOMATSU, T.; TAKIGUCHI, S.; YAKUSHIJI, E.; OGURA, M.; NISHIDA, T.; ENDO, Y.; IKEWAKI, K. Ezetimibe enhances macrophage reverse cholesterol transport in hamsters: contribution of hepato-biliary pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1841, p. 1247–1255, 2014.

VALDES-RODRIGUEZ, S.; SEGURA-NIETO, M.; CHAGOLLA-LOPEZ, A.; VARGAS-CORTINA, A. V.; MARTINEZ-CALLARDO, N.; BLANCO-LABRA, A. purification, characterization, and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1407-1412, 1993.

van der VEEN, J. N.; VAN DIJK, T. H.; VRINS, C. L. J.; VAN MEER, H.; HAVINGA, R.; BIJSTERVELD, K.; TIETGE, U. J. F.; GROEN, A. K.; KUIPERS, F. Activation of the liver x receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 19211–19219, 2009.

van der VELDE AE, VRINS CLJ, VAN DEN OEVER K, KUNNE C, OUDE ELFERINK RPJ, KUIPERS F, GROEN AK (Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. **Gastroenterology**, v. 133, p. 967–975, 2007.

van der VELDE, A. E.; BRUFAU, G.; GROEN, A. K. Transintestinal cholesterol efflux. **Curr Opin Lipidol.**, v. 21, n. 3, p. 167-71, 2010.

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.

van PLATERINK, C. J.; JANSSEN, H. G.; HORSTEN, R.; HAVERKAMP, J. Quantification of ACE inhibiting peptides in human plasma using high performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography. B Analytical Technology and Biomedicine Life Science**, v. 830, p. 151–157, 2006.

VENSKUTONIS PR, KRAUJALIS P. Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: a review on composition, properties, and uses. **Compr Rev Food Sci**, 12(4):381–412, 2013.

VERMEIRSEN, V.; VAN CAMP, J.; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **British Journal of Nutrition**, v. 92, p. 357–366, 2004.

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

VRINS C L J et al. Trans-intestinal cholesterol efflux is not mediated through high density lipoprotein. **The Journal of Lipid Research**, v. 53, p. 2017-2023, 2012.

VRINS, C. L. J. From blood to gut: Direct secretion of cholesterol *via* transintestinal cholesterol efflux. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 47, p. 5953–5957, 2010.

WAGNER, W. D.; EDWARDS I. J.; STCLAIR, R. W.; BARAKAT, H. Low density lipoprotein interaction with artery derived proteoglycan: the influence of LDL particle size and the relationship to atherosclerosis susceptibility. **Atherosclerosis**, v. 75, n. 1, p. 49-59, 1989.

WALKER, J. M. Methods in molecular biology. v. 32: **Basic proteins and peptides protocols**. New Jersey (USA): Humana Press, 1994.

WALSH, D. J.; BERNARD, H.; MURRAY, B. A.; MACDONALD, J.; PENTZIEN, A. K.; WRIGHT, G. A.; WAL, J. M.; STRUTHERS, A. D.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. In vitro generation and stability of the lactokinin beta-lactoglobulin fragment (142-148). **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3845–3857, 2004.

WANG, W.; DE MEJIA, E. G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 4, p. 63-78, 2005.

WANG, Y.; JONES, P. J.; AUSMAN, L. M.; LICHTENSTEIN, A. H. Soy protein reduces triglyceride levels and triglyceride fatty acid fractional synthesis rate in hypercholesterolemic subjects. **Atherosclerosis**, v. 173, n. 2, p. 269-75, 2004.

WEBB, K.E., Jr. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 3011–3022, 1990.

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. 170-7, 1986.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Protein and amino acid requirements in human nutrition**. Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. OMS, 2007. 284p. (WHO technical report series n.935).

WIEDEMAN, P. E.; TREVILLYAN, J. M. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Current Opinion on Investigational Drugs**, v. 4, n. 4, p. 412–20, 2003.

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.

WILSON, P. J.; BASIT, A. W. Exploiting gastrointestinal bacteria to target drugs to the colon: an in vitro study using amylose coated tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 300, p. 89–94, 2005.

WONG, J.; QUINN, C. M.; BROWN, A. SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. **Biochemical Journal**, v. 15, p. 485 –491, 2006.

WOODLEY, J. F. Peptidase enzymes of G.I. tract; barriers to peptide delivery, but potential for controlled release. **Proceedings. of the International Symposium of Control Release Bioact. Mater**, v. 19, p. 2–5, 1982.

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

WU, A. H.; WAN, P.; HANKIN, J.; TSENG, C. C.; YU, M. C.; PIKE, M. C. Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 9, p.1491-6, 2002.

WU, J.; DING, X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 501–506, 2001.

YAMAGISHI, T.; YAMAUCHI, F.; SHIBASAKI, K. Electrophoretical and differential thermal analysis of soybean 11s globulin heated in the presence of N -ethylmalehide. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 1661-8, 1981.

YANG, C. Y.; DANTZIG, A. H.; PIDGEON, C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. **Pharmaceutical Research**, v. 16, p. 1331–1343, 1999.

YANKAH, V. V. Lipids phytosterols and human health. In: AKOH, Casimir C. **Handbook of functional lipids**. New York: CRC, 2006. cap. 18, p. 403-418.

YIN, W, et al. Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 1, p. 51-65, 2012.

YOSHIKAWA M. Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects. **Peptides**, v. 72, p. 208–225, 2015.

YOSHIKAWA, M.; YAMAMOTO, T.; TAKENAKA, Y. Study on a Low Molecular Weight Peptide Derived from Soybean Protein Having Hypocholesterolemic Activity **Soy Protein Res**, v.2, p. 125-8, 1999.

YOSHIKAWA, M.; FUJITA, H.; MATOBA, N.; TAKENAKA, Y.; YAMAMOTO, T.; YAMAUCHI, R.; TSURUKI, H.; TAKAHATA, K. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle- related diseases. **BioFactors**, v. 12, n. 1–4, p.143–6, 2000.

YOSHIKAWA, M.; TAKAHASHI, M.; YANG, S. Delta opioid peptides derived from plant proteins. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1325-1330, 2003.

YU, X. H. et al. ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 20, n. 428, p. 82-8, 2014.

YUSUF, S.; HAWKEN, S.; OUNPUU, S.; DANS, T.; AVEZUM, A.; LANAS, F.; MCQUEEN, M.; BUDAJ, A.; PAIS, P.; VARIGOS, J.; LISHENG, L.; INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **Lancet**, v. 364, p. 937-52, 2004.

ZHANG Z; WANG, H.; JIAO, R.; PENG, C.; WONG, Y. M.; YEUNG, V. S.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Y. Choosing hamsters but not rats as a model for studying plasma cholesterol-lowering activity of functional foods. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, p. 921-930, 2009.

ZHAO, Q.; SANNIER, F.; RICART, G.; PIOT, J. M. A rapid detection and identification of hemorphins released from bovine hemoglobin enzymatic-hydrolysis by use of HPLC coupled with photodiode-array detector. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 18, n. 1. p. 93–103, 1995.

ZHAO, Y. H.; ABRAHAM, M. H.; LE, J.; HERSEY, A.; LUSCOMBE, C. N.; BECK, G.; SHERBORNE, B.; COOPER, I. Evaluation of rat intestinal absorption data and correlation with human intestinal absorption. **European Journal of Medical Chemistry**, 38 233-243, 2003.

Currículo Lattes

Rosana Aparecida Manólio Soares Freitas

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5035965012458311>
Última atualização do currículo em 16/08/2017

Graduação em Química, Licenciatura e Bacharelado, pelo Centro Universitário Fundação Santo André (2006), e Mestrado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (2008). Atualmente é Técnica do Laboratório de Bioquímica e Propriedades Funcionais dos Alimentos da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Química, com ênfase em Bioquímica e Química Analítica, atuando principalmente nos seguintes temas: análises bioquímicas e de alimentos, desenvolvimento de produtos, alimentos funcionais, equipamentos analíticos. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Rosana Aparecida Manólio Soares Freitas
Nome em citações bibliográficas	SOARES, R. A. M.; SOARES, R.; Soares, Rosana Aparecida Manólio; SOARES, R.A.M.; SOARES, R.A.M.; SOARES RAM; SOARES, RAM; Soares, Rosana A M; Rosana A.M. Soares; Rosana Aparecida Manólio Soares; Rosana Aparecida Manólio Soares Freitas; Soares Freitas, Rosana Aparecida Manólio; Soares-Freitas, Rosana Aparecida Manólio; Soares Freitas, RAM; Soares-Freitas, RAM; SOARES, ROSANA; Freitas, Rosana Aparecida Manólio Soares; Soares-Freitas, Rosana Manólio; Manólio, S.R.A.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Avenida Dr. Arnaldo, 715, Departamento de Nutrição Cerqueira Cesar 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617765 Fax: (11) 30617701
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2013	Doutorado em andamento em Nutrição em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública, FSP USP, Brasil. Título: Análise de peptídeos em ratos após ingestão de isolado proteico de amaranto e avaliação de parâmetros relacionados ao metabolismo do colesterol. Orientador: José Alfredo Gomes Arêas.
2006 - 2008	Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Identificação de Peptídeos Hipocolesterolizantes do Isolado Protéico do Grão de Amaranto (<i>Amaranthus cruentus</i> L. BRS-Alegria), Ano de Obtenção: 2008. Orientador: José Alfredo Gomes Arêas.
2005 - 2005	Palavras-chave: peptídeos bioativos; amaranto; efeito hipocolesterolizante. Graduação em Química Bacharelado. Centro Universitário Fundação Santo André, CUFSA, Brasil. Título: Análise de Ácidos Graxos Trans em Alimentos tipo Fast Food. Orientador: Marcia de Araujo Leite Nacif.
2001 - 2004	Graduação em Química Licenciatura. Centro Universitário Fundação Santo André, CUFSA, Brasil.
1999 - 2000	Curso técnico/profissionalizante em Técnico em Química. Escola Técnica Estadual Getúlio Vargas, ETE GV, Brasil.