Universidade de São Paulo

Faculdade de Saúde Pública

Identificação de peptídeos hipocolesterolemizantes do isolado protéico do grão de amaranto (Amaranthus cruentus L. BRS-Alegria)

Rosana Aparecida Manólio Soares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de concentração: Nutrição

Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

São Paulo

2008

SOARES RAM

Identificação de peptídeos hipocolesterolemizantes do isolado protéico do grão de amaranto (Amaranthus cruentus L. BRS-Alegria)

Mestrado

FSP-USP

2008

Identificação de peptídeos hipocolesterolemizantes do isolado protéico do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria)

Rosana Aparecida Manólio Soares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de concentração: Nutrição

Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

São Paulo

2008

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

Agradecimentos

Ao professor Dr. José Alfredo Gomes Arêas, por acreditar no nosso trabalho e, principalmente, em mim. Graças a essa confiança foi possível exercer as atividades de estudante e técnica de laboratório simultaneamente.

Às professoras Dra. Nagila Damasceno e Dra. Flavia Maria Netto, pelas valiosas sugestões desde o início do meu trabalho.

Aos professores do Depto de Nutrição, em especial às professoras Dra. Deborah Bastos, Dra. Elisabete Machado e Dra. Elizabeth Torres, por todo apoio que recebi durante o período do mestrado e nos anos anteriores a esse.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro que possibilitou a execução deste estudo.

A todas as colegas, e, mais que isso, amigas que freqüentam ou freqüentaram o laboratório. Não poderia colocar o nome de todas, pois são muitas. Cada uma ofereceu auxílio a seu jeito, seja na área analítica ou mesmo na psicológica. Sou grata a todas (e aos rapazes também) que entenderam a minha dupla jornada e foram pacientes, apesar do pouco tempo que dediquei a cada um deles, e pela amizade de sempre.

À Simone Mendonça, que nos ajudou na idéia inicial do projeto, apesar de não ser minha co-orientadora oficial, além de auxiliar nos afazeres de técnica de laboratório, e à Geni Sampaio, que é quem faz isso hoje.

Ao Luciano, que me encontrou no meio desta jornada e entendeu a minha falta de tempo e, mais que isso, me apoiou em todos os momentos.

À minha família, em especial minha mãe, meu pai e meu irmão. Obrigada por entenderem as faltas nas reuniões familiares. Vocês são meu alicerce, sem vocês nada disso seria possível.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À Deus, que sempre me guia e me ilumina, por tudo.

E conhecereis a verdade, e a verdade vos libertará.

Evangelho segundo São João, 8,32

Resumo

Introdução – Dentre os distúrbios relacionados à alimentação, o aumento do colesterol e, conseqüentemente, a incidência de doenças cardiovasculares, representa um importante problema de Saúde Pública. A proteína do amaranto reduz o colesterol plasmático, possivelmente pela presença de peptídeos bioativos, liberados durante sua digestão parcial. **Objetivo** - Verificar a ocorrência de peptídeos hipocolesterolemizantes após digestão *in vitro* do isolado protéico de amaranto. **Métodos** – Proteína isolada do amaranto foi submetida à digestão enzimática *in vitro* por duas metodologias distintas. Os peptídeos menores que 3000 Da foram injetados em espectrômetro de massa para sua identificação. **Resultados** – Foi obtido isolado protéico com grau de pureza acima de 90%. O isolado protéico e a farinha integral apresentaram a mesma quantidade de aminoácidos essenciais e de aminoácidos presentes nas seqüências dos peptídeos de interesse. O isolamento protéico também não promoveu alterações nas principais frações moleculares. As estruturas terciária e quaternária provavelmente foram alteradas, pois houve redução da solubilidade protéica. O grupo dissulfeto é um dos responsáveis pela ocorrência de agregados, entretanto outras ligações também podem estar envolvidas. Essas forças podem interferir no acesso aos sítios de clivagem das ligações peptídicas e dificultar a ação enzimática. Devido ao aumento da força iônica do meio obteve-se alto grau de hidrólise em ambos os métodos enzimáticos. A digestão protéica resultou em fragmentos que, em sua maioria, apresentaram pesos moleculares inferiores a 30 kDa. O perfil peptídico, para a maior parte das amostras, mostrou-se complexo, com difícil separação de picos. A amostra hidrolisada que apresentou menor grau de

hidrólise e menor quantidade de picos no cromatograma continha um dos peptídeos hipocolesterolemizantes procurados, o fragmento IAEK. **Conclusões** - O isolado protéico de amaranto apresenta pelo menos um peptídeo hipocolesterolemizante quando submetido às digestões enzimáticas *in vitro* estudadas, similares à digestão *in vivo*.

Descritores: amaranto, isolado protéico, peptídeos hipocolesterolemizantes, digestão enzimática *in vitro*.

Abstract

Introduction – Among the problems associated to food habits, the increase of cholesterol levels, and thus the incidence of cardiovascular diseases represents an important problem for Public Health. The amaranth protein reduces the blood cholesterol levels, possibly due to the presence of peptides released during its incomplete digestion. **Objective** - To verify the occurrence of hypocholesterolemic peptides after *in vitro* digestion of amaranth protein isolate. **Methods** – Amaranth protein isolate was submitted to *in vitro* enzymatic digestion by two distinct methodologies. Peptides smaller than 3000 Da were injected in mass spectrometer for identification. **Results** – Protein isolate presented a high purity degree, above 90%. The fat extraction and the protein isolation were efficient and did not modify significantly amaranth chemical composition, preserving the quantities of essential amino acids and amino acids present in the sequence of the investigated peptides. Protein isolation did not promote changes in the main molecular fractions. The tertiary and quaternary structures were probably altered, given that protein solubility decreased. Disulfide bonds are responsible for aggregate arrangement; however, other bonds probably occurred and were also responsible for the decrease in solubility. These bonds may interfere in enzymatic hydrolysis, impeding the enzymes to cleave the peptide bonds. It was obtained a great hydrolysis degree in both enzymatic methods because ionic strength of the solution was high. Most of the protein digestion fragments presented molecular weight lower than 30kDa, demonstrating the efficiently of both digestion methods. Peptide mixture, for most samples, presented a complex profile and difficulties in peaks separation. The

hydrolyzed sample that presented the lowest hydrolysis degree e the lowest quantity of peaks in chromatogram presented one of the hypocholesterolemic peptides, the sequence IAEK. **Conclusions** - The amaranth protein isolate presents at least one hypocholesterolemic peptide when submitted to the studied *in vitro* enzymatic digestion that is similar to *in vivo* digestion.

Keywords: amaranth, protein isolate, hypocholesterolemic peptides, *in vitro* enzymatic digestion.

1 - INTRODUÇÃO 15

1.1 **DOENÇAS CARDIOVASCULARES, COLESTEROL E DIETA** 15

1.2 **PROTEÍNAS VEGETAIS** 17

1.2.1 AÇÃO HIPOCOLESTEROLEMIZANTE 17

1.2.2 DIGESTÃO PROTÉICA E PRODUTOS RESULTANTES 19

1.3 **PEPTÍDEOS BIOATIVOS** 22

1.3.1 PEPTÍDEOS HIPOCOLESTEROLEMIZANTES 24

1.4 **AMARANTO** 28

1.4.1 CARACTERIZAÇÃO DO GRÃO 28

1.4.2 AÇÃO HIPOCOLESTEROLEMIZANTE 29

1.4.3 PROTEÍNAS DO AMARANTO 30

1.4.3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL 30

1.4.3.2 AÇÃO HIPOCOLESTEROLEMIZANTE 31

1.4.4 PEPTÍDEOS BIOATIVOS 32

2 - JUSTIFICATIVA 36

3 - OBJETIVOS 37

3.1 **OBJETIVO GERAL** 37

3.2 **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** 37

4 - MATERIAIS E MÉTODOS 38

4.1 **AMOSTRA** 38

4.2 **DESENGORDURAMENTO DA FARINHA** 38

4.3 **OBTENÇÃO DO ISOLADO PROTÉICO** 38

4.4 **CARACTERIZAÇÃO DAS FARINHAS E DO ISOLADO PROTÉICO** 40

4.4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL 40

4.4.2 PERFIL DE AMINOÁCIDOS TOTAIS 41

4.4.3 SOLUBILIDADE 42

4.5 **DIGESTÃO IN VITRO** 43

4.5.1 MÉTODO A 44

4.5.2 MÉTODO B 44

4.6 **GRAU DE HIDRÓLISE** 46

4.7 **TEORES DE SULFIDRILAS LIVRES E LIGAÇÕES DISSULFETO** 47

4.8 **ELETROFORESE SDS-PAGE** 49

4.9 **SÍNTESE DE PEPTÍDEOS HIPOCOLESTEROLEMIZANTES** 50

4.10 **SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS** 51

4.11 **IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS** 53

4.12 **ANÁLISE ESTATÍSTICA** 54

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 55

5.1 **CARACTERIZAÇÃO DAS FARINHAS INTEGRAL, DESENGORDURADA E DO ISOLADO PROTÉICO** 55

5.1.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL 55

5.1.2 RENDIMENTO DO ISOLAMENTO PROTÉICO 56

5.1.3 PERFIL DE AMINOÁCIDOS TOTAIS 57

5.1.4 SOLUBILIDADE 61

5.2 **GRAU DE HIDRÓLISE** 64

5.3 **TEORES DE SULFIDRILAS LIVRES E LIGAÇÕES DISSULFETO** 67

5.4 **PERFIL ELETROFORÉTICO** 69

5.5 **SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS** 76

5.1 **IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA** 83

6 - CONCLUSÕES 97

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 99

ANEXO I - ESPECTROS EM MS-EI EM MODO SIM A 70 EV DO PEPTÍDICO SINTÉTICO IAVP, DE UMA DAS FRAÇÕES DA AMOSTRA HB E DE UMA DAS FRAÇÕES DA AMOSTRA HA 116

ANEXO II - ESPECTROS EM MS-EI EM MODO SIM A 70 EV DO PEPTÍDICO SINTÉTICO LPYPR, DE UMA DAS FRAÇÕES DA AMOSTRA HA RESFRIADA E DE UMA DAS FRAÇÕES DA AMOSTRA HB COM TCA 117

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura do peptídeo IAEK.....25

Figura 2 - Estrutura do peptídeo VPDPR.....26

Figura 3 - Estrutura do peptídeo IAVP.....26

Figura 4 - Estrutura do peptídeo LPYPR.....27

Figura 5 - Fluxograma de obtenção do isolado protéico do grão de amaranto.....39

Figura 6 - Esquema de digestão das amostras, seus controles e métodos de interrupção da digestão.....46

Figura 7 - Foto do grão de amaranto (1), da farinha desengordurada (2) e do isolado protéico (3).....56

Figura 8 - (a) Foto do gel de eletroforese; (b) Perfil densiométrico e pesos moleculares do gel. Condições não-redutoras, amostras: (1) farinha integral, (2) farinha desengordurada, (3) isolado protéico, (4) mistura de enzimas dos métodos HA e HB, (5) precipitado liofilizado de HA, (6) precipitado liofilizado de HB, (7) padrão de peso molecular.....72

Figura 9 - (a) Foto do gel de eletroforese (b) Perfil densiométrico e pesos moleculares do gel. Condições redutoras, amostras: (1) farinha integral, (2) farinha desengordurada, (3) isolado protéico, (4) mistura de enzimas dos métodos HA e HB, (5) precipitado liofilizado de HA, (6) precipitado liofilizado de HB, (7) padrão de peso molecular.....75

Figura 10 – Cromatograma dos peptídeos sintéticos (1) IAEK, (2) VPDPR, (3) IAVP, (4) LPYPR a 220 nm, linha preta, e a 280 nm, linha azul.....76

Figura 11 – Cromatograma do peptídeo sintético (1) IAEK a 220 nm, solubilizado em: tampão fosfato e TCA, linha preta; tampão fosfato, linha rosa. 77

Figura 12 – Cromatogramas a 220 nm sobrepostos de: (a) EA resfriada, linha preta, e EB TCA, linha rosa; (b) zoom de 20 a 40 minutos de (a) com EA resfriada, linha preta, e EB TCA, linha azul; (c) EA TCA, linha preta, e EB resfriada, linha rosa; (d) zoom de 20 a 40 minutos de (c), com EA TCA, linha preta, e EB resfriada, linha azul.....79

Figura 13 – Cromatogramas a 220 nm sobrepostos de: (a) IB, linha preta, e EB, linha azul, ambas com TCA; (b) IB, linha preta, e EB, linha azul, ambas resfriadas. (a) e (b) representam zoom de 20 a 40 minutos.....80

Figura 14 – Cromatogramas a 220 nm sobrepostos de: (a) HA resfriado, linha preta, e HA TCA, linha azul; (b) zoom do cromatograma (a), de 20 a 40 minutos; (c) HB TCA, linha preta, e HB resfriada, linha azul; (d) zoom do cromatograma (c), de 20 a 40 minutos.....82

Figura 15 - Espectros em modo SIM a 70 eV da amostra HB resfriada (acima) e do padrão IAEK (abaixo). A barra azul acima dos espectros indica a probabilidade dessa ocorrência.....91

Figura 16 - Espectros em modo SIM a 70 eV do branco (solvente evaporado sem a presença do padrão e inserido no MS).....92

Figura 17 - Espectros em modo SIM a 70 eV da amostra HA contendo TCA (acima) e do padrão IAEK (abaixo). A barra azul acima dos espectros indica a probabilidade dessa ocorrência.....93

Figura 18 - Espectros em modo SIM a 70 eV da amostra HA contendo TCA (acima) e do padrão VPDPR (abaixo). A barra azul acima dos espectros indica a probabilidade dessa ocorrência.....94

Figura 19 - Espectros em modo SIM a 70 eV da amostra HA contendo TCA (acima) e do branco - solvente evaporado sem a presença do padrão e inserido no MS (abaixo). A barra azul acima dos espectros indica a probabilidade dessa ocorrência.....95

Anexo I - Espectros em MS-EI em modo SIM a 70 eV do peptídeo sintético IAVP, de uma das frações da amostra HB e de uma das frações da amostra HA.....116

Anexo II - Espectros em MS-EI em modo SIM a 70 eV do peptídeo sintético LPYPR, de uma das frações da amostra HA resfriada e de uma das frações da amostra HB com TCA.....117

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição centesimal (em base seca) das amostras analisadas.....55

Tabela 2 - Perfil de aminoácidos totais do isolado protéico obtido neste trabalho e no isolado protéico de MENDONÇA (2006). Os dados estão apresentados como grama de aminoácido por 100 gramas de proteína.....59

Tabela 3 - Recomendação de aminoácidos essenciais da FAO/WHO e escore químico de aminoácidos das farinhas e do isolado protéico.....60

Tabela 4 - Perfil de solubilidade em diferentes solventes nas farinhas integral, desengordurada e no isolado protéico.....61

Tabela 5 - Teores dos grupos sulfidrila livre e ligações dissulfeto nos sobrenadantes resfriados dos hidrolisados.....68

Tabela 6 - Teores dos grupos sulfidrila livre e ligações dissulfeto nos precipitados resfriados dos hidrolisados.....68

Tabela 7 – Relações m/z obtidas a 70 eV do padrão em MS-EI Full Scan para os peptídeos sintéticos e valores de abundância relativa do padrão e do branco em modo SIM.....85

Tabela 8 – Massas monoisotópicas dos fragmentos peptídicos e massas observadas a 70 eV.....87

Lista de Abreviaturas dos 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, colesterol e dieta

As doenças cardiovasculares constituíram a maior de todas as endemias no século XX e, atualmente, estão dentre as principais causas de morte no Brasil e no mundo. Em 2004 representaram cerca de 32,5% do total de óbitos no país com 285543 casos (UEMURA e PISA, 1988; RAE-ELLEN e col., 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Uma das causas mais freqüentes das doenças cardiovasculares é a aterosclerose coronária (RAE-ELLEN e col., 2003). A aterosclerose é caracterizada pela presença de placas de ateroma, espessamentos arteriais que apresentam um depósito formado quase somente de ésteres de colesteril (BETTERIDGE, 1989; MATHUR, 1961).

Existe, destarte, 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 e col., 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

O organismo humano sintetiza grande parte do colesterol circulante, somente cerca de um terço deste provém da dieta (NELSON e COX, 2002). 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 e col., 1989; BETTERIDGE, 1989). Altas concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e baixas de LDL, por sua vez, podem significar proteção contra doenças cardiovasculares (YUSUF e col., 2004; SIQUEIRA e col., 2006).

Evidências epidemiológicas e clínicas estabelecem associação entre dieta, dislipidemia e aumento do risco de morte. A incidência de coronariopatias é, em geral, dependente da prevalência de seus fatores de risco, podendo a dieta ser incluída como um dos principais fatores (MANSUR e col., 2001; ECKEL e KRAUSS, 1998). Hábitos alimentares inadequados afetam o metabolismo lipídico, levando à elevação das concentrações plasmáticas de LDL e à redução das concentrações de HDL (PIEGAS e col., 2003; MAGALHÃES e col., 2004; YUSUF e col., 2004).

Foi verificado, por sua vez, efeito hipolipemiante resultante da ingestão de alguns alimentos (TURPEINEN, 1979). Ensaios clínicos indicam que uma dieta rica em frutas, vegetais, legumes, grãos integrais, peixes e com baixa quantidade de gordura é associada à menor incidência de diversas doenças crônicas não-transmissíveis, incluindo as doenças cardiovasculares (NCEP, 2001; PRICE e FOWKES, 1997).

A caracterização dos componentes alimentares que exercem maior impacto 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 e col., 2000; SHIN e col., 2004).

1.2 Proteínas vegetais

1.2.1 Ação hipocolesterolemizante

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 e col., 2002; WU e col., 2002; SPECTOR e col., 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 (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998; POTTER, 1995; WANG e col., 2004; AZADBAKHT e col., 2003).

FROTA (2007) produziu isolado protéico de feijão caupi e verificou a influência da proteína isolada no metabolismo lipídico de hamsters hipercolesterolemizados. Comparada à dieta controle com caseína, a dieta contendo

20% de isolado protéico provocou redução significativa no colesterol total (20%) e colesterol não-HDL (22%). Em análise histológica do fígado dos animais foi observado efeito hepatoprotetor promovido pelo isolado protéico.

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 protéico de soja foi menor (DAMASCENO e col., 2000). Estudo de TACHIBANA e colaboradores (2005) em ratos demonstrou que a ingestão de isolado protéico 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. Estudos similares foram realizados e obtiveram resultados semelhantes (CARROLL e KUROWSKA, 1995; SIRTORI e col., 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 e col., 1995; FAO/WHO, 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 protéica possam ser os responsáveis por este efeito (ARNOLDI e col., 2001).

1.2.2 Digestão protéica e produtos resultantes

O estudo da digestão do substrato protéico, bem como dos aminoácidos e de outros fragmentos liberados, podem ser realizados com técnicas *in vitro* em condições como a utilização de enzimas proteases, pH e taxas de enzima e substrato adequadas, além de um tempo de incubação controlado, a um custo muito menor que o das técnicas *in vivo* (QIAO e col., 2004; MULLALLY e col., 1996).

As hidrólises ácida e enzimática são os dois principais métodos de digestão *in vitro*. A hidrólise ácida é relativamente simples e barata, porém é mais difícil de ser controlada e danos aos aminoácidos podem ocorrer (WALKER, 1994; LOURENÇO, 2000).

A determinação enzimática da digestibilidade da proteína tem sido observada como correlata com estudos *in vivo* (HSU e col., 1977). BODWELL e colaboradores (1980) usaram digestibilidade enzimática *in vitro* para estimar a digestibilidade verdadeira de diversas fontes de proteínas. Para a maior parte das fontes estudadas, houve boa correlação quando se comparou a digestibilidade *in vitro* com a digestibilidade verdadeira determinada em ratos.

A digestibilidade enzimática *in vitro* se baseia em digerir a amostra com enzimas proteolíticas em condições padronizadas. É estimada com o uso de enzimas proteolíticas que agem normalmente na digestão, procurando-se simular as condições do estômago e do intestino, onde a digestão se processa (WALKER e col., 1994; LOURENÇO, 2000).

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 cujos grupos carbonila são fornecidos por resíduos de fenilalanina, tirosina ou triptofano (Quadro 1). Os três casos ocorrem desde que não haja um resíduo de prolina ligado a esses aminoácidos (SMITH e col., 1994).

Quadro 1 - Especificidades, impedimento de clivagem da ligação peptídica e outras características de enzimas utilizadas na digestão enzimática *in vitro*.

Enzima	Especificidade*	Impedimento	Comentários	pH ótimo	Peso molecular aproximado (Da)
Pepsina	R1 = L, F, W, Y	R2 = P	inespecífica	1,8-2,2	34500
Tripsina	R1 = resíduos carregados positivamente: R, K	R2 = P	altamente específica	8,0	23500
Quimotripsina	R1 = resíduos hidrofóbicos volumosos: F, W, Y	R2 = P	mais lentamente quando R1 = N, H, M, L	7,0-9,0	25000

Fonte: SMITH, 1994.
*R1 = resíduo C-terminal; R2 = resíduo N-terminal.

Fatores exógenos, como interações de proteínas com polifenóis, fitatos, carboidratos, lipídios e inibidores de protease podem afetar a digestibilidade de proteínas, assim como fatores endógenos relacionados às propriedades estruturais da proteína (DUODU e col., 2003; IKEDA e col., 1986).

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). BOWYER e colaboradores (1993) sugeriram que quando houve liberação no duodeno da enterostatina,

fragmento com cinco resíduos de aminoácidos, este pôde ser absorvido no intestino, uma vez que a alimentação foi seguida pelo aumento da concentração de enterostatina no lúmen e no sangue. Foi proposto também por MINER e colaboradores (1994) que este é absorvido intacto, corroborando com os estudos de BOURAS e colaboradores (1993) e ERLANSON-ALBERTSSON e LARSSON (1988 a,b). Após serem absorvidos, os fragmentos podem sofrer ou não hidrólise intracelular (RUBAS e GRASS, 1991).

Fragmentos com diversificada seqüência de aminoácidos podem apresentar distintas atividades biológicas, sendo denominados peptídeos biologicamente ativos ou bioativos, e são dependentes das fontes protéicas iniciais, das enzimas de clivagem e dos processamentos sofridos. 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 e col., 2000) ou com atividade hipotensiva (WU e DING, 2001).

1.3 Peptídeos bioativos

Nas últimas décadas vários autores têm descoberto peptídeos bioativos em proteínas dietéticas (MATSUI e col., 1993; LI e col., 2002; YOSHIKAWA e col., 2003; SGARBIERI, 2004; DE MEJIA e DE LUMEN, 2006). Estes peptídeos, uma vez absorvidos, podem agir como reguladores, com atividades tipicamente hormonais (KORHONEN e PIHLANTO, 2003; KITTS e WEILER, 2003), e exercer

diversas funções biológicas por interação com células receptoras, regulando enzimas ou interferindo em ciclos de células.

Peptídeos dietéticos são fragmentos de proteínas ou pequenas cadeias de aminoácidos produzidas pela digestão enzimática ou pelo processamento do alimento via fermentação ou hidrólise. Peptídeos bioativos derivados de proteínas alimentares normalmente contém de 2 a 9 resíduos de aminoácidos. No entanto, essa cadeia pode se estender a 20 ou mais unidades (KITTS e WEILER, 2003).

Na base de dados ExPASy (http://ca.expasy.org/sprot/), encontram-se mais de 3770 proteínas seqüenciadas, principalmente extraídas da base de dados Swiss-Prot (http://ca.expasy.org/sprot//). No banco de dados Biopep (http://www.uwm.edu.pl/biochemia) existem mais de 2200 diferentes peptídeos bioativos.

O leite e outros produtos de consumo diário, para grande parte da população mundial, estão dentre os mais estudados precursores desses peptídeos (SGARBIERI, 2004; SCANFF e col., 1992; HERNÁNDEZ-LEDESMAN e col., 2004). COSTA e colaboradores (2007) verificaram efeito hipotensor dos peptídeos do leite, extraídos pela ação da enzima alcalase, em ratos hipertensos alimentados com isolado protéico denaturado a 65ºC.

Diversos peptídeos bioativos foram encontrados na proteína de soja, incluindo peptídeos hipocolesterolemizantes (Quadro 2).

Quadro 2 - Exemplos de peptídeos bioativos derivados de proteínas de soja.

Fonte	Preparação	Peptídeos	Bioatividade	Referências
Proteína isolada da soja - nativa e aquecida	1) proteases purificadas: pepsina, papaína, quimotripsina 2) proteases: alacalase, Protamez e Flavourzima	grau de hidrólise de 1,7 a 20,6%	atividade antioxidante	Pena-Ramos e Xiong, 2002
Concentrado protéico de soja, Crocksoy 70, extraído com etanol 80%	porcina, pepsina e tripsina pancreática bovina ou somente tripsina	peptídeos com pesos moleculares diferentes foram separados do material digerido por ultrafiltração	regulação da formação e degradação da LDL pelos receptores das células HepG2	Arnoldi e col., 2001
Proteína de soja desengordurada	termolase	XMLPSYSPY	anticâncer	Kim e col., 2000
Proteína de soja desengordurada	enzima alcalase	Amostra hidrolisada fracionada em resina de troca catiônica	hipotensivo	Wu e Ding, 2001
Glicinina de soja	peptídeo derivado da glicinina da proteína da soja	LPYPR	peptídeo hipocolesterole-mizante	Yoshikawa e col., 2000

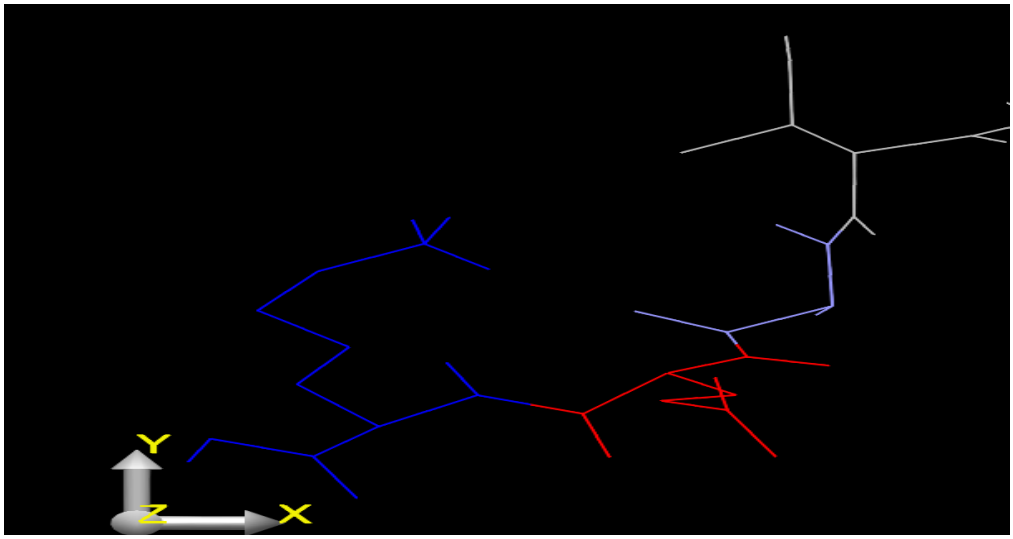
Fonte: WANG e DE MEJIA, 2005.

1.3.1 Peptídeos hipocolesterolemizantes

Os fragmentos peptídicos com as seqüências IAEK, VPDPR, IAVP, e LPYPR apresentam comprovada capacidade hipocolesterolemizante e podem ser encontrados em produtos de origem vegetal como a soja, o trigo, o agrião, o arroz, a ervilha, entre outros (DZIUBA e col., 2003).

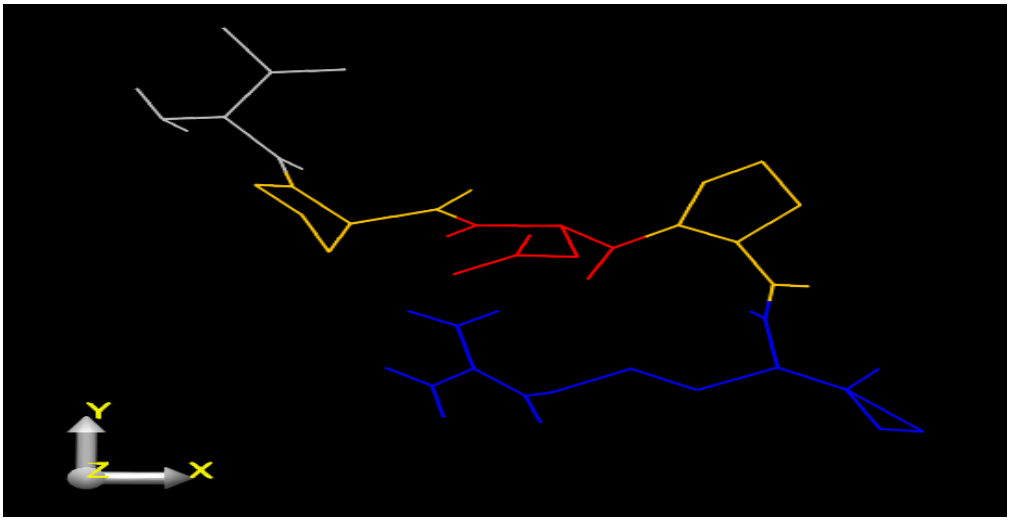
O peptídeo IAEK (Figura 1) induz a supressão da absorção do colesterol, evidenciado por estudo com cultura de células Caco-2. Especula-se que pode diminuir a solubilidade micelar do colesterol e inibir a absorção do mesmo (NAGAOKA e col., 2001).

Figura 1- Estrutura do peptídeo IAEK. Cada cor representa um aminoácido: branco (I), lilás (A), vermelho (E), azul (K). Programa de visualização: Tinker.



O peptídeo VPDPR (Figura 2) é anorexigênico em uma dieta rica em lipídios, inibe a absorção de gordura de alimento em animais submetidos a este tipo de dieta. Além disso, pode substituir o NADPH, forma oxidada da coenzima doadora de elétrons, na via da enzima chave da conversão de mevalonato em colesterol, a HMG-CoA redutase (TAKENAKA e col., 2003).

Figura 2 - Estrutura do peptídeo VPDPR. Cada cor representa um aminoácido: branco (V), amarelo (P), vermelho (D), amarelo (P), azul (R). Programa de visualização: Tinker.

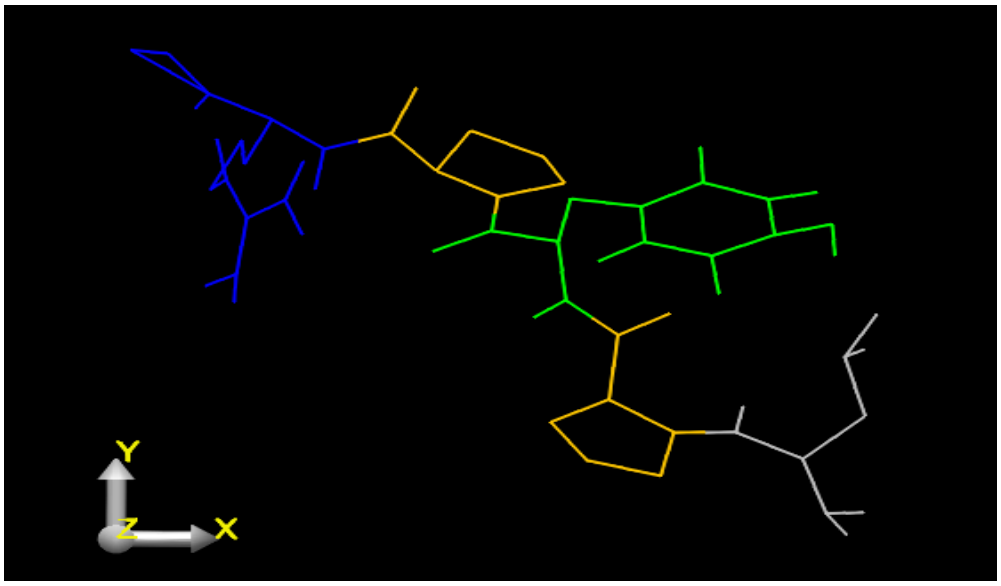


A seqüência IAVP (Figura 3), isolada da proteína 11S da soja, atua como inibidor da HMG-CoA redutase, ação similar a uma estatina, competindo pelo mesmo sítio ativo que a NADPH (PAK e col., 2005a).

Figura 3 - Estrutura do peptídeo IAVP. Cada cor representa um aminoácido: branco da ponta (I), lilás (A), branco do meio (V), amarelo (P). Programa de visualização: Tinker.

O Fragmento LPYPR (Figura 4 e Quadro 2) reduz o colesterol sérico em camundongos através de dieta contendo 50 mg de peptídeo/kg de animal. A seqüência LPYPR pode ocupar o sítio específico do NADPH na síntese do colesterol via HMG-CoA redutase, com a prolina na posição 2 desempenhando um papel importante na inibição desta enzima. A presença do anel alifático na prolina deixa a conformação do peptídeo rígida, permitindo interações com o sítio específico para o NADPH na HMG-CoA redutase. O coeficiente de correlação (R) entre a média calculada da contribuição das ligações e a atividade inibitória é =de 0,926, o que indica que este peptídeo pode ocupar parte do sítio ligante da NADPH no centro ativo da enzima (YOSHIKAWA e col., 1999 PAK e col., 2005b).

Figura 4 - Estrutura do peptídeo LPYPR. Cada cor representa um aminoácido: branco (L), amarelo (P), verde (Y), amarelo (P), azul (R). Programa de visualização: Tinker.



1.4 Amaranto

1.4.1 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. Sua planta tem regime anual e é cultivada desde o período pré-colombiano no México, na América Central e nos territórios andinos da América do Sul. 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 (VALDES-RODRIGUEZ e col., 1993; FERREIRA e col., 2007).

Apesar de haver solo e clima adequados para o plantio esse pseudocereal não é produzido em larga escala ou consumido no Brasil. Trabalhos de pesquisa e desenvolvimento resultaram no lançamento de uma variedade brasileira de *Amaranthus cruentus* adaptada ao solo do Cerrado, denominada BRS-Alegria (EMBRAPA, 2002). A Embrapa Cerrados visa a introdução do amaranto como cultivo secundário, em regiões de plantio de soja (SPEHAR e col., 1998, TEIXEIRA, 2003).

Mesmo sendo pouco conhecido, o amaranto vem despertando especial interesse por parte de grupos de pesquisa brasileiros devido às suas particularidades agrícolas; por seu potencial de aplicação na indústria de alimentos funcionais como alimento ou ingrediente para uma grande variedade de produtos industrializados

(FERREIRA e col., 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).

A composição química média do grão apresenta de 13-18% de proteínas, 7-8% de lipídios, 50-60% de amido e 8% de fibras alimentares (BECKER e col., 1981; GORINSTEIN e col., 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 e col., 1994). Apesar do perfil lipídico do grão de amaranto ser semelhante ao de outros cereais, este apresenta um diferencial por sua fração insaponificada ser rica em esqualeno (BERGANZA e col., 2003).

1.4.2 Ação hipocolesterolemizante

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. Outras investigações também demonstraram que o amaranto é um alimento hipocolesterolemizante (CHATURVEDI e col., 1993; GRAJETA, 1997; 2002; BERGER e col., 2003ab).

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.

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.

1.4.3 Proteínas do amaranto

1.4.3.1 Caracterização química e nutricional

A proteína do amaranto é uma excelente alternativa ou complemento para o balanço nutricional. O teor protéico do amaranto é superior ao de outros cereais (BRESSANI, 1989).

Apresenta conteúdo expressivo de aminoácidos essenciais, especialmente lisina e metionina, que são limitantes na maioria dos cereais (ESCUDERO e col., 2004; SEGURA-NIETO e col., 1994). A deficiência dos aminoácidos limitantes do amaranto não atingem valores inferiores a 80% (BRESSANI, 1989; IMERI e col., 1987; FERREIRA e ARÊAS, 2004; MENDONÇA, 2006).

Nesse contexto, dentre as sementes de cereais ou leguminosas a qualidade nutricional da proteína do amaranto foi destacada pelos órgãos Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e World Health Organization (WHO) (BEJOSANO e CORKE, 1998).

As principais frações 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. A 11S globulina possui características moleculares similares às encontradas em outras globulinas 11S, com uma estrutura quaternária dodecamérica compreendendo subunidades ácidas e básicas ligadas por ligações dissulfeto (SEGURA-NIETO e col., 1994; MARCONE e col., 1994; MARTINEZ e col., 1997; GORINSTEIN e col., 2002).

1.4.3.2 Ação hipocolesterolemizante

Tendo em vista as características da proteína da semente do amaranto, MENDONÇA (2006) estudou o potencial efeito do isolado protéico de amaranto na redução do colesterol em hamsters hipercolesterolemizados. Em grupo cuja ração continha 20% de isolado protéico 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 protéica da dieta uma mistura que simulava o perfil de aminoácidos do amaranto, MENDONÇA (2006) observou que os teores de colesterol plasmático não foram alterados significantemente 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.

Uma das hipóteses propostas por MENDONÇA (2006) postula a digestão incompleta das proteínas no trato gastrintestinal, resultando na liberação e absorção de peptídeos bioativos.

1.4.4 Peptídeos bioativos

SILVA-SÁNCHES e colaboradores (2008) buscaram peptídeos bioativos nas seqüências de proteínas de amaranto conhecidas e reportadas na base de dados NCBI Entrez Protein. Há 66 seqüências de proteínas ou peptídeos de amaranto, 3 de *Amaranthus cruentus*, descritas na base de dados NCBI Entrez Protein (www.ncbi.nlm.nih.gov).

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. Como resultado obtiveram peptídeos bioativos

com 12 atividades principais, citadas no Quadro 3. O estudo biocomputacional demonstrou que o amaranto pode ser uma fonte potencial de peptídeos bioativos.

Uma das principais atividades reportadas para o amaranto é a hipotensora. Os produtos de hidrólise do concentrado protéico de amaranto apresentaram atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina (TIENGO, 2007). Peptídeos anti-hipertensivos foram encontrados no *Amaranthus hypochondriacus* por SILVA-SÁNCHES (2008) em análise por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa (LC-MS-MS).

O peptídeo bioativo lunasina foi detectado por ELISA nos extratos protéicos do grão de *Amaranthus hypochondriacus*, que continham cerca de 11,1 µg de lunasina por grama de proteína (SILVA-SÁNCHES, 2008). Este peptídeo com 43 aminoácidos promoveu ação na prevenção de câncer em modelo de cultura de células mamárias e em câncer de pele de ratos (de LUMEN, 2005; JEONG, 2002).

Análise por LC-MS-MS da fração glutelina digerida com tripsina resultou em 508 peptídeos bioativos (SILVA-SÁNCHES, 2008). O perfil peptídico (Quadro 3) inclui as atividades inibição enzimática (WIEDEMAN, 2003), anti-hipertensiva (AOYAGI, 2006), ativação da via proteolítica da Ubiquitina-Proteassoma (TURNER, 2000), antitrombótica e antiamnéstica (ASHMARIN, 1998), opióide (MULLALLY, 1996), imunomodulatória (KAYSER, 1996), antioxidante (CHEN, 1998), ligante (SLEIGH, 1997), neuropeptídica (CALIENDO, 1996), imunoestimulatória (BERTHOU, 1987), embriotóxica (CHAMBERS, 1995), anoréctica (ASHMARIN, 1998), e antiinflamatória (SILVA-SÁNCHES, 2008).

Ainda não há relatos na literatura sobre a presença de peptídeos hipocolesterolemizantes no amaranto e, apesar do destacado efeito, os mecanismos que propiciam essa propriedade ainda não foram elucidados (DAVIGNON e col., 1992).

Quadro 3 - Peptídeos bioativos identificados por LC-MS-MS em produto de digestão com tripsina da fração glutelina do amaranto.

Atividade	Sequências com atividade biológica	Descrição
Inibidor enzimático	AP, FA, FP, GP, GPR, GQ HA, IPI, KA, LA, LL, LP, MA, MP, PA, PP, PPLP, PPPA, VA, VP, VPL, VV	inibe a dipeptidil-aminopeptidase IV
Anti-hipertensivo	AAP, AIP, ALPP, AVP, AY, FNQ, FP, FQP, FY, GGY, GKP, GRP, GY, HIR, HY, IKP, ILP, IR, IRA, IY, LAA, LAMA, LAY, LF, LLP, LNP, LPP, LQP, LQQ, LRP, LSP, LVL, LVR, LW, LY, MF, MY, PLP, PQR, PR, PRY, RF, Rl, RY, TAP, VAA, VAY, VF, VLP, VPP, VRP, VSP, VW, VY, VYP, YG, YGGY, YL, YP	inibe a enzima conversora de angiotensina I
Ativador da via proteolítica da ubiquitina-proteassoma	LA, RA, WA	ativa a proteólise da ubiquitina-proteassoma
Regulador	DY, GFL, GLY, GP, LGY, PG, PGP	estimula células fagocíticas na defesa do organismo contra infecções
Antitrombótico	PPG, PG, GP	envolvido na homeostase da mucosa gástrica e no potencia anticoagulante e fibrinolítico do plasma
Antiamnéstico	PPG, PG, GP	potencializa o processo da consolidação da memória no sistema nervoso central
Opióide	NAGA, GYY, PLG, YG, YL, YPF	age como analgésico
Imunomodulador	EAE, GFL, KRP, TKPR, YG, YGG	age como imunopotenciador
Antioxidante	HH, HL, LH, LHH	oferece proteção contra peroxidação em células
Ligante	KK	age no sistema de transporte de oligopeptídeos
Neuropeptídeo	KPS	possui atividade antinociceptiva
Imunoestimulador	KEEAE, LGY, LLY	estimula células fagocíticas na defesa do organismo contra infecções
Embriotóxico	RGD	possui atividade embriotóxica
Anoréctico	PGP	inibe a secreção de insulina
Antiinflamatório	DTEAR	

Fonte: SILVA-SÁNCHEZ e col., 2008.

2 - Justificativa

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 para futura disseminação do seu uso pela população. Um ingrediente protéico com capacidade hipocolesterolemizante comprovada a ser incorporado em alimentos tradicionais é importante, não só do ponto de vista nutricional, mas também do ponto de vista de promoção da saúde, pois poderá reduzir a exposição da população a um fator de risco de doenças cardiovasculares.

A verificação da ocorrência de peptídeos hipocolesterolemizantes na sua digestão incompleta é etapa que precede o incentivo à introdução do amaranto na alimentação humana e a elucidação dos mecanismos pelos quais o amaranto e o isolado protéico promovem a redução do colesterol plasmático.

Pesquisas com peptídeos bioativos estão apenas em seu início, e como primeira etapa no estudo é essencial a compreensão da relação entre estrutura e função. As bases de dados que estão sendo desenvolvidas revelam a seqüência de aminoácidos e função do peptídeo, e podem ser preditoras dos efeitos de novas moléculas e suas atividades biológicas. Considerando-se a diversidade e a complexidade das seqüências protéicas, 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.

3 - Objetivos

3.1 Objetivo geral

Verificar a ocorrência de peptídeos hipocolesterolemizantes no isolado protéico do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria).

3.2 Objetivos específicos

- Obter o isolado protéico do grão de amaranto;
- Avaliar a composição química e propriedade funcional das farinhas integral e desengordurada e do isolado protéico para averiguar possíveis modificações estruturais ocasionadas pelos processamentos;
- Verificar a eficácia da digestão enzimática *in vitro* do isolado protéico, analisar fatores interferentes na digestão e as diferenças nos perfis protéicos resultantes deste processo;
- Separar e identificar, se existentes, os fragmentos peptídicos IAEK, VPDPR, IAVP e LPYPR.

4 - Materiais e Métodos

4.1 Amostra

O grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria) foi obtido da Embrapa Cerrados (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 ^{o}C até posterior utilização.

4.2 Desengorduramento da farinha

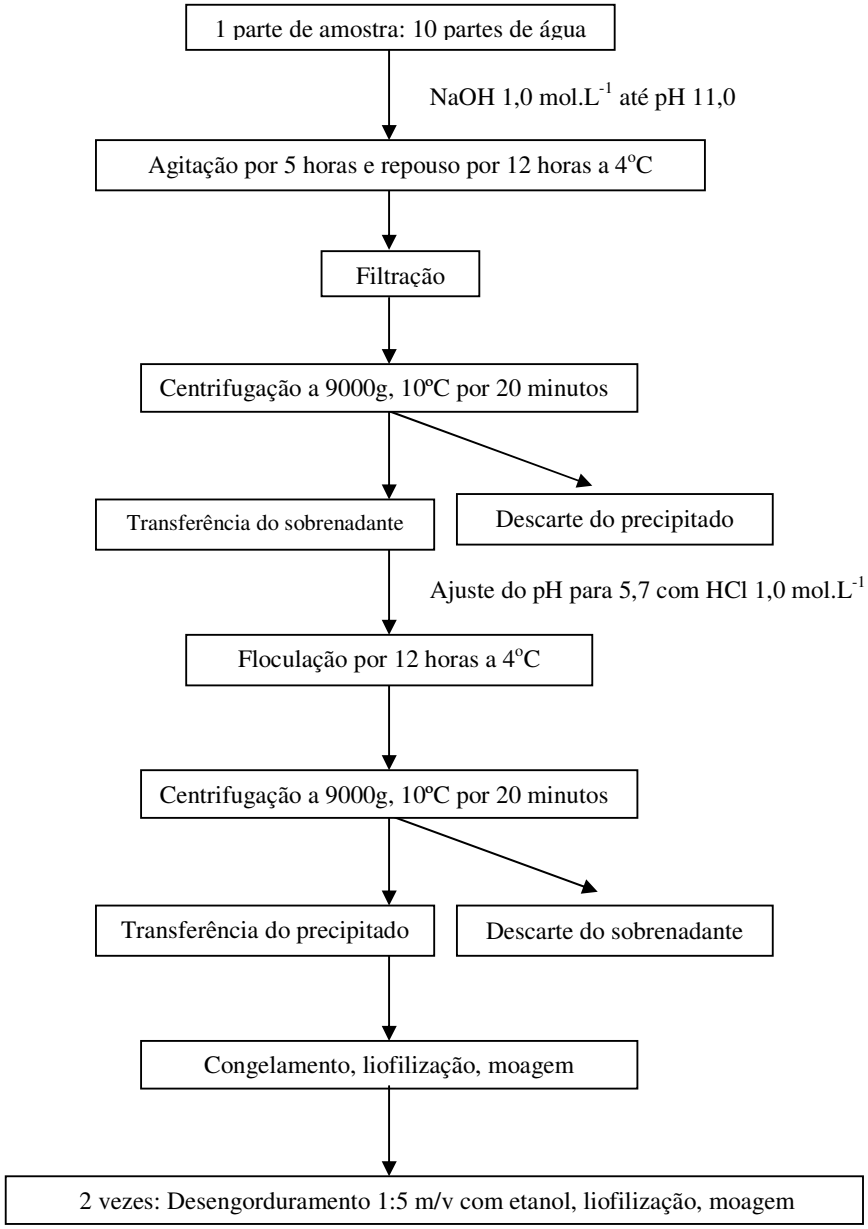
A farinha do grão de amaranto foi desengordurada com hexano PA na proporção 1:5 (m/v), de acordo com metodologia de MARTÍNEZ e AÑÓN (1996). A mistura foi agitada por 4 horas a velocidade de 1730 rpm com o auxílio de uma haste acoplada a um motor *Kohlbach.* Após decantação seguiu-se a filtração em papel filtro qualitativo e, posteriormente, a secagem em estufa a 45 ^{o}C para evaporação total do solvente. A farinha desengordurada foi peneirada em tamiz 0,42 mm (Granutest – Brasil) e armazenada a 4 ^{o}C.

4.3 Obtenção do isolado protéico

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 por 5 horas a temperatura ambiente e permaneceu em repouso por 12 horas a 4 ^{o}C. Posteriormente a mistura de pH 11 foi filtrada e centrifugada a 9000 g por 20 min a 10 ^{o}C (Figura 5).

Figura 5 - Fluxograma de obtenção do isolado protéico do grão de amaranto.



Após novo ajuste do pH do sobrenadante a 5,7 com HCl 1 mol.L^{-1}, o homogenato permaneceu por doze horas à 4 ºC. Uma nova centrifugação a 9000 g foi realizada e o precipitado foi congelado. As etapas de liofilização, moagem e desengorduramento com etanol 99% na proporção 1:5 m/v por 24 horas foram realizadas duas vezes. Após obtenção do isolado protéico este foi liofilizado e triturado em moedor de café (Cadence MDR301 – Brasil).

4.4 Caracterização das farinhas e do isolado protéico

4.4.1 Composição centesimal

A farinha integral, a farinha desengordurada e o isolado protéico de amaranto foram analisados quanto ao conteúdo de umidade, por dissecação a 105 ^{o}C; de cinzas, por incineração da matéria orgânica a 550 ^{o}C; e de lipídios, por extração a quente com éter de petróleo, de acordo com metodologias descritas pela AOAC (1995). Os carboidratos totais foram determinados por diferença.

Para a análise de proteínas foi utilizado o método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1995), os fatores de conversão de nitrogênio em proteína utilizados foram 5,85 para as farinhas e 6,12 para o isolado protéico, valores obtidos por cálculo de acordo com o perfil de aminoácidos das farinhas e do isolado protéico previamente analisados (SOSULSKY e IMAFIDON, 1990; MENDONÇA, 2006).

As análises foram realizadas em triplicata.

4.4.2 Perfil de aminoácidos totais

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 ^{o}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 alto peso molecular e lipídios, 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), sendo coletados os dois últimos mililitros. O ácido clorídrico foi removido de 20 µL da fração coletada por vácuo à temperatura ambiente, 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:l: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 ^{o}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.

4.4.3 Solubilidade

A solubilidade 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

K_2HPO_4 e 2,6 mmol.L^{-1} de KH_2PO_4, pH 7,5, e 0,4 mol.L^{-1} de NaCl) ou tampão B (33,3 mmol.L^{-1} de K_2HPO_4 e 1,7 mmol.L^{-1} de KH_2PO_4, pH 8,5). As amostras foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos à temperatura ambiente (SCILINGO e col., 2002).

Dez mililitros dos sobrenadantes das farinhas e dois mililitros dos sobrenadantes do isolado protéico foram coletados para quantificação das proteínas solúveis. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995) e a solubilidade em cada solvente foi calculada pela fórmula:

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

A solubilidade foi analisada em triplicata.

4.5 Digestão *in vitro*

A digestão *in vitro* do isolado protéico foi realizada empregando-se dois métodos enzimáticos: um contendo pepsina e tripsina em conjunto com pancreatina (QIAO, 2001) e o outro com as enzimas tripsina, quimiotripsina e peptidases (HSU e col., 1977).

Ambas as digestões foram realizadas em triplicata.

4.5.1 Método A

A metodologia desenvolvida por QIAO (2001) visa maximizar a hidrólise das ligações peptídicas com uma quantidade mínima de enzimas. Foi realizada em duas etapas e toda a incubação foi conduzida a 38 ^{o}C sob agitação. Na primeira etapa, em tubos tipo Falcon de 50 mL, para 200 mg de proteína foi utilizada 120 U de pepsina/mL (Sigma P-7012), ou 0,25% de proteína de enzima relativa ao substrato protéico, para digerir o substrato protéico em 16 mL de solução de tampão citrato (pH 2) por 24 horas.

Na segunda etapa foi adicionada uma solução de tampão fosfato, o pH foi ajustado para 8,0 e o volume para 40 mL com adição de tripsina (Sigma T-0303) enriquecida com pancreatina (Sigma P-7545) com atividade equivalente a pelo menos três U.S. Pharmacopeia/mL, ou 7,5% de proteína de enzima por substrato protéico, concentração final de substrato 5 mg/mL. A digestão desta etapa ocorrereu por 96 horas. O tempo de incubação correspondeu ao necessário para a perda de mais de 95% da atividade das enzimas a fim de maximizar sua eficácia, permitindo o mínimo de uso quanto à quantidade.

4.5.2 Método B

Segundo o método de HSU e colaboradores (1977) foram adicionados, em tubos tipo Falcon de 50 mL, 250 mg de proteína e um sistema multienzimático que consiste de 5,16 mg de tripsina (Sigma T-0303) com 17600 U/mg de proteína,

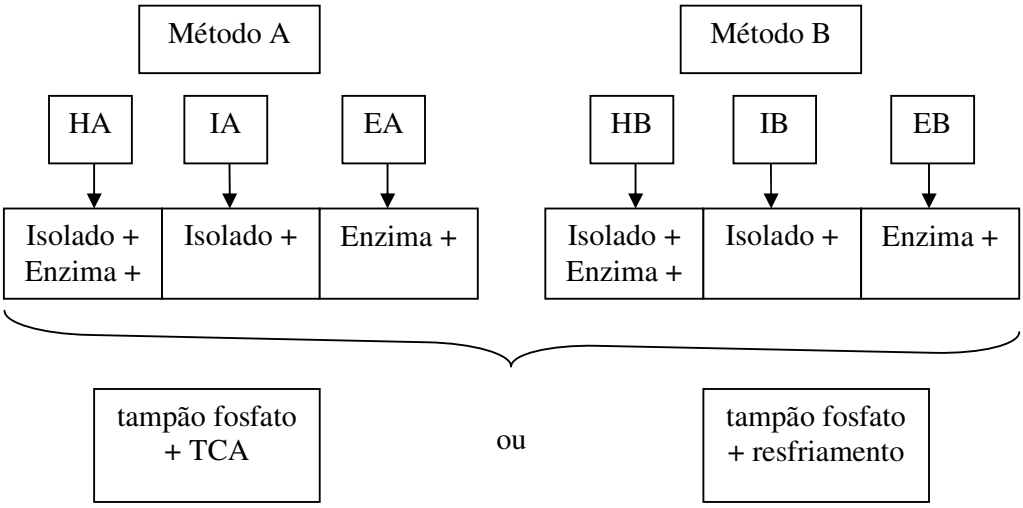
13,76 mg de α-quimotripsina (Sigma C-4129) com 54 U/mg de proteína e 1,28 mg de peptidase (Sigma P7500) com 102 U/g de sólidos.

A solução multienzimática mantida em gelo no tampão pH 8,0 foi adicionada ao isolado protéico juntamente com 20 mL de tampão, o pH foi ajustado a 8,0, o volume completado para 40mL e as amostras incubadas a 37 ^{o}C sob agitação. A mistura foi mantida a esta temperatura por dez minutos.

Aos hidrolisados do método A (HA), hidrolisados do método B (HB), tubos contendo somente tampão e isolado protéico do método A ou do método B (IA ou IB) e tubos contendo somente tampão e enzima do método A ou do método B (EA ou EB), foram adicionados 9,6 mg de azida sódica a fim de evitar a proliferação de microrganismos (QIAO, 2001). IA, IB, EA e EB sofreram as mesmas condições dos dois métodos de digestão para que fossem deduzidos destes o perfil e o teor protéicos em relação aos hidrolisados (Figura 6).

Ambos os métodos de digestão enzimática foram interrompidos de duas formas distintas: pela adição de ácido tricloroacético (TCA) na concentração final 19% m/v e consequente precipitação da proteína não digerida, ou resfriamento das amostras hidrolisadas a -18 ^{o}C (LOURENÇO, 2000).

Figura 6 - Esquema de digestão das amostras, seus controles e métodos de interrupção da digestão.



Após interrupção da digestão, as amostras foram centrifugadas a 1150 g por 15 minutos, a 4 ^{o}C para a amostra resfriada e a temperatura ambiente para a acidificada. Os sobrenadantes foram separados para posteriores análises. Os precipitados foram liofilizados para também serem utilizados posteriormente.

4.6 Grau de hidrólise

BUCHMANN (1979) aplicou o método de adição em TCA em amostras de cevada e outros cereais. O método empregado propôs uma boa correlação com os valores encontrados por SAUNDERS e colaboradores (1973) em cereais e com valores obtidos *in vivo.* O grau de hidrólise obtido pelos métodos A e B foi expresso como solubilidade da proteína em TCA de acordo com modificações de ADLER-NISSEN (1986).

As proteínas solúveis em TCA dos hidrolisados HA ou HB foram descontadas das proteínas solúveis em TCA de IA+EA ou IB+EB. O teor protéico foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995) analisando-se 10 mL dos sobrenadantes.

Todas as análises foram efetuadas em triplicata. O grau de hidrólise (*%GH*) segue a seguinte equação:

$$\%GH\ de\ A\ ou\ B = \frac{100 \times (TCA - (IE))}{proteína\ total}$$

Em que TCA = HA ou HB em TCA e IE = IA+EA ou IB+EB em TCA

A mesma metodologia foi realizada para HA e HB cuja digestão foi interrompida por resfriamento para fins de comparação de solubilidade dos fragmentos protéicos em tampão em relação aos solúveis em tampão somado ao TCA.

4.7 Teores de sulfidrilas livres e ligações dissulfeto

Foram determinados segundo metodologia descrita por BEVERIDGE e colaboradores (1974) com modificações de HARDHAM (1981) os teores de sulfidrilas livres e de ligações dissulfeto tanto do isolado protéico quanto dos sobrenadantes e dos precipitados dos métodos A e B cuja digestão foi interrompida por resfriamento.

Para a determinação da quantidade de sulfidrilas livres contida nas amostras, foram utilizados 50 mg de isolado protéico, 7,5 mg de proteína do precipitado HA, 5,0 mg de proteína do precipitado HB, 5 mL de sobrenadante de HA (22,2 mg de proteína) ou 5 mL (29,6 mg de proteína). Estas foram homogeneizadas durante 3 minutos com tampão Tris-Glicina pH 8,0 contendo uréia 8 $mol.L^{-1}$ e dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,5% em vortex (Marconi MA162 - Brasil), volume final da solução 10 mL.

As amostras foram deixadas em repouso por 3 horas, sendo adicionado posteriormente 100 µL de reagente de Ellman, que contém 4 mg de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) em 1 mL de tampão Tris-Glicina pH 8,0. Após repouso de 15 minutos, as amostras foram filtradas em membrana filtrante de 0,45 µm e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV1650PC (Shimadzu - Japão) a 412 nm. Foi utilizada a equação de Lambert-Beer, a seguir:

$$A = \varepsilon.b.c$$

Em que A= absorbância obtida em espectrofotômetro; ε = 13600, coeficiente de absortividade molar do grupo tiol; b = 1 cm (caminho óptico percorrido, dimensão da cubeta); c = concentração em $mol.L^{-1}$. Peso molar de SH = 33 g.

A obtenção dos valores de ligações dissulfeto foi realizada de forma indireta. O cálculo envolve a leitura da absorbância de meia cistina, conforme descrito abaixo.

As mesmas quantidades de amostra e tampão utilizados anteriormente foram homogeneizadas por 3 minutos com o tampão Tris-Glicina pH 8,0 contendo uréia 8 mol.L^{-1}, SDS 0,5 % e 2-mercaptoetanol 1 % v/v, volume final da solução 10 mL. As amostras foram deixadas em repouso por 3 horas. Foram adicionados 10 mL de TCA 16 % em cada amostra, os tubos foram deixados em repouso por 1 hora e centrifugados por 10 minutos a 3330 g. O sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi lavado duas vezes com 10 mL de TCA 8%. Após essas etapas o precipitado foi submetido à análise de sulfidrilas livres descrita acima.

Para determinar o teor de ligações dissulfeto desconta-se o teor de sulfidrilas livres do teor de meia cistina dividindo o resultado por dois, de acordo com equação abaixo:

$$\textit{número de ligações dissulfeto} = \frac{(\textit{meia cistina} - \textit{sulfidrilas livres totais})}{2}$$

4.8 Eletroforese SDS-PAGE

O perfil eletroforético visou à comparação dos perfis de peso molecular da farinha do grão integral, da farinha desengordurada, do isolado protéico e dos precipitados de IA, IB, HA e HB, todos contendo TCA, e do padrão de eletroforese Kaleidoscope Prestained (BioRad 161-0324).

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada de acordo com metodologia proposta por LAEMMLI (1970) em condições não redutoras e redutoras (adição à amostra de

2-mercaptoetanol). O gel concentrador contendo 4% m/v de acrilamida em tampão TRIS-HCl pH 6,8 foi preparado sobre o gel de análise com 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) o modelo Hoefer miniVE conferiu ao gel dimensões de 8 cm x 9 cm x 1,0mm. Cinqüenta 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 determinados os pesos moleculares das frações protéicas por comparação aos padrões de peso molecular, a similaridade entre as amostras e a densidade óptica das bandas.

4.9 Síntese de peptídeos hipocolesterolemizantes

Os peptídeos hipocolesterolemizantes de interesse foram sintetizados para servirem de padrão de tempo de retenção na coluna cromatográfica bem como padrão de fragmentação no espectrômetro de massas. Os peptídeos com seqüência IAEK e IAVP foram sintetizados com C-terminal amidado e N-terminal livre. O fragmento LPYPR foi sintetizado com C-terminal livre e N-terminal livre e o fragmento VPDPR foi sintetizado nas duas formas anteriores. Isso ocorreu porque foi requerida a síntese de todos os fragmentos com ambas as extremidades livres, porém, devido à dificuldade em se sintetizar tais fragmentos, um deles (VPDPR) foi

entregue nas formas para que fosse verificado se o tempo de retenção e o padrão de fragmentação eram distintos.

A síntese foi realizada pelo Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; a pureza dos peptídeos foi de, pelo menos, 95%.

4.10 Separação das frações peptídicas

Cinqüenta microlitros dos sobrenadantes das amostras HA e HB, cuja hidrólise foi interompida por adição de TCA ou resfriamento, foram adicionados sobre membrana hidrofílica que permite permeação de moléculas de até 3000 Da. Para isso as amostras foram centrifugadas a 14000 g por 100 minutos a temperatura ambiente.

Do permeato com pesos moleculares abaixo de 3000 Da foi realizada cromatografia líquida de alta eficiência para separação e coleta das frações que poderiam conter os fragmentos peptídicos de interesse.

Foi utilizado o cromatógrafo líquido (Shimadzu – Japão) com controlador LC10AT, bomba DGU-14A acoplada a injetor manual Rheodyne e detector UV/vis com arranjo de diodos SPD-M10A VP. As ligações peptídicas foram detectadas a 220 nm e os peptídeos que continham anel benzênico foram monitorados a 280 nm. O software utilizado foi o Class VP.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa C18 Atlantis de 250 × 0,46 mm e partículas de 5 µm (Waters – Irlanda). O volume de injeção foi de 20 µL, o gradiente da fase móvel estabelecido foi: solvente A 98,925% de água, 0,075% de TFA e 1,000% de acetonitrila (v/v); solvente B 69,935% de acetonitrila, 30,00% de água e 0,065% de TFA (v/v). Após equilíbrio da coluna por 30 minutos com 100% de tampão A, os peptídeos foram eluídos em gradiente linear de 0 a 100% de tampão B. O fluxo foi isocrático, em 0,5 $mL.min^{-1}$. O gradiente foi selecionado baseado na solubilidade dos diferentes peptídeos (SWERGOLD e RUBIN 1983; VIJAYALAKSHMI e col.,1986).

Os tempos de retenção e de coleta das frações de interesse das amostras foram baseados na resposta obtida através de injeção dos peptídeos sintetizados (item 4.9). Os peptídeos foram solubilizados nas mesmas fases das amostras (tampão com e sem TCA) e injetados, submetidos ao mesmo gradiente de fase móvel das amostras. O volume do flow cell do detector (10 µL) foi somado ao volume do cano de saída do detector de 750 x 0,5 mm (147 µL), resultando em atraso de 18 s desde a detecção até a saída para coleta das frações.

Os peptídeos sintéticos foram coletados e reinjetados para confirmação do tempo de atraso de saída a partir da detecção. O tempo total de coleta de cada fração foi de 90 s, a fim de garantir a coleta total das substâncias de interesse.

4.11 Identificação de peptídeos por espectrometria de massas

Após coleta das alíquotas de interesse tanto das amostras quanto do padrão estas foram evaporadas em N_2 e redissolvidas em 200 µL de fase móvel com mistura dos solventes A e B correspondente ao tempo de retenção de cada fração. A seguir, 3 µL foram adicionados a copos de vidro (DIP sample cup 119329-0001), estes foram totalmente secos a 60°C e inseridos no detector PolarisQ (Thermo Finnigan – Estados Unidos).

Os analitos foram introduzidos através de probe de inserção direta de amostras sólidas (Direct Probe - DIP Controller). O probe foi programado para manter a temperatura a 60 °C por 30 s, aquecer de 60 a 250 °C a 150 °C/min, e esta temperatura foi mantida por 30 s para total dessorção térmica dos analitos, resultado em corrida de 2,7 min.

A fragmentação por ionização por elétrons (EI) ocorreu à energia de 70 eV em fonte de íons a 200 °C. Os íons positivos foram conduzidos à armadilha de íons (ion trap) a uma pressão a cerca de 45 mTorr.

Apesar da separação prévia dos peptídeos das amostras por cromatografia líquida, a separação total de uma matriz complexa como produto de digestão protéica requer um modo de detcção que, ao mesmo tempo, seja sensível e seletivo. Após injeção dos padrões em Full Scan com varredura de relação m/z 100 a 800 para verificação dos principais fragmentos resultantes, o modo SIM, que analisa os espectros de acordo com as abundâncias relativas das massas selecionadas, foi escolhido para comparação dos fragmentos de interesse das amostras e dos padrões,

evitando que interferentes com m/z abundates nas amostras dificultassem a visualização das massas de interesse.

O padrão de fragmentação dos peptídeos sintetizados foi adicionado ao banco de aquisição de dados XCALIBUR e à biblioteca NIST para comparação com os espectros de massa das amostras. Massas com similaridades em abundância na relação m/z acima de 70% foram consideradas como contidas na substância de interesse.

4.12 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 protéico

5.1.1 Composição centesimal

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

Tabela 1 - Composição centesimal (em base seca) das amostras analisadas.

Amostra	Umidade (g/100g)	Cinzas (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Lipídeos (g/100g)	Carboidratos* (g/100g)
Farinha integral	9,31 (0,23)	3,09 (0,07)	15,67 (0,17)	8,65 (0,01)	72,59
Farinha desengordurada	11,09 (0,04)	3,38 (0,05)	16,97 (0,41)	0,98 (0,01)	78,67
Isolado protéico	3,04 (0,10)	0,95 (0,03)	92,15 (2,07)	5,35 (0,70)	1,55

Resultados das triplicatas expressos em média (desvio padrão).
* calculados por diferença.

Ao final do desengorduramento com hexano foi constatada a quase total remoção dos lipídios presentes na farinha integral. Apesar disso, o desengorduramento final do isolado protéico com etanol foi etapa essencial, pois previamente foi encontrado teor de 86,6% de proteína na amostra em base seca. Alguns estudos consideram isolado protéico a farinha de amaranto que contém cerca de 80 a 85% de proteínas (SALCEDO-CHÁVEZ e col., 2002; SCILINGO e col.,

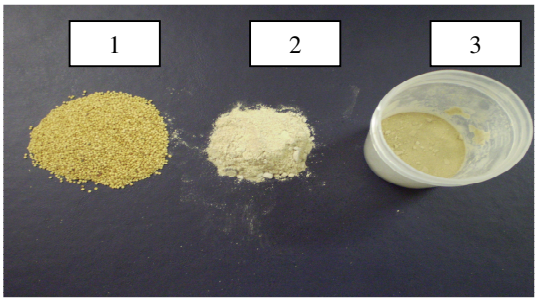
2002). A concentração mínima de proteína preconizada para o isolado protéico de soja é 88% (ABIA, 1991).

O etanol permitiu a extração de lipídios mais polares, não solúveis em hexano à temperatura ambiente. Todavia o etanol é solvente de algumas frações protéicas do amaranto, preferencialmente prolaminas (GORINSTEIN e col., 1991). Embora essa fração solúvel seja pequena no amaranto comparado a outros cereais (BRESSANI e GARCIA-VELA, 1990; GORINSTEIN e col., 1991) testes para verificação de possível extração de frações protéicas durante os processamentos foram realizados posteriormente e estão relatados nos itens 5.1.3, 5.1.4 e 5.4.

5.1.2 Rendimento do isolamento protéico

Foram utilizados 2000 g de farinha de amaranto desengordurada para a obtenção de cerca de 100 g de isolado protéico liofilizado e desengordurado. A foto do grão integral, da farinha desengordurada e do isolado protéico encontram-se na figura 7.

Figura 7 - Foto do grão de amaranto (1), da farinha desengordurada (2) e do isolado protéico (3).



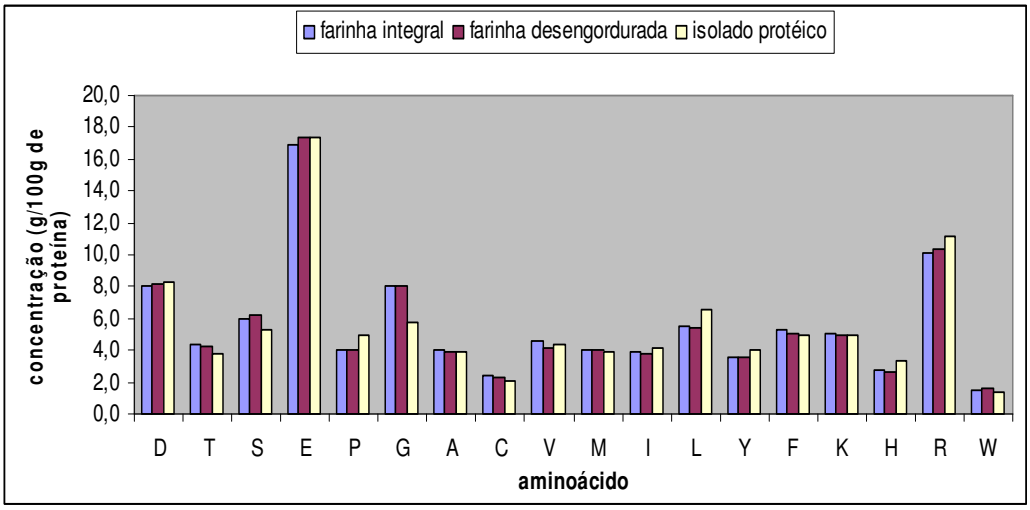
O teor de proteínas encontrado no grão de amaranto integral e, principalmente, na farinha desengordurada (tabela 1) é considerado alto em relação a outros cereais (TEUTÔNICO e KNORR, 1985; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989). Apesar disso, o rendimento do isolamento protéico foi de apenas 29,5%. A dificuldade no isolamento de proteínas é devida às características estruturais do grão de amaranto.

O método de isolamento realizado é o melhor dentre os testados por MENDONÇA (2006), que encontrou pureza protéica de cerca de 96% em base seca. MARTÍNEZ e AÑÓN (1996) obtiveram, através de testes com vários pHs de solubilização e precipitação, concentrações protéicas em isolados de amaranto de 80 a 90%. SALCEDO-CHÁVEZ e colaboradores (2002) realizaram estudo de otimização do método de precipitação isoelétrica para obtenção de isolados protéicos de *Amaranthus cruentus*, a maior concentração protéica foi 83,4%, obtida com pH 9,0 de extração e 4,5 de precipitação. Estes autores não utilizaram pH acima de 9,2.

5.1.3 Perfil de aminoácidos totais

A composição de aminoácidos totais das amostras encontra-se no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Perfil de aminoácidos totais das farinhas integral e desengordurada e do isolado protéico. Os dados foram apresentados como grama de aminoácido por 100 gramas de proteína.



Houve pouca variação na composição aminoacídica das proteínas nas farinhas integral e desengordurada e no isolado protéico, com redução de cerca de 29% do teor de glicina e aumento de prolina em 20% e de lisina em 15% no isolado protéico em relação às farinhas (gráfico 1).

Destaca-se que não houve redução nas concentrações dos aminoácidos isoleucina, alanina, ácido glutâmico, lisina, valina, prolina, ácido aspártico, arginina, leucina e tirosina, que constituem os aminoácidos dos peptídeos de interesse (Tabela 2).

MENDONÇA (2006) encontrou valores próximos desses aminoácidos (Tabela 2) no isolamento protéico que promoveu a redução do colesterol plasmático em hamsters.

Tabela 2 - Perfil de aminoácidos totais do isolado protéico obtido neste trabalho e no isolado protéico de MENDONÇA (2006). Os dados estão apresentados como grama de aminoácido por 100 gramas de proteína.

Aminoácidos	**Concentração do aminoácido (g/100g de proteína)**	**Concentração do aminoácido (g/100g de proteína) MENDONÇA, 2006**
Isoleucina	4,6	4,1
Alanina	4,1	3,9
Ácido glutâmico	17,6	17,4
Lisina	5,3	4,9
Valina	5,1	4,3
Prolina	5,2	5,0
Ácido aspártico	8,4	8,3
Arginina	10,3	11,2
Leucina	7,0	6,5
Tirosina	3,9	4,0

Os teores de aminoácidos essenciais foram comparados aos requerimentos mínimos estabelecidos para crianças de 2 a 5 anos de idade (FAO/WHO, 1991) e o resultado da divisão dos aminoácidos essenciais das amostras pelos valores recomendados por FAO/WHO (1991) é denominado escore químico de aminoácidos (Tabela 3).

Tabela 3 - Recomendação de aminoácidos essenciais da FAO/WHO e escore químico de aminoácidos das farinhas e do isolado protéico.

Aminoácidos	Recomendação FAO/WHO (1991)	Escore da Farinha Integral	Escore da Farinha Desengordurada	Escore do Isolado protéico
Treonina	3,4	1,3	1,2	1,1
Metionina + cistina	2,5	2,5	2,5	2,4
Valina	3,5	1,3	1,2	1,2
Isoleucina	2,8	1,4	1,4	1,5
Leucina	6,6	0,8	0,8	1,0
Fenilalanina + Tiosina	6,3	1,4	1,4	1,4
Lisina	5,8	0,9	0,9	0,8
Histidina	1,9	1,5	1,4	1,7
Triptofano	1,1	1,4	1,4	1,3

Os teores dos aminoácidos essenciais praticamente não foram alterados pelo desengorduramento e pelo isolamento. Os escores químicos encontrados por MENDONÇA (2006) são próximos aos valores relatados neste trabalho, bem como a relação lisina/arginina (0,6 para a farinha integral e 0,5 para o isolado protéico de *Amaranthus cruentus*).

GORINSTEIN e colaboradores (2001) obtiveram o valor da relação de 0,5 para a farinha integral de *Amaranthus hypochondriacus*. Sugere-se que esse quociente seja um indicativo na redução de colesterol, pois quanto menor o valor, menor será a colesterolemia (SANCHEZ e col., 1988).

Os dados de escore químico apontam como aminoácidos limitantes a leucina, nas farinhas integral e desengordurada, e a lisina, nas três amostras analisadas. Dados de escore químico calculados por MENDONÇA (2006) citam apenas a leucina como

aminoácido limitante do amaranto, outros estudos corroboram com este resultado (BECKER e col., 1981; DUARTE-CORREA e col., 1986).

Porém, GORINSTEIN e colaboradores (2002) e DRZEWIECKI e colaboradores (2003) verificaram pelo escore químico que a lisina era o aminoácido limitante no amaranto. Estas diferenças provavelmente se devem às espécies analisadas, ao clima e nutrientes presentes no solo durante o cultivo do grão, ou ainda à metodologia utilizada pelos diversos autores.

5.1.4 Solubilidade

Os dados de solubilidade das farinhas e do isolado protéico encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 - Perfil de solubilidade em diferentes solventes nas farinhas integral, desengordurada e no isolado protéico.

Amostra	Solubilidade em água (g/100g)	Solubilidade no tampão A (g/100g)	Solubilidade no tampão B (g/100g)
Farinha integral	20,50 (0,97)bx	27,57 (0,93)cy	32,92 (1,52)az
Farinha desengordurada	21,31 (0,93)bx	34,37 (1,66)by	35,90 (1,41)by
Isolado protéico	3,51 (0,03)ax	20,58 (0,10)ay	30,00 (0,52)az

Resultados das triplicatas expressos como média (desvio padrão).
Na mesma coluna letras diferentes (a,b,c) representam diferença estatística.
Na mesma linha letras diferentes (x, y, z) representam diferença estatística.

De acordo com a tabela 4, verifica-se que a farinha integral e a farinha desengordurada foram mais solúveis em água que o isolado protéico. Isso provavelmente ocorreu pela perda de frações hidrossolúveis e, principalmente, pela formação de conglomerados protéicos durante o isolamento.

Em concentrados protéicos 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 protéico de *Amaranthus hypochondriacus* foi de cerca de 39%, utilizando-se pH 9 para solubilização e 5 para precipitação durante o isolamento (SCILINGO e col., 2002). Verifica-se que a capacidade de solubilização da proteína em água depende dos reagentes utilizados no isolamento por precipitação isoelétrica e de suas concentrações. A agregação ditada pelo balanço de forças entre as moléculas de proteína parcialmente denaturadas, de modo geral, depende do pH, o qual controla a carga líquida da proteína, e da força iônica, que limita as interações eletrostáticas (AYMARD e col., 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 (KAVANAGH e col., 2000; IKEDA e MORRIS, 2002).

Apesar da baixa solubilidade em água, a metodologia de isolamento foi mantida visando dar continuidade ao estudo de Mendonça (2006). Portanto, foi averiguada a solubilidade do isolado protéico em soluções salinas.

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.

Porém, após o isolamento protéico as amostras apresentaram, comparadas à farinha integral, a mesma solubilidade em tampão B e tornaram-se menos solúveis em tampão A, da mesma forma como ocorreu em solução aquosa. As causas podem ser a formação de agregados protéicos insolúveis nos tampões ou o efeito da fração lipídica residual, que dificultariam a solubilização tal qual ocorre em meio aquoso. Muito embora as proteínas sejam o principal componente em um isolado protéico, sua natureza heterogênea pode facilitar a interação entre proteínas ou entre outros componentes, modificando sua carga e hidrofobicidade (CONDE e col., 2005).

Os resultados indicam que o desengorduramento e o isolamento protéico podem promover modificações nas estruturas terciária e quaternária das proteínas, admitindo maior ou menor disponibilidade à hidrólise enzimática.

Para todas as amostras analisadas, a quantidade de proteínas solúveis em água foi menor que nos tampões. Apenas a farinha desengordurada solúvel em tampão A não apresenta diferença em relação à solubilidade em tampão B. Para as outras amostras a solubilidade das proteínas no tampão B foi maior que no tampão A.

O tampão A é o melhor solvente para a globulina 11S e albuminas e o tampão B para algumas frações das globulinas-P, majoritárias quanto à solubilidade na

farinha integral e no isolado protéico. SCILINGO e colaboradores (2002), da mesma forma, encontraram para o isolado protéico os maiores valores de solubilidade no tampão B (75%), seguido pelo tampão A (61%), e baixa solubilidade protéica em água, explicado pela presença de uma quantidade significativa de globulinas, que são insolúveis nesse meio. Desta forma, optou-se por utilizar um meio salino durante a digestão enzimática, que, além de tamponar o meio aquoso, ainda permite que as enzimas acessem os sítios de clivagem das proteínas mais facilmente.

A solubilidade também depende, ao menos parcialmente, do peso molecular das substâncias que compõem a amostra. Desta forma, foi realizada a caracterização molecular das amostras e de uma de suas ligações de maior ocorrência, os resultados encontram-se nos itens 5.3 e 5.4.

5.2 Grau de hidrólise

Visando a utilização posterior das amostras, 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 baixo peso molecular.

As triplicatas de HA apresentaram média de 71,14 ± 2,18 g/100g de proteína e as triplicata de HB foram em média 54,83 ± 0,63 g/100g de proteína. Os menores valores encontrados para HB não estão relacionados ao tempo de digestão, apesar deste ser maior para HA. Testes prévios foram realizados e foi verificado que o grau

de hidrólise não é alterado após dez minutos de digestão, corroborando com o preconizado por HSU e colaboradores (1977). Estes autores obtiveram os valores de digestibilidade *in vitro* de 92 g/100g de proteína para caseína e 78 g/100g de proteína para o isolado protéico de soja.

Provavelmente, para o isolado protéico de amaranto, as enzimas utilizadas no método A foram mais eficientes na clivagem de ligações peptídicas que as enzimas do método B. Em estudo de SETHI e KULKARNI (1993) o isolado protéico de soja hidrolisado com pepsina ou pancreatina apresentou digestibilidade *in vitro* entre 71-76 g/100g de proteína, constatando-se que há diferença na liberação de nitrogênio solúvel em TCA dependendo da enzima utilizada. SCILINGO e colaboradores (2002) em isolado protéico de amaranto verificaram que foi atingido maior grau de hidrólise com a enzima papaína, mesmo esta apresentando menor atividade enzimática que a enzima cucurbita.

Foram analisados ainda os conteúdos protéicos dos sobrenadantes obtidos pelo método do resfriamento, sem adição de TCA. A média das proteínas solúveis em HA cuja digestão foi interrompida por resfriamento foi de 89,80 ± 0,96 g/100g de proteína e a média de HB foi 95,06 ± 1,17 g/100g de proteína. A divergência de valores provavelmente se deve não só às enzimas envolvidas em cada método, como também às concentrações salinas, resultando em diferentes forças iônicas para cada método (GUEGUEN e col., 1988; CASTELLANI e col., 1998).

Os resultados mais elevados dos produtos solúveis no resfriamento em relação aos produtos solúveis em TCA eram esperados, já que proteínas são mais

insolúveis quando presentes em baixo pH, apesar do aumento da força iônica proporcionado pela adição desse ácido. Apesar disso, a solubilidade das amostras é elevada pelo aumento da concentração de frações de baixo peso molecular (CONDE e col., 2005), mesmo em um meio onde o pH foi reduzido pela adição de TCA. A dissociação de agregados protéicos insolúveis promove a exposição de grupos hidrofílicos e facilita a interação de aminoácidos hidrofílicos com o ambiente aquoso, aumentando a solvatação das moléculas (MANNHEIM e CHERYAN, 1992; QI e col., 1997).

As solubilidades de IA em TCA e IB em TCA foram cerca de 6 g/100g de proteína e 4 g/100g de proteína, respectivamente. A solubilidade de IA resfriada foi de 3 g/100g de proteína e de IB resfriada foi de 31 g/100g de proteína. Pelas diferenças dos valores de solubilidade entre IA e HA e IB e HB verificou-se que ambas as hidrólises provavelmente promoveram redução no tamanho molecular de grande parte das cadeias protéicas, de forma que elas se tornam mais solúveis (GILL e col., 1996).

São diversos os agentes que influenciam na digestibilidade protéica. Algumas proteínas, como as prolaminas, são hidrofóbicas, e enzimas proteolíticas atuam em ambiente aquoso. Esta característica dificulta sua ação nos sítios de clivagem. (GUO e col., 2007)

Os fatores antinutricionais, grandes responsáveis pela baixa digestibilidade protéica, são em grande parte eliminados durante o processo de isolamento, aumentando o grau de digestibilidade das proteínas vegetais (PAREDES-LÓPEZ e

col., 1994). SETHI e KULKARNI (1993) verificaram que a porcentagem de protéina digerida do isolado de soja (76%) foi maior que da amostra integral (25%). Isto pode ser atribuído à ação facilitada das enzimas no isolado comparado à sua forma integral.

Além da remoção de fatores antinutricionais, GUO e colaboradores (2007) verificaram que o tratamento com 2-mercaptoetanol aumentou a digestibilidade *in vitro* com pepsina da fração prolamina do trigo devido à clivagem das ligações dissulfeto. Assim, essas ligações inter e intra-protéicas também influenciam na digestão e em seus produtos.

É importante ressaltar que, além do grau de digestibilidade, a liberação dos fragmentos peptídicos de interesse provenientes de proteínas alimentares durante a digestão *in vitro* e no trato gastrointestinal é importante em se tratando do estudo de peptídeos bioativos (PELLEGRINI, 2003). Sugere-se a verificação de diferentes solventes e metodologias de digestão na tentativa de liberar os peptídeos hipocolesterolemizantes investigados. Estudos devem ser realizados no sentido de averiguar se os produtos da digestão *in vitro* mimetizam, ainda, o que ocorre *in vivo*.

5.3 Teores de sulfidrilas livres e ligações dissulfeto

Pelo fato de que a análise de ligações dissulfeto envolve a adição de TCA para precipitação de proteínas de alto peso molecular e posterior remoção deste ácido

foi realizada análise apenas nas amostras cuja digestão foi interrompida por resfriamento.

Os resultados da concentração do grupo tiol ou sulfidrila (-SH) do aminoácido cisteína e das ligações dissulfeto (-SS) resultantes da ligação de 2 moléculas de cisteína pela oxidação de seus radicais sulfidrila encontram-se nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Teores dos grupos sulfidrila livre e ligações dissulfeto nos sobrenadantes resfriados dos hidrolisados.

Amostra	**-SH (µmol/g de proteína)**	**-SS (µmol/g de proteína)**
Sobrenadante HA	0,89 (0,04) a	1,20 (0,08) b
Sobrenadante HB	5,27 (0,42) b	0,90 (0,07) a

Resultados das triplicatas expressos como média (desvio padrão).
Na mesma coluna letras diferentes (a,b) representam diferença estatística.

Tabela 6 - Teores dos grupos sulfidrila livre e ligações dissulfeto nos precipitados resfriados dos hidrolisados.

Amostra	**-SH (µmol/g de proteína)**	**-SS (µmol/g de proteína)**
Precipitado HA	11,29 (0,36) b	29,42 (0,51) a
Precipitado HB	3,95 (0,51) a	62,78 (3,68) b

Resultados das triplicatas expressos como média (desvio padrão).
Na mesma coluna letras diferentes (a,b) representam diferença estatística.

A amostra HA, digerida pelo método que apresentou maior grau de digestibilidade, apresenta os maiores valores de -SH e os menores valores de -SS no precipitado. Estes resultados corroboram com a premissa de que o menor número de ligações dissulfeto indicam um menor número de conformações das estruturas terciária e quaternária, diferença ocasionada pela digestibilidade protéica (GUO e col., 2007). O menor grau de proteólise, por sua vez, pode ser demosntrado pela compactação da estrutura e conformação das proteínas (ALFONSO e col., 2000).

No presente estudo foi constatado que a utilização de diferentes enzimas para digestão protéica do amaranto resulta em diversidade de solubilidade de fragmentos contendo os grupos sulfidrilas livres e ligações dissulfeto. O sobrenadante de HA apresenta maiores valores de -SS que HB, porém ambas as concentrações encontradas foram pequenas. Observou-se ainda maior quantidade de -SH livre em HB, apesar do menor grau de hidrólise. Embora HA apresente a maior quantidade total do grupo sulfidrila livre, grande parte deste não estava solubilizado. Os dados indicam que, além das ligações dissulfeto, outras interações entre moléculas que contêm grupos sulfidrila e moléculas protéicas ou não-protéicas formaram agregados de alto peso molecular após a hidrólise, como observado por FISCHER e colaboradores (2002); ou ainda que, após a digestão parcial, foram conservadas proteínas e peptídeos de alto peso molecular.

Os teores de -SH e -SS encontrados no isolado protéico foram 6,91 μmol/g ± 0,25 e 2,01 μmol/g ± 0,17, respectivamente. Esses valores, que representam todas as frações protéicas do amaranto reunidas, são baixos comparados às frações protéicas separadas e quantificadas na literatura. Em análise de globulina-

P do amaranto foram encontrados 10,2 µmol de sulfidrila livre/g de proteína. A maior quantidade, 7 µmol/g, estava inacessível, envolvida pela molécula (CASTELLANI e col., 1999). As globulinas solúveis em sal apresentaram valores de sulfidrilas livres de 9,6 µmol/g em estudo de MARCONE e YADA (1997) e também no estudo de CASTELLANI e colaboradores (1999).

Já a quantidade de ligações dissulfeto encontrada no estudo de CASTELLANI e colaboradores (1999) para a globulina foi alta (51 µmol/g) e o conteúdo das ligações dissulfeto da globulina-S parcialmente purificada foi 53 µmol/g. O valor reportado por MARCONE e YADA (1997) para grupos dissulfeto da globulina-S foi 33 µmol/g.

Um fator que pode ter influenciado no baixo valor de ligações dissulfeto em relação à literatura foi o isolamento, pois a formação ou reestruturação das ligações dissulfeto podem ser influenciadas por mudanças na estrutura terciária da proteína durante seu processamento (AVANZA e AÑÓN, 2007). As diferenças de valores podem, portanto, ser atribuídas às metodologias empregadas e à disponibilidade dos grupos presentes nas amostras para análise (CASTELLANI e col., 1999). Os resíduos de sulfidrila e dissulfeto geralmente encontram-se intensamente envolvidos pela região hidrofóbica da proteína (YAMAGISHI e col., 1981), o que os torna estericamente inacessíveis para reagentes analíticos, porém disponíveis para reações sulfidrila-dissulfeto (NASH e col., 1971; YAMAGISHI e col., 1981; MARCONE e YADA, 1997; CASTELLANI e col., 1999).

A globulina do amaranto é um agente estabilizante (KONISHI e YOSHIMOTO, 1989), portanto concebe-se que o grupo sulfidrila enclausurado na proteína contribui para a estabilização de sua estrutura devido à sua associação hidrofóbica com aminoácidos com cadeia lateral apolar (THORNTON, 1981). As ligações inacessíveis dentro das cadeias participam da estabilização do dobramento de polipeptídeos e da estrutura quaternária da globulina (CASTELLANI e col., 1999).

A conformação ocasionada pelas ligações dissulfeto influencia na digestão enzimática do isolado protéico. GUO e colaboradores (2007) verificaram que o tratamento redutor com mercaptoetanol causou aumento na digestibilidade final da prolamina e maior taxa de proteólise inicial para globulina, glutelina e albumina, o que pode estar relacionado ao aumento do acesso das enzimas aos sítios de clivagem.

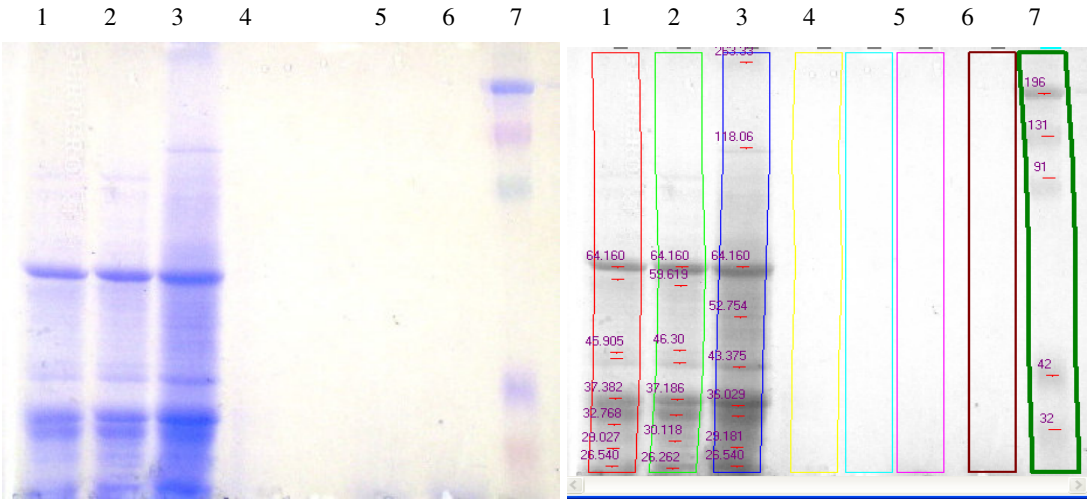
A clivagem da ligação dissulfeto pode denaturar a estrutura quaternária da proteína. Se as ligações dissulfeto intramoleculares forem afetadas (intra-polipeptídeo) a estrutura terciária também é rompida (KIM e KINSELLA, 1986; KORHONEN e col., 1998). Verifica-se que a redução de ligações dissulfeto inter e intramoleculares pode causar ruptura da estrutura e aumentar a acessibilidade aos sítios enzimáticos para digestão (GUO e col., 2007). MARCONE e YADA (1997), porém, verificaram que pouca mudança na estrutura secundária das globulinas ocorreu após a redução das ligações dissulfeto.

5.4 *Perfil eletroforético*

A análise eletroforética das farinhas integral e desendordurada, do isolado protéico, da mistura de enzimas utilizadas em ambas as hidrólises e dos precipitados dos hidrolisados está representada pela figura 8 (a, b).

Foi possível separar as cinco frações protéicas de maior peso 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). A compactação do gel não permitiu que as frações lisozima (17 kDa) e aprotinina (7 kDa) pudessem ser visualizadas.

Figura 8 - (a) Foto do gel de eletroforese; (b) Perfil densiométrico e pesos moleculares do gel. Condições não-redutoras, amostras: (1) farinha integral, (2) farinha desengordurada, (3) isolado protéico, (4) mistura de enzimas dos métodos HA e HB, (5) precipitado liofilizado de HA, (6) precipitado liofilizado de HB, (7) padrão de peso molecular.



(a) (b)

Comparando-se as farinhas e o isolado protéico verificou-se que pouco do perfil foi modificado pelos processamentos. As frações com peso molecular 263, 118 e 53 kDa aparecem após o isolamento, provavelmente devido à formação de conglomerados de frações de menores pesos. 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 foras mantidas, havendo perda apenas da fração de peso molecular de 60 kDa, que nas farinhas representam cerca de 5% da intesidade óptica em cada amostra.

As espécies menores que 100 kDa são formadas em sua maioria por albuminas (SCILINGO e col., 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, mas a globulina-P tem tendência à polimerização e contém alta proporção de subunidades monoméricas de cerca de 56 kDa (COOKE, 1984; MARTÍNEZ e col., 1997; GORINSTEIN e col., 2002).

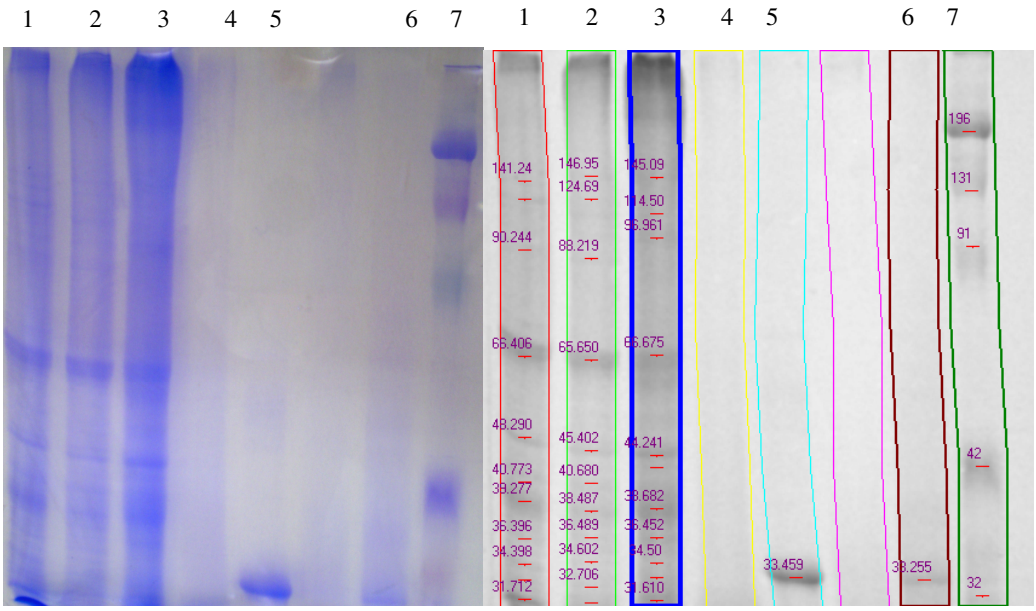
As glutelinas também apresentam características moleculares similares às das globulinas 11S do amaranto (GORINSTEIN e col., 2002), o que resulta em algumas frações ópticas muito densas, como ocorreu no presente estudo.

Após a hidrólise, o perfil eletroforético foi drasticamente modificado, sendo que frações acima de 30kDa não foram observadas, resultado similar ao encontrado em estudo de BEJOSANO e CORKE (1999).

Polímeros de globulina-P não apareceram nos isolados tratados com papaína e cucurbita, sugerindo que as enzimas podem ter quebrado ligações de polipetídeos envolvidos na polimerização da globulina. Sabe-se que a papaína incubada com globulina-P parcialmente purificada cliva o polipeptídeo M, induzindo à ruptura desse polímero (CASTELLANI e col., 2000).

As possíveis formações de conglomerados verificadas na análise de solubilidade e de ligações dissulfeto foram investigadas pelo perfil eletroforético em condições denaturantes. Os resultados encontram-se na figura 9 (a, b).

Figura 9 - (a) Foto do gel de eletroforese (b) Perfil densiométrico e pesos moleculares do gel. Condições redutoras, amostras: (1) farinha integral, (2) farinha desengordurada, (3) isolado protéico, (4) mistura de enzimas dos métodos HA e HB, (5) precipitado liofilizado de HA, (6) precipitado liofilizado de HB, (7) padrão de peso molecular.



(a) (b)

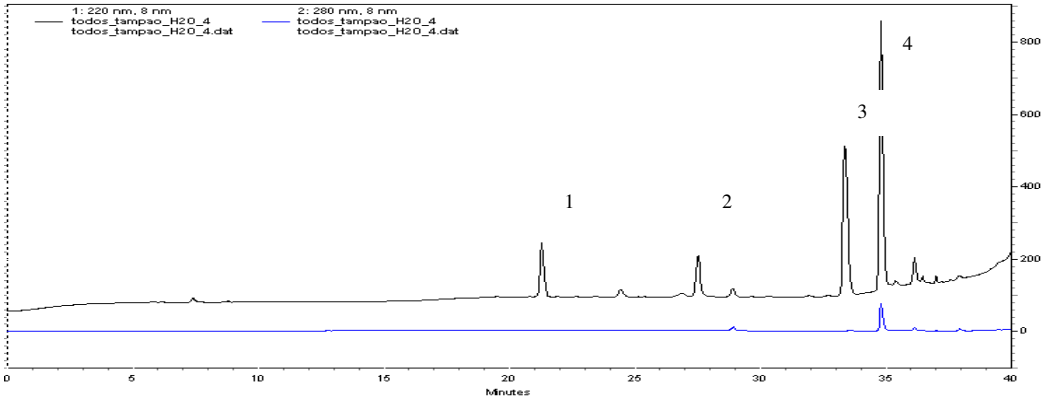
As bandas eletroforéticas em condições redutoras foram difusas, bem como ocorreu em experimento de SCILINGO e colaboradores (2002). Verificou-se maior número de frações entre 40 e 30 kDa no gel contendo amostras em condições redutoras (Figura 9) que em não-redutoras (Figura 8). Isso se deve a quebra de ligações dissulfeto, presentes nos precipitados conforme visto no item anterior, resultando na dissociação de agregados e na liberação de polipeptídeos monoméricos (MARTÍNEZ e col., 1997).

DRZEWIECKI e colaboradores (2003) verificaram que as albuminas eram formadas por polipeptídeos compostos por peptídeos de 31 a 38 kDa e 19 a 23 kDa unidos por ligações dissulfeto.

5.5 Separação das frações protéicas

A figura 10 representa o cromatograma dos padrões de peptídeos sintetizados para verificação dos tempos de retenção.

Figura 10 – Cromatograma dos peptídeos sintéticos (1) IAEK, (2) VPDPR, (3) IAVP, (4) LPYPR a 220 nm, linha preta, e a 280 nm, linha azul.



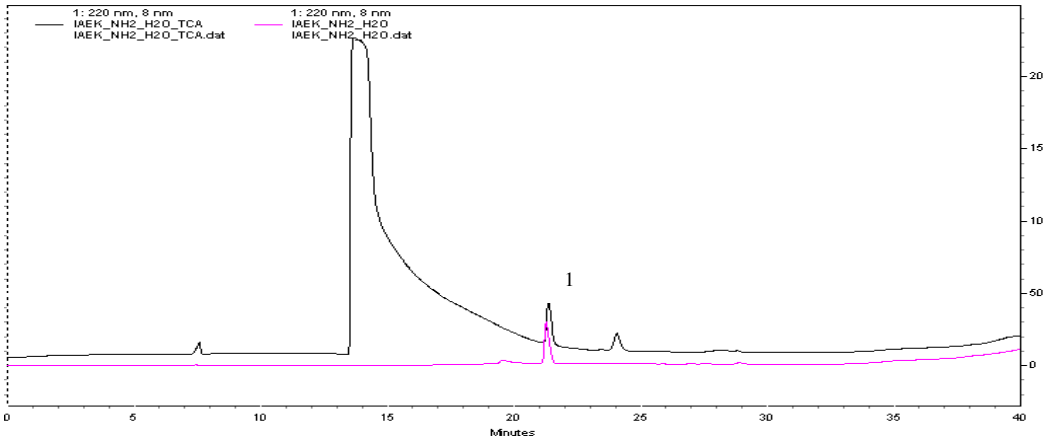
Os tempos de retenção dos padrões foram aproximadamente 21 min para IAEK, 27,5 min para VPDPR, 33,5 min para IAVP e 35 min para LPYPR.

Os picos dos padrões apresentaram-se bem resolvidos. O fragmento LPYPR, como esperado, foi o único peptídeo que apresentou pico a 280nm devido ao anel benzênico presente em sua cadeia.

Em injeção de tampão fosfato contendo TCA foi verificado que este ácido absorvia intensamente, resultando em pico representativo a 220 nm (Figura 11). Isto poderia interferir na detecção dos peptídeos por UV, especialmente para a visualização de picos no tempo de retenção do IAEK, primeiro fragmento de interesse a ser eluído.

Para verificação da possível influência do TCA na leitura em UV das ligações peptídicas, foi adicionado TCA ao padrão IAEK e realizada corrida cromatográfica, representada na figura 11.

Figura 11 – Cromatograma do peptídeo sintético (1) IAEK a 220 nm, solubilizado em: tampão fosfato e TCA, linha preta; tampão fosfato, linha rosa.



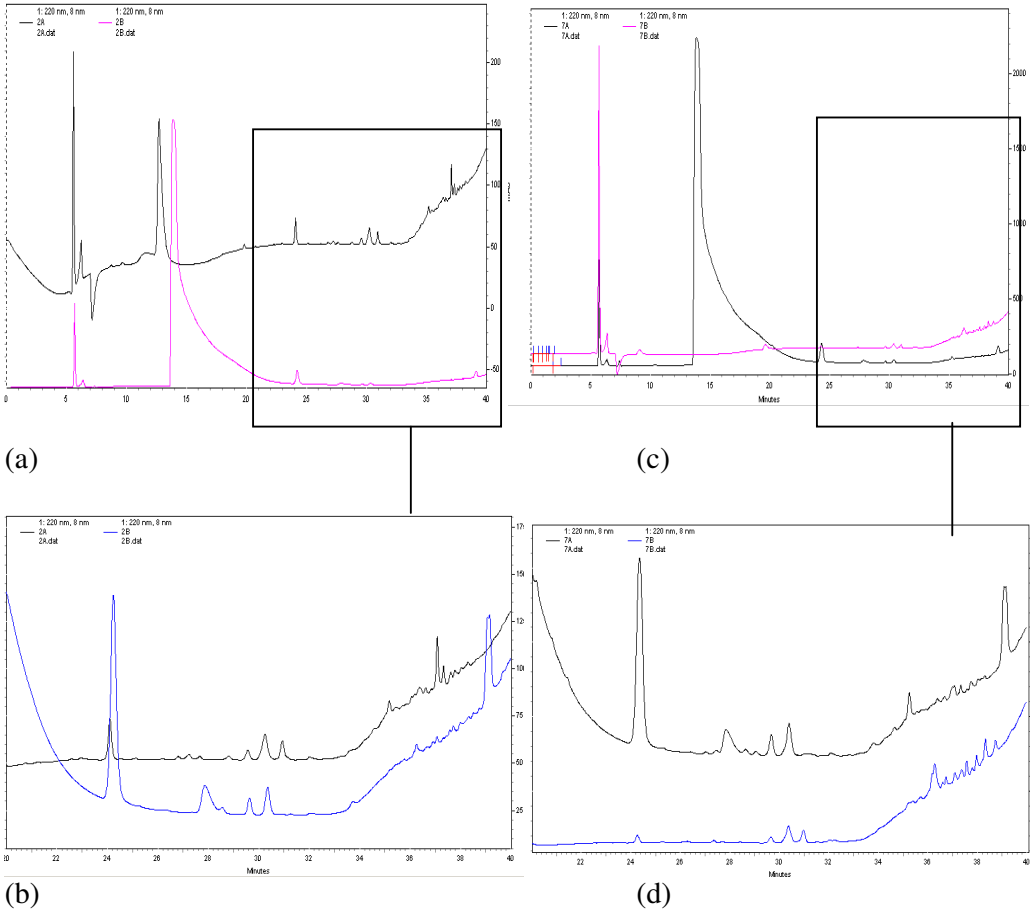
O fragmento IAEK possui tempo de retenção que coincide com o final da cauda do pico do TCA. O pico que representa o TCA possui largura considerável, se inicia em cerca de treze minutos e seu final ocorre aos 24 minutos, aproximadamente. Apesar disso, a área do pico do padrão IAEK adicionado de TCA foi próxima àquela cujo padrão não continha TCA (Figura 11), portanto o TCA não interferiu na visualização do pico pelo detector UV/visível, mas ainda havia a possibilidade de interferência do TCA na análise de identificação desse fragmento no espectrômetro de massa.

O branco da análise (tampão fosfato adicionado de TCA) apresentou pico característico do TCA e outro menor, que eluiu em cerca de 24 minutos. Entre os tempos 20 e 40 minutos não foram visualizados outros picos em concentrações consideráveis.

Após exclusão das frações acima de 3000 Da por membrana hidrofílica que permite permeação abaixo deste peso molecular, as amostras EA, EB, IA, IB, triplicata de HA e triplicata de HB foram injetadas em cromatógrafo líquido.

A figura 12 (a,b,c,d) representa os cromatogramas das análises de EA e EB.

Figura 12 – Cromatogramas a 220 nm sobrepostos de: (a) EA resfriada, linha preta, e EB TCA, linha rosa; (b) zoom de 20 a 40 minutos de (a) com EA resfriada, linha preta, e EB TCA, linha azul; (c) EA TCA, linha preta, e EB resfriada, linha rosa; (d) zoom de 20 a 40 minutos de (c), com EA TCA, linha preta, e EB resfriada, linha azul.

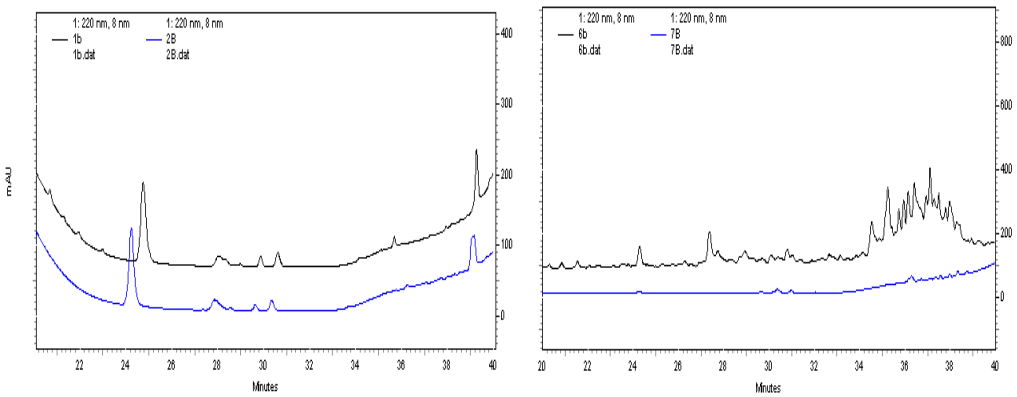


Os perfis de EA e EB em TCA foram semelhantes, o mesmo ocorreu entre EA e EB resfriados, o que indica que a discrepância entre os perfis também é dependente do solvente da amostra, o que remete à importância da escolha do solvente correto para solubilização das frações de interesse.

A cromatografia é uma técnica muito utilizada para isolar e purificar peptídeos bioativos (MEGIAS e col., 2004). Dentre os diversos procedimentos utilizados a cromatografia de fase reversa permite uma rápida separação de misturas. A coluna apropriada pode prover informações úteis para a caracterização de peptídeos (ZHAO e col., 1995).

Porém, destaca-se nos cromatogramas contendo TCA (Figura 12) o pico entre 27 e 28 minutos, tempo de retenção próximo ao do fragmento VPDPR, que poderia ser fator de confusão caso esse fosse o único parâmetro a ser considerado. Como diversos peptídeos possuem tempos de retenção similares, principalmente em se tratando de uma mistura complexa como a de produtos digeridos, não é possível utilizar este método para identificá-los, mesmo que o peptídeo alvo seja conhecido e padrões tenham sido injetados para comparação dos tempos de retenção (ZHAO e col., 1995).

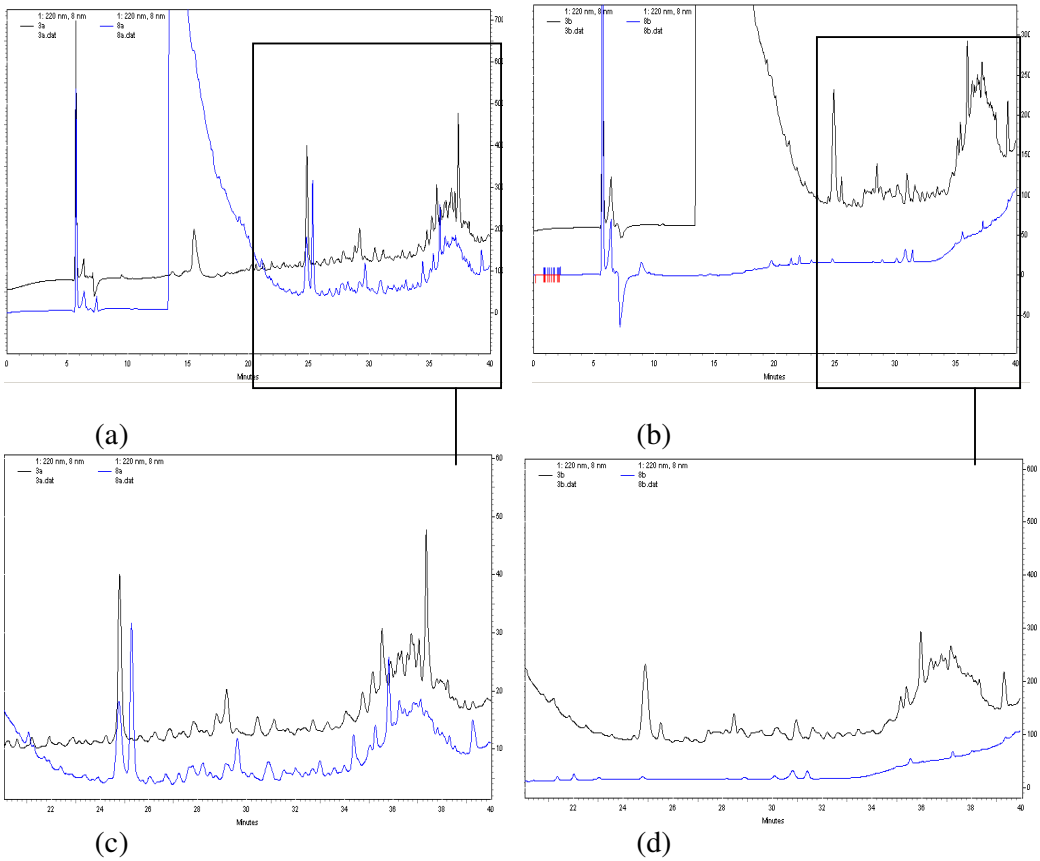
Figura 13 – Cromatogramas a 220 nm sobrepostos de: (a) IB, linha preta, e EB, linha azul, ambas com TCA; (b) IB, linha preta, e EB, linha azul, ambas resfriadas. (a) e (b) representam zoom de 20 a 40 minutos.



(a) (b)

Nota-se na figura 13 (a) que IB e EB contendo TCA apresentam perfis similares. O mesmo ocorreu com IA e EA. Provavelmente os picos apresentados são substâncias presentes em TCA ou produtos deste ácido e semelhantes aos peptídeos de interesse quanto à hidrofilicidade. No entanto, não foram observadas substâncias com o mesmo tempo de retenção dos padrões tanto nas enzimas quanto nas amostras não hidrolisadas contendo TCA. Foi possível dissolver os padrões em TCA e verificar eluição dos picos. Entretanto, deve ser levado em consideração que a utilização do TCA é mais seletiva com peptídeos de maior peso molecular, pois esses são menos solúveis em meio ácido.

Figura 14 – Cromatogramas a 220 nm sobrepostos de: (a) HA resfriado, linha preta, e HA TCA, linha azul; (b) zoom do cromatograma (a), de 20 a 40 minutos; (c) HB TCA, linha preta, e HB resfriada, linha azul; (d) zoom do cromatograma (c), de 20 a 40 minutos.



Verifica-se na figura 14 (a, b, c, d) que quase todas as amostras apresentaram perfis complexos. As amotras do método A, tanto em TCA quanto resfriadas (Figura 14 c), apresentaram maior quantidade de picos que as amostras do método B (Figura 14 d). Esses resultados refletem o maior grau de hidrólise verificado para HA. Especialmente em HB resfriado, conglomerados formados por ligações dissulfeto ou outras ligações pós-hidrólise resultaram em menor quantidade de peptídeos comparados a IB (Figura 13 b).

Foram constatados fragmentos peptídicos nos tempos de retenção dos padrões em quase todas as amostras, exceto em 27-28 minutos e 33-34 minutos para a amostra HB resfriada (Figura 14 d). Leituras a 280nm acusaram a existência em todas as amostras de anéis benzênicos que eluiram em tempo próximo ao do fragmento LPYPR.

5.1 Identificação de peptídeos por espectrometria de massa

As frações coletadas em cromatógrafo líquido referentes aos tempos de retenção dos padrões, foram, conseguinte, analisadas em espectrômetro de massa com detector EI. As frações das amostras coletadas nos tempos de retenção de interesse cujos picos não foram detectados por UV/visível também foram analisadas.

Os equipamentos mais utilizados para detecção de peptídeos são os detectores de eletrospray (conhecido como ESI) ou Dessorção de Matriz Assistida por Laser (conhecido como MALDI). Isto porque ESI reúne as técnicas cromatografia líquida e espectrometria de massa em uma só corrida, o que faz com que o tempo de análise seja reduzido, e MALDI torna desnecessária a derivatização da amostra. A escolha da utilização de um ou outro equipamento depende, além da disponibilidade, do tamanho da molécula a ser analisada e do tipo de análise requerida.

Pelo fato do laboratório de Bioquímica e Propriedades Funcionais dos Alimentos possuir um espectrômetro de massa com EI, este foi o método de detecção utilizado, apesar de pouco difundido para esta aplicação. Este ainda é um método útil

para detectar moléculas pequenas e voláteis. Para a análise de peptídeos sintéticos, o EI pode prover informação útil em presença de voláteis como TFA (HETTIARACHCHI e col., 2001).

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 N-terminal com acetilados, seguida pela enzima N-acilpeptídeo hidrolase, que catalisa a liberação de acetato e do aminoácido ou peptídeo livres (BRACHET e col., 1991), motivo pelo qual havido sido requerida a síntese dos padrões com extremidades livres. Entretanto, foi constatado por análise do padrão VPDPR que o C-terminal amidado e o C-terminal livre, quando em equilíbrio em solução aquosa ácida (com TFA), resultam em espécies com os mesmos tempos de retenção, relação m/z e abundância das massas.

Considerou-se derivatizar os peptídeos no C-terminal ou no N-terminal, da mesma forma como foi realizado por outros autores (MORRIS e WILLIAMS, 1971; ORLOV e VARSHAVSKY, 1972; DELL e MORRIS, 1974;), uma vez que esses grupos em sua forma livre podem conferir estabilidade aos compostos, impedindo sua volatilização. Os anidridos acético e succínico são os acilantes mais utilizados.

Porém, a derivatização pode acarretar na geração de subprodutos, especialmente quando não há pureza elevada no meio reacional, como é o caso das amostras analisadas (FERJANCIC-BIAGINI e col., 1998). Alguns peptídeos, por sua

vez, aparecem de forma mais intensa após a esterificação enquanto outros espectros são diminuídos (KIM e col., 2005).

Testes com os padrões mostraram que, por se tratarem de fragmentos de tamanho relativamente pequeno e devido às condições estabelecidas (temperatura e pressão de inserção), as moléculas atingiam o estado gasoso e podiam ser analisadas sem que houvesse necessidade de tratamentos prévios.

As massas moleculares obtidas nos espectros dos padrões e as abundâncias relativas do padrão e do branco estão relatadas na tabela 7 e a comparação entre as massas encontradas e as massas dos resíduos de peptídeos e dos aminoácidos que os formam encontram-se na tabela 8.

Tabela 7 – Relações m/z obtidas a 70 eV do padrão em MS-EI Full Scan para os peptídeos sintéticos e valores de abundância relativa do padrão e do branco em modo SIM.

Peptídeo	m/z obtidas do padrão	Abundância relativa no padrão *	Abundância relativa no branco**
IAEK	172	156	419
	173	999	999
	174	90	185
	240	10	219
	241	35	396
	242	6	122
	262	6	-
	263	5	-
	264	-	160
	265	-	208
	266	-	54
	373	-	31

Peptídeo	m/z obtidas do padrão	Abundância relativa no padrão *	Abundância relativa no branco**
VPDPR	124	167	-
	125	212	232
	136	-	257
	137	-	324
	153	303	529
	154	999	999
	155	82	332
	164	79	270
	165	418	546
	166	82	273
	212	127	-
	213	302	485
IAVP	***212***	112	386
	213	225	999
	214	26	97
	238	26	43
	239	999	76
	240	19	-
	255	-	80
	282	3	63
	283	3	62
	379	4	45
	380	38	-
	396	-	46
LPYPR	152	51	999
	153	35	727
	154	999	745
	155	6	-
	248	2	267
	249	28	815
	250	-	330
	296	-	196
	297	-	207
	353	-	295
	354	-	589

– Proporção m/z menor ou igual a 1.
* Abundâncias do peptídeo VPDPR com C-terminal livre e amidado.
** Branco = inserção dos solventes evaporados sem a presença de padrão.
Valores em negrito e itálico na coluna "m/z obtidas do padrão" indicam que os valores são encontrados em outro peptídeo citado na tabela.

Tabela 8 – Massas monoisotópicas dos fragmentos peptídicos e massas observadas a 70 eV.

Resíduo	Massas monoisotópicas	Massas observadas
IAEK $[M]^+$	459	-
$[IAEK - H_2O]^+$	441	-
$[IAE]^+$	331	-
$[AEK]^+$	346	-
$[IA]^+$	202	-
$[AE]^+$	218	-
$[EK]^+$	275	-
I^+	131	-
A^+	89	-
E^+	147	-
K^+	146	-
VPDPR $[M]^+$	582	-
$[VPDPR - H_2O]^+$	564	-
$[VPDP]^+$	426	-
$[PDPR]^+$	483	-
$[VPD]^+$	329	-
$[PDP]^+$	327	-
$[DPR]^+$	386	-
$[VP]^+$	214	213
$[PD]^+$	230	-
$[DP]^+$	230	-
$[PR]^+$	271	-
V^+	117	-
P^+	115	-
D^+	133	-
P^+	115	-
R^+	174	-
IAVP $[M]^+$	398	-
$[IAVP - H_2O]^+$	380	380
$[IAV]^+$	301	-
$[AVP]^+$	285	-
$[IA]^+$	202	-
$[AV]^+$	188	-
$[VP]^+$	214	214
I^+	131	-
A^+	89	-
V^+	117	-
P^+	115	-

Resíduo	Massas monoisotópicas esperadas	Massas observadas
LPYPR [M]+	644	-
[LPYPR - H2O] +	626	-
[LPYP]+	488	-
[PYPR]+	531	-
[LPY]+	391	-
[PYP]+	375	-
[YPR]+	434	-
[LP]+	228	-
[PY]+	278	-
[YP]+	278	-
[PR]+	271	-
L+	131	-
P+	115	-
Y+	181	-
P+	115	-
R+	174	-

Na tabela 7 pode ser verificado que os valores de massa encontrados no Full Scan não refletem a totalidade das massas obtidas no modo SIM para o mesmo padrão. Isso porque o Full Scan é mais suscetível à detecção de impurezas, e por isso presta-se à análise principalmente de substâncias provenientes de coluna cromatográfica capilar.

É possível perceber que as abundâncias relativas dadas pela inserção dos padrões foram diferentes das do branco da análise, alguns peptídeos contam inclusive com íons principais distintos. A diferencição é essencial na caracterização correta dos peptídeos. Esta discussão será aprofundada na análise dos possíveis fragmentos VPDPR das amostras.

A energia de ligação entre dois dipeptídeos modelo é cerca de 0,85 eV e a energia de molécula deve variar entre 8 e 15eV (TANABE, 2004), por isso tentativas de utilização de 30 eV e 15 eV foram realizadas a fim de clivar apenas as ligações peptídicas ou o menor número possível de ligações. Porém, os peptídeos em fase

gasosa são muito instáveis, mesmo com menor energia sendo fornecida. Apenas o peptídeo IAVP apresentou m/z de íon molecular menos a massa de uma molécula de água (Tabela 8). O fragmento LPYPR apresenta anel aromático, que deveria conferir maior estabilidade à fragmentação, porém esta molécula não exibiu íon molecular.

O padrão de fragmentação dos peptídeos não apresenta as massas monoisotópicas esperadas com a perda de aminoácidos (Tabela 7), provavelmente devido à ocorrência não só da clivagem de ligações peptídicas e de outras ligações covalentes, como também de dissociação sigma dos compostos cíclicos e rearranjo de McLafferty em aminas (SIGSBY e col., 1979; MCLAFFERTY e TUREČEK, 1993). Na biblioteca NIST, uma das mais completas para esse tipo de detector, não constam padrões de fragmentação de peptídeos bioativos. Assim, não foi possível analisar a maior parte dos fragmentos presentes na digestão.

Mesmo sem um perfil aminoacídico definido, as massas coincidentes dos padrões (valores em negrito e itálico na Tabela 7) permitem que algumas informações sejam obtidas dos espectros.

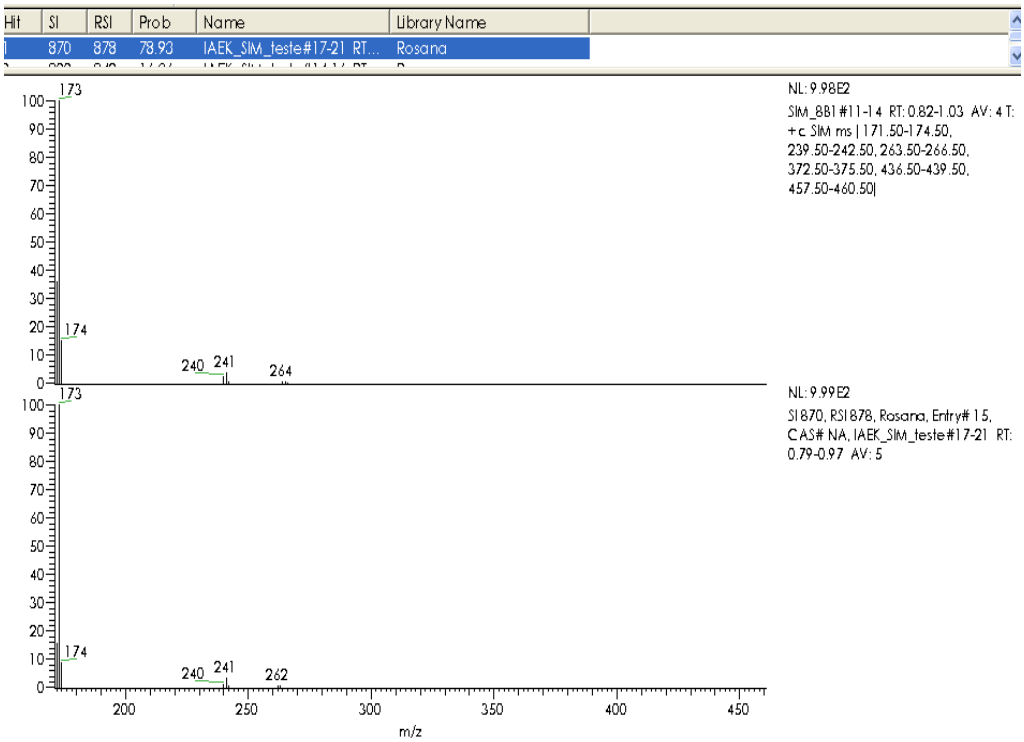
A massa 240 presente em IAEK e IAVP é indicativa da massa do resíduo IA somada à massa 38, que por sua vez sugere a presença de dois átomos de flúor provenientes do TFA. O EI de análise de bifalina exibiu os picos de m/z 50, 51, 69 e 97 que correspondem aos fragmentos CF_2, CHF_2, CF_3 and CF_3CO, respectivamnte. A influência do TFA nas amostras pode ser evidenciada por estes resultados (HETTIARACHCHI e col., 2001).

A massa 154 proveniente dos padrões VPDPR e LPYPR pode indicar um resíduo de arginina subtraído de uma molécula de água. As massas 212 e 213 presentes nos espectros dos padrões IAVP e VPDPR indicam a presença do resíduo VP.

Os valores decimais não foram considerados neste trabalho, pois o defeito de massa ocasionado pelas moléculas contendo cloro, flúor e oxigênio diminui cerca de 0,1 Da a massa do composto por átomo citado, enquanto cada átomo de hidrogênio eleva 0,1 Da. Assim, desvios de massa de ± 1 Da foram admitidos neste trabalho.

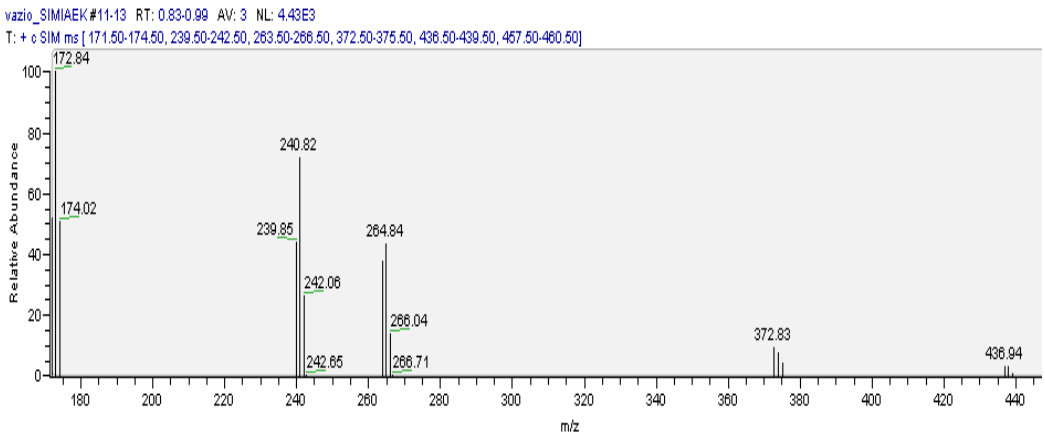
Como resultado das frações das amostras coletadas após corrida cromatográfica, obteve-se 79% de probabilidade de ocorrência do peptídeo IAEK na amostra HB resfriada (Figura 15). Esta amostra apresentou o menor grau de hidrólise e menor quantidade de peptídeos em seu perfil (Figura 14 d, linha azul).

Figura 15 - Espectros em modo SIM a 70 eV da amostra HB resfriada (acima) e do padrão IAEK (abaixo). A barra azul acima dos espectros indica a probabilidade dessa ocorrência.



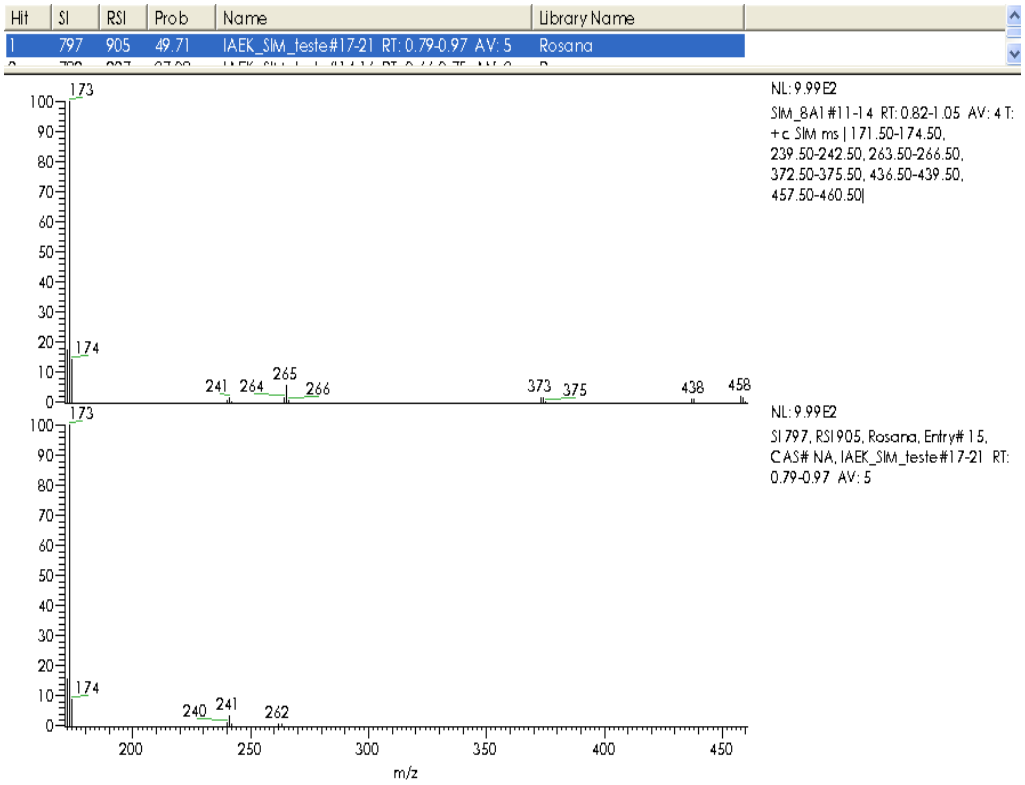
Verifica-se na figura 16 que o branco da análise (solvente evaporado sem a presença do padrão e inserido no MS) apresentou perfil bem diferente dos espectros anteriores, o que suporta a idéia da existência deste fragmento na amostra.

Figura 16 - Espectros em modo SIM a 70 eV do branco (solvente evaporado sem a presença do padrão e inserido no MS).



A amostra HA contendo TCA apresentou probabilidade de 50% da ocorrência do fragmento IAEK, por isso não foi considerada existente na amostra (Figura 17). Há a possibilidade deste peptídeo estar presente na amostra, porém massas semelhantes podem ter interferido na análise qualitativa ou podem ter ocorrido ligações de parte dos fragmentos com TFA ou TCA, resultando em íons com diferentes massas moleculares.

Figura 17 - Espectros em modo SIM a 70 eV da amostra HA contendo TCA (acima) e do padrão IAEK (abaixo). A barra azul acima dos espectros indica a probabilidade dessa ocorrência.



As demais amostras apresentaram perfis semelhantes ao branco e baixa similaridade com o padrão.

A figura 18 apresenta o perfil da amostra HA com TCA e o perfil do padrão VPDPR. A figura 19 mostra o perfil da amostra HA com TCA comparada ao perfil do branco da análise (solvente evaporado sem a presença do padrão e inserido no MS) do VPDPR em modo SIM.

Figura 18 - Espectros em modo SIM a 70 eV da amostra HA contendo TCA (acima) e do padrão VPDPR (abaixo). A barra azul acima dos espectros indica a probabilidade dessa ocorrência.

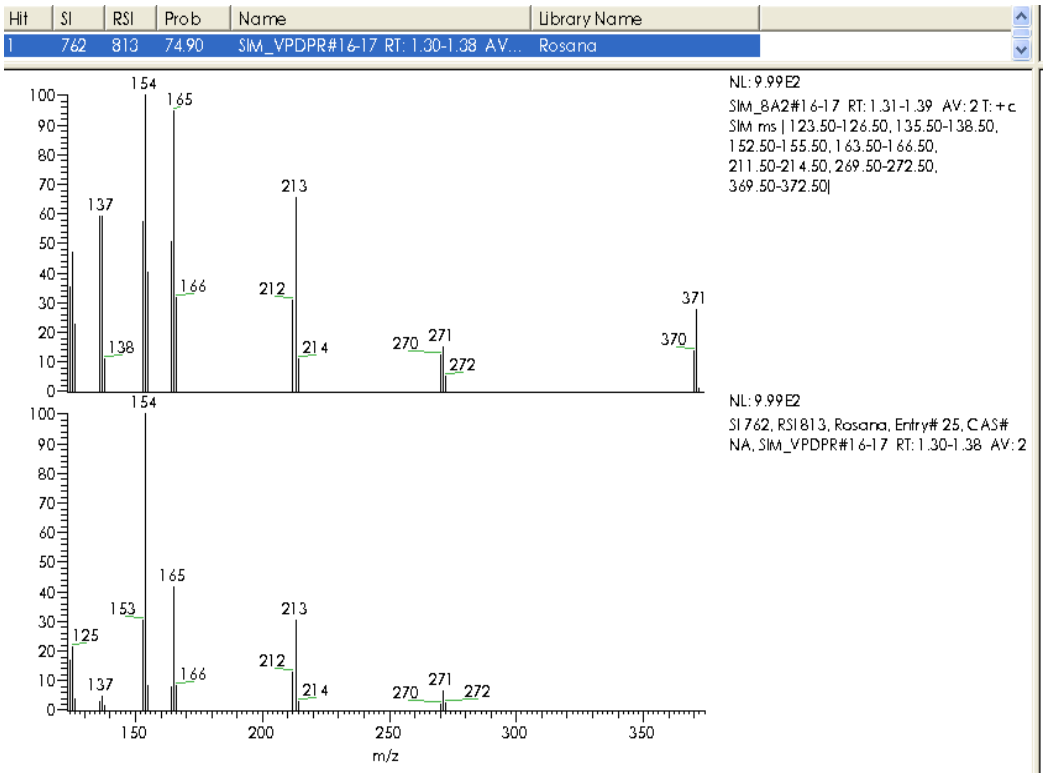
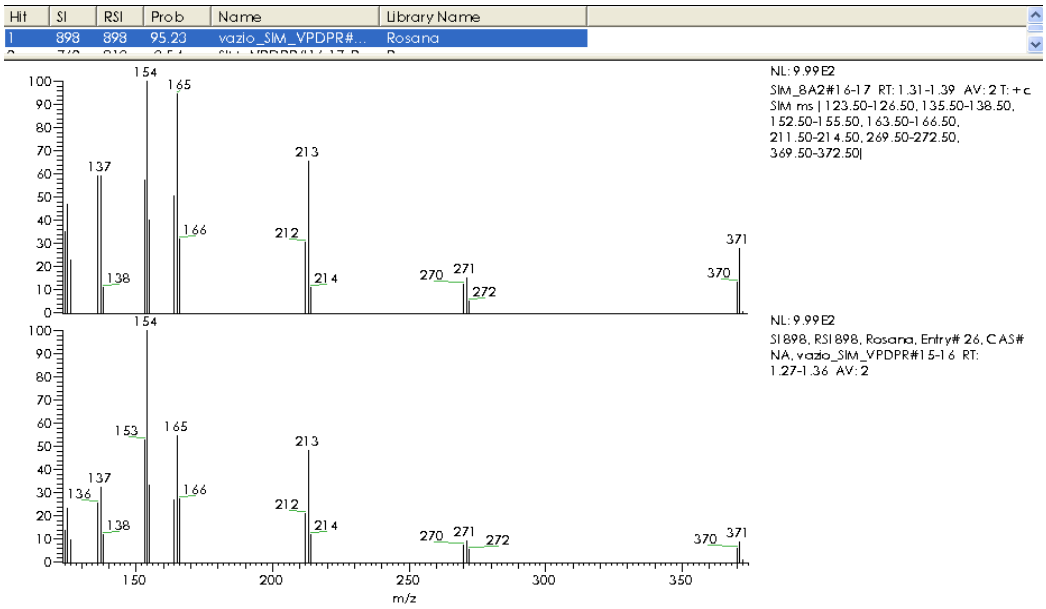


Figura 19 - Espectros em modo SIM a 70 eV da amostra HA contendo TCA (acima) e do branco - solvente evaporado sem a presença do padrão e inserido no MS (abaixo). A barra azul acima dos espectros indica a probabilidade dessa ocorrência.



Os espectros do padrão de fragmentação do peptídeo VPDPR e da amostra HA contendo TCA (Figura 18) poderiam ser considerados similares, já que a probabilidade foi de 75%. Porém, observou-se que o espectro da amostra é ainda mais semelhante, com 95% de probabilidade de ocorrência. Esta verificação reflete a importância do estudo do branco da análise a fim de evitar equívocos qualitativos.

Os demais espectros apresentaram perfis semelhantes ao da amostra HA contendo TCA, as similaridades com o padrão foram em torno de 65-73% e com o branco de 92-96%.

Os espectros dos padrões IAVP e LPYPR e de algumas amostras encontram-se nos anexo IV e VI. Para estes dois peptídeos e todas as amostras foi verificada similaridade abaixo de 30%, enquanto a similaridade entre amostras e respectivos brancos foi acima de 70%.

Mesmo com a comprovada existência de fragmentos peptídicos bioativos em alimentos, e embora alguns autores sugiram que pequenos peptídeos possam atravessar a parede do intestino permanecendo intactos (SCANFF e col., 1992; CHABANCE e col., 1998; HAUPT e col., 2002) estudos são necessários para a verificação da possibilidade de absorção dos fragmentos ou ainda de possíveis reações ou transformações *in vivo* que podem alterar ou impedir a ação biológica.

Outro fator a ser averiguado são as quantidades de peptídeos que devem ser ingeridas para que haja eficácia em sua atuação biológica.

6 - Conclusões

O isolado protéico foi obtido com grau de pureza acima de 90%.

O desengorduramento e o isolamento protéico foram eficientes e não modificaram de forma significativa a quantidade de aminoácidos essenciais e dos aminoácidos presentes nas seqüências dos peptídeos de interesse. O isolado protéico não apresentou suas principais frações moleculares alteradas em relação às farinhas integral e desengordurada.

As estruturas terciária e quaternária provavelmente foram alteradas, poia a solubilidade protéica diminuiu após o isolamento pela formação de agregados durante a precipitação isoelétrica. O grupo dissulfeto é um dos responsáveis pela ocorrência de agregados, entretanto outras forças atrativas provavelmente atuaram. A conformação conferida pode interferir no acesso aos sítios de clivagem das ligações peptídicas e dificultar a ação enzimática. Um agente facilitador de solubilização é a solução salina, que aumenta a força iônica do meio.

Apesar da formação de agregados, obteve-se alto grau de hidrólise em ambos os métodos enzimáticos. O maior grau de hidrólise foi obtido no método A.

A digestão protéica resultou em fragmentos que, em sua maioria, apresentaram pesos moleculares inferiores a 30 kDa, o que demonstra a efetividade de ambos os métodos de digestão.

O perfil peptídico, para a maior parte das amostras, mostrou-se complexo, com difícil separação de picos. Este é dependente não somente das enzimas utilizadas na digestão como também do solvente e concentração utilizados na solubilização dos fragmentos. As amotras hidrolisadas pelo método A, tanto em TCA quanto resfriadas, apresentaram maior quantidade de picos que as amostras do método B.

A amostra hidrolisada pelo método B e cuja digestão foi interrompida por resfriamento, que apresentou menor grau de hidrólise e menor quantidade de picos no cromatograma, continha um dos peptídeos hipocolesterolemizantes procurados, o fragmento IAEK.

7 - Referências bibliográficas

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

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. London (UK): Elsevier, 1986. p. 12-15.

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? **J Am Coll Cardiol**, v. 35, p. 1178-84, 2000.

ALFONSO, C.; JAVIER, V.; RAUL, S. V.; JUSTO, P.; JUAN, B.; FRANCISCO, M. Factors affecting the in vitro protein digestibility of chickpea albumins. **J Sci Food Agr**, v. 80, p. 79–84, 2000.

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

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 MEYHODS ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association Chemistry**. Arlington (USA): AOAC, 1995. 16 ed.

AOYAGI, Y. An angiotensin-I converting enzyme inhibitor from buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) flour. **Phytochem**, v. 67, n. 6, p. 618–21, 2006.

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. **R Soc Chem Spec Pub**, v. 269, p. 103–6, 2001.

ASHMARIN, I. P.; KARAZEEVA, E. P.; LYAPINA, L. A.; SAMONINA, G. E. The simplest proline-containing peptides PG, GP, PGP, and GPGG: regulatory activity and possible sources of biosynthesis. **Biochem**, v. 63, n. 2, p. 119–24, 1998.

AVANZA, M. V.; AÑÓN, M. C. Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. **J Sci Food Agr**, v. 87, n. 4, p. 616-23, 2007.

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. **Eur J Clin Nutr**, v. 57, p. 1292–4, 2003.

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. **J Food Sci**, v. 46, p. 1175-80, 1981.

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

BEJOSANO, F.P.; CORKE, H. Protein quality evaluation of Amaranthus wholemeal flours and protein concentrates. **J Sci Agric**, v. 76, p. 1000-6, 1998.

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 Hum Nutr**, 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. **Int J Vitam Nutr Res**, 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 Chem**, v. 81, p. 119-24, 2003b.

BERTHOU, J.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; LIFCHITZ, A.; DELETTRÉ, J.; FLOCH, F.; JOLLÉS, P. Immunostimulating properties and three-dimensional structure of two tripeptides from human and cow caseins. **FEBS Lett**, v. 218, n. 1, p. 55–8, 1987.

BETTERIDGE, D. J. Diabetes, lipoprotein metabolism and atherosclerosis. **Br Med Bull**, v. 45, p. 285-311, 1989.

BEVERIDGE, T.; TOMA, S. J.; NAKAI, S. Determination of SH and SS groups in some food proteins using Ellman's reagent. **J Food Sci**, v. 39, p. 49-51, 1974.

BIDLACK, W. R.; OMAYE, S. T.; MESKIN, M. S. **Phytochem Bioact Agents**. Lancaster (UK): Technomic, 2000.

BODWELL, C. E.; SATTERLEE, L. D.; HACKLER, L. R. Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by in vitro enzimic digestion methods. **Am J Clin Nutr**, v. 33, p. 677-86, 1980.

BOURAS, M.; HUNEAU, J. F.; TOME, D. The Inhibition of intestinal dipeptidylaminopeptidase-IV promotes the absorption of enterostatin and des-arginine-enterostatin across rat jejunum in vitro. **Life Sci**, v. 59, n. 25, p. 2147-55, 1996.

BOWYER, R. C.; ROWSTON, W. M.; JEHANLI, A. M. T.; LACEY, J. H.; HERMON-TAYLOR, L. 1993. The effect of a satiating meal on the concentrations of procolipase activation peptide in the serum and urine of normal and morbidly obese individuals. **Gut**, v. 34, n. 11, p. 1520-5, 1993.

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. **J Nutr Biochem**, v. 2, p. 387-94, 1991.

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.

BRESSANI, R. The proteins of grain amaranth. **Food Rev Int**, v. 5, n. 1, p. 13-38, 1989.

BRESSANI, R.; GARCIA-VELA, L. A. Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. **J Agric Foods Chem**, v. 38, n. 5, p. 1205-9, 1990.

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

BUCHMANN, N. B. In vitro digestibility of protein from barley and others cereals. **J Sci Food Agric**, v. 30, p. 538-89, 1979.

CALIENDO, G.; GRECO, G.; GRIECO, P.; PERISSUTTI, E.; SANTAGADA, V.; IALENTI, A.; MAFFIA, P.; ALBRIZIO, S.; SANTINI, A. Synthesis and antinociceptive activity of peptides related to interleukin-1 beta193–195 Lys-Pro-Thr. **Biopolymers,** v. 40, n. 5, p. 479–84, 1996.

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

CASTELLANI, O. F.; MARTÝNEZ, E. N.; AÑÓN, M. C. Globulin-P structure modifications induced by enzymatic proteolysis. **J Agric Food Chem**, v. 48, p. 5624-9, 2000.

CASTELLANI, O. F.; MARTÝNEZ, E. N.; AÑÓN, M. C. Role of disulfide bonds upon the structural stability of an amaranth globulin. **J Agric Food Chem**, v. 47, n. 8, p. 3001-8, 1999.

CASTELLANI, O. F.; MARTÝNEZ, E. N.; AÑÓN, M. C. Structural modifications of an amaranth globulin induced by pH and NaCl. **J Agric Food Chem**, v. 46, p. 4846–53, 1998.

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. 155–65, 1998.

CHAMBERS, B. J.; KLEIN, N. W.; CONRAD, S. H.; RUPPENTHAL, G. C.; SACKETT, G. P.; WEEKS, B. S.; KLEINMAN, H. K. Reproduction and sera embryotoxicity after immunization of monkeys with the laminin peptides YIGSR, RGD, and IKVAV. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, n. 15, 6818–22, 1995.

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

CHEN, H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; FUJIMOTO, K.; NOKIHARA, K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. **J Agric Food Chem,** v. 46, n. 1, p. 49–53, 1998.

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. **J Agric Food Chem**, v. 53, p. 8038-45, 2005.

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

COSTA, E. L.; GONTIJO, J. A. R.; NETTO, F.M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive actvity of whey protein hydrolysates. **Int Dairy J**, v. 17, p. 632-40, 2007.

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 lipoportein oxidation. **Ann Nutr Metabol**, 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. **J Nutr**, v.130, n. 11, p. 2641-7, 2000.

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.

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

DE LUMEN, B. O. Lunasin: A cancer-preventive soy peptide. **Nutr Rev**, 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.

DELL, A.; MORRIS, H. R. New observations on the fragmentation properties of peptides under electron impact mass spectrometry. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 61, n. 4, p. 1125-32, 1974.

DRZEWIECKI, J.; DELGADO-LICON, E.; RATIPORN, H.; PAWELZIK, E.; MARTIN-BELLOSO, O.; PARK, Y. S.; JUNG, S. T.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. Identification and differences of total proteins and their soluble fractions in some pseudocereal based on eletrophoretic patterns. **J Agric Food Chem**, v. 51, p. 7798-804, 2003.

DUARTE-CORREA, A.; JOKI, L.; CARISSON, R. Amino-acid composition of some Amaranthus sp grain proteins and its fractions. **Arch Latinoam Nutr**, v. 26, n. 3, p. 466-76, 1986.

DUODU, K. G.; TAYLOR, J. R. N.; BELTON, P. S.; HAMAKER, B. R. Factors affecting sorghum protein digestibility. **J Cereal Sci**, v. 38, p. 117–31, 2003.

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 tecnologia indígena para la preparacion 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.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Informações sobre o amaranto**. Atualizado em 2002. Disponível em:

<http://www.embrapa.br/cgi-bin/htsearch?words=amaranto>. Acesso em 26 jun. 2007.

ERLANSON-ALBERTSSON, C.; LARSSON A. A possible physiological function of pancreatic pro-colipase activation peptide in appetite regulation. **Biochimie**, v. 70, p. 1245, 1988a.

ERLANSON-ALBERTSSON, C.; LARSSON A. The activation peptide of pancreatic procolipase decreases food intake in rats. **Regul Peptides**, v. 22, p. 325, 1988b.

ESCUDERO, N. L.; ARELLANO, M. L. D.; LUCO, J. M.; GIMÉNEZ, M. S.; MUCCIARELLI, S. I. Comparison of the chemical composition and nutritional value of Amaranthus cruentus flour and its protein concentrate. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 59, p. 15-21, 2004.

FAO/WHO - 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. 2007.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Protein quality evaluation**. Roma (Italy): FAO Food and Nutrition paper, 51, 1991. 66 p.

FERJANCIC-BIAGINI, A.; GIARDINA, T.; PUIGSERVER, A. Acylation of food proteins and hydrolysis by digestive enzymes: a review. **J Food Biochem**, v. 22, p. 331-45, 1998.

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.

FISCHER, M.; GRUPPEN, H.; PIERSMA, S. R.; KOFOD, L. V.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Aggregation of peptides during hydrolysis as a cause of reduced enzymatic extractability of soybean meal proteins. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 16, p. 4512–9, 2002.

FREITAS, O.; DOS SANTOS, J.; GREENE, L.; DUTRA DE OLIVEIRA, J. Bases bioquímicas do suporte nutricional enteral. **Arch latinoam nutr**, 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. **J Sci Food Agric**, v. 84, n. 10, p. 1153-58, 2004.

GILL, I.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; JORBA, X.; VULFSON, E. N.; 1996. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. **Enzyme Microbiol Technol**, v, 18, n. 3, p. 162–83.

GORINSTEIN, S.; ARNAO DE NUE, I.; ARRUDA, P. Alcohol-soluble and total proteins from amaranth seeds and their comparison with other cereals. **J Agric Food Chem**, v, 39, n. 5, p. 848-50, 1991.

GORINSTEIN, S.; DELGADO-LICON, E.; PAWELZIK, E.; PERMADY, H. H.; WEISZ, M.; TRAKHTENBERG, S. Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hidrophobicity, electrophoresis, amino acid analysis, circular dichroism, and differential scanning calorimetry measurements. **J Agric Food Chem**, v. 49, p. 5595-601, 2001.

GORINSTEIN, S.; PAWELZIK, E.; DELGADO-LICON, E.; HARUENKIT, R.; WEISZ, M.; TRAKHTENBERG, S. Characterization of pseudocereal and cereal protein bu protein anda mino acid analyses. **J Food Sci Agric**, v. 82, p. 886-91, 2002.

GRAJETA, H. Effects of amaranth (Amaranthus cruentus) seeds on lipid metabolism in rats. **Bromatol Chem Toksykol**, v. 30, p. 25, 1997.

GUEGUEN, J.; CHEVALIER, M.; BARBOT, J.; SCHAEFFER, F. Dissociation and aggregation of pea legumin induced by pH and ionic-strenght. **J Sci Food Agric**, v. 44, p. 167-82, 1988.

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 Chem**, v. 102, n. 1, p. 118-22, 2007.

HARDHAM, J. F. The determination of total and reactive sulphydryl of whey protein concentrates. **Australian J Dairy Technol**, v. 227, p.153-5, 1981.

HARTMAN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Curr Opin Biotechnol**, v. 18, n. 2, p. 163–9, 2007.

HAUPT, S.; GIL. E.; TIROSH, G.; KLINGER. E.; GAD. A.; RUBINSTEIN, A. Regional peptide uptake study in the rat intestinal mucosa: glatiramer acetate as a model. **Drug Pharm Res**, v. 19, n. 6, p. 832–7, 2002.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; RAMOS, M.; RECIO, I. Application of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the

identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. **J Chromatogr A**, v. 1049, p. 107–14, 2004.

HETTIARACHCHI, K.; RIDGE, S.; THOMAS, D. W.; OLSON, L.; OBI, C. R.; SINGH, D. Characterization and analysis of biphalin: an opioid peptide with a palindromic sequence. **J Peptide Res**, v. 57, n. 2, p. 151-61, 2001.

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

IKEDA, K.; OKU, M.; KUSANO, T.; YASUMOTO, K. Inhibitory potency of plant antinutrients towards the in vitro digestibility of buckwheat protein. **J Food Sci**, v. 51, p. 1527–30, 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.

IMERI, A.; FLORES, R.; ELIAS, L. G.; BRESSANI, R. Efecto do procesamiento y de la suplementacion con aminoácidos sobre la calidad proteinica del amaranto (Amaranthus caudatus). **Arch Latinoam Nutr**, v. 37, p. 160-73, 1987.

JEONG, H. J.; PARK, J. H.; LAM, Y.; DE LUMEN, B. O. Characterization of lunasin isolated from soybean. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 27, p. 7901–6, 2003.

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. **Int. J. Biol. Macromol**, v. 28, n. 1, p. 41-50, 2000.

KAVEY, R-E. W.; DANIELS, S. R.; LAUER, R. M.; ATKINS, D. L.; HAYMAN, L. L.; TAUBERT, K. American heart association guidelines for primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. **Circulation**, v. 107, p. 1562, 2003.

KAYSER, H.; MEISEL, H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. **FEBS Lett**, v. 383, n. 1–2, p. 18–20, 1996.

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. **J Agric Food Chem**, v. 34, p. 623-7, 1986.

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

KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Curr Pharm Des**, v. 9, n. 16, p. 1309-23, 2003.

KONISHI, Y.; YOSHIMOTO, N. Amaranth globulin as a heat-stable emulsifying agent. **Agric Biol Chem**, v. 53, n. 12, p. 3327-8, 1989.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. **Curr Pharm Des**, v. 9, n. 16, p. 1297–308, 2003.

KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPALA, A.; RANTAMAKI, P.; TUPASELA, T. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. **Trends Food Sci Technol**, v. 9, p. 307–19, 1998.

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

LAMBELET, P. Cholesterol-lowering properties of amaranth grain and oil in hamsters. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 73, n. 1, p. 39-49, 2003.

LI, C.; MATSUI, T.; MATSUMOTO, K.; YAMASAKI, R.; KAWASAKI, T. Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein. J Peptide Sci, v. 8, n. 6, p. 267–74, 2002.

LIPKIN, A.; ANISIMOVA, V.; NIKONOROVA, A.; BABAKOV, A.; KRAUSE, E.; GRISHIN, M. B. E. .; EGOROV, T. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (Amaranthus retroflexus L.) seeds. **Phytochem**, v. 66, p. 2426–31, 2005.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal: Funep, 2000. cap. 3, p. 101-3.

MAGALHÃES, M. E. C.; BRANDÃO, A. A.; FREITAS, E. V.; POZZAN, R.; BRANDÃO, A. P. Novas perspectivas no tratamento de dislipidemias. **Rev SOCERJ**, p. 105-11, abr/mai/jun. 2004.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause**: alimentos, nutrição e dietoterapia. 9. ed. São Paulo: Roca, 1998.

MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. **J Am Oil Chem Soc**, v. 69, p. 1163-9, 1992.

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. **Arq Bras Cardiol**, 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 Chem**, v. 51, p. 287-94, 1994.

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

MARCONE, M. F.; YADA, R. Y. Sulfhydryl and disulfide groups of the oligomeric seed globulin from Amaranthus hypochondriacusK343. **J Food Biochem**, v. 21, p. 255-272, 1997.

MARTÍNEZ, E. N.; AÑÓN, M. C. Composition and characterization of amaranth protein isolates. An eletrophoretic and calorimetric study. **J Agric Food Chem**, v. 44, p. 2523-30, 1996.

MARTÍNEZ, E. N.; CASTELLANI, O. F.; AÑÓN, M. C. Common molecular features among amaranth storage proteins. **J Agric Food Chem**, v. 45, p. 3832-9, 1997.

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. **Biosc Biotech Biochem**, v. 57, n. 6, p. 922-5, 1993.

McGILL Jr, H. C.; McMAHAN, C.A.; ZIESKE, A. W.; HERDERICK, E. E.; MALCOM, G. T.; TRACY, R. E.; e col. Origin of atherosclerosis in childwood and adolescence. **Am J Clin Nutr**, v. 72, p. 1307S-15S, 2000.

MCLAFFERTY, FW; TUREČEK F. **Interpretation of Mass Spectra**. California (USA): University Science Books, 1993. 4. ed.

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. **J Agric Food Chem**, 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.

MIGLIORE-SAMOUR, D.; ROCH-ARVEILLER, M.; TISSOT, M.; JAZZIRI, M.; KEDDAD, K.; GIROUD, J. P.; JOLLÉS, P. Effects of tripeptides derived from milk

proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms. **Biochem Pharmacol**, v. 44, n. 4, p. 673–80, 1992.

MINER, J. L.; ERLANSON-ALBERTSSON, C.; PATERSON, J. A.; BAILE, C. A. Reduction of feed intake in sheep by enterostatin, the procolipase activation peptide. **J Anim Sci**, v. 72, p. 1578-82, 1994.

MORRIS, H. R.; WILLIAMS, D. H. Determination of the sequences of protein-derived peptides and peptide mixtures by mass spectrometry. **Biochem J**, v. 125, p.189-201, 1971.

MULLALLY, M. M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Synthetic peptides corresponding to alfa-lactalbumin and beta-lactoglobulin sequences with angiostensin-I-converting enzyme inhibitory activity. **Biol Biochem Hoppe-Seyler**, v. 377, n. 4, p. 259-60, 1996.

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. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 281, n. 1, p. 11-7, 2001.

NAGATA, C.; TAKATSUKA. N.; KAWAKAMI, N.; SHIMIZU, H. A prospective cohort study of soy product intake and stomach cancer death. **Br J Cancer**, v. 87, n. 1, p. 31–6, 2002.

NASH, A. M.; KWALEK, W. F.; WOLF, W. J. Denaturation of soybean proteins by isoelectric precipitation. **Cereal Chem**, v. 48, p. 360-8, 1971.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Amaranth: modern prospects for an ancient crop. BOSTID Reports. National Academy of Sciences, Washington (USA): National Academy Press, 1984. p. 1-81.

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. p 124-147.

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. **J Am Med Assoc**, v. 285, p. 2486-97, 2001.

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

ORLOV, V. M.; VARSHAVSKY, Y. M. Comparative studies on photo-ionization and electron-impact ionization of peptide derivatives. **Org mass spectrom**, v. 6, p. 9-20, 1972.

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. **Chem Nat Comp**, 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. **Chem Nat Comp**, v. 41, n. 1, p. 69, 2005b.

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.

PELLEGRINI, A. Antimicrobial peptides from food proteins. **Curr Pharm Des**, v. 9, p. 1225–38, 2003.

PENA-RAMOS, E.A.; XIONG, Y. L. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. **J Food Sci**, v. 67, n. 8, p. 2952–6, 2002.

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. **Am Heart J**, v. 146, p. 331-8, 2003.

PIRES, C. V. tese **Otimização de técnicas de determinação da digestibilidade in vitro para a substituição da digestibilidade in vivo no cálculo do escore químico corrigido pela digestibilidade protéica – PDCAAS.** 2005. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

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

PRICE, J. F.; FOWKES, F. G. R. Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease. **Eur Heart J**, v. 18, p. 719-27, 1997.

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

QIAO, Y. **Routine techniques for monitoring the nutritional value of animal meals**. 2001. PhD (Animal Science) - North Carolina State University, North Carolina.

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. **J Anim Sci**, v. 82, p. 1669–77, 2004.

RUBAS, W.; GRASS, G. M. Gastrointestinal lymphatic absorption of peptides and proteins. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 7, p. 15-69, 1991.

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. **J Agric Food Chem**, v. 50, p. 6515-20, 2002.

SANCHEZ, A.; RUBANO, D. A.; SHAULIK, G. W.; HUBBAND, R.; HORNING, M. C.; Cholesterolemic affects of the lysine/aginine ration in rabbits after initial early growth. **Arch Latinoam Nutr**, v. 28, p. 229-38, 1988.

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.

SAUNDERS, R. M.; CONNOR, A. N.; BOOTH, E. M.; KOHLER, G. O. measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by in vivo and in vitro methods. **J Nutr**, v. 103, p. 530-5, 1973.

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. **J Dairy Res**, v. 59, n. 4, p. 437–47, 1992.

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 Res Int**, v. 35, p. 855–62, 2002.

SEGURA-NIETO, M.; BARBA DE LA ROSA, A. P.; PAREDES-LOPEZ, O. Biochemistry of amaranth proteins. In: **Amaranth**: biology, chemistry and technology. PAREDES-LOPEZ, O. Boca Raton (USA): CRC Press, 1994. p. 75-106.

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

SEWALD, N.; JAKUBKE, H. D. Peptides: Chemistry and biology. Weinheim (Germany): Wiley-Vch, 2002. 562 p.

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.

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. **Brit J Biom Sci**, v. 61, n. 1, p. 11-4, 2004.

SIGSBY, M. L.; DAY, R. J.; COOKS, R. G. Fragmentation of even electron ions: Protonated amines and esters. **Organic Mass Spectrometry**, v. 14, n. 10, p. 556-61, 1979.

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. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 4, p. 1233–40, 2008.

SIQUEIRA, A. F. A.; ABDALLA, D. S. P.; FERREIRA, S. R. G. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. **Arq Bras Endoc Metabol**, v. 50, n. 2, 2006.

SIRTORI, C. R.; AGRADI, E.; CONTI, F.; MANIERO, O.; GATTI, E. Soybean-protein diet in the treatment of Type-Il 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. **J Nutr**, v. 125, n. 3, p. 598S-605S, 1995.

SLEIGH, S. H.; TAME, J. R.; DODSON, E. J.; WILKINSON, A. J. Peptide binding in OppA, the crystal structures of the periplasmic oligopeptide binding protein in the unliganded form and in complex with lysyllysine. **Biochem**, v. 36, n. 32, p. 9747–58, 1997.

SMITH, B. J. Enzymatic Methods for cleaving proteins. In: Walker, JM. **Methods in molecular biology**. New Jersey (USA): Humana Press, 1994.

SOSULSKI, F. W.; IMAFIDON, G. I. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. **J Agric Food Chem**, v. 38, p. 1351-6, 1990.

SPECTOR, D.; ANTHONY, M.; ALEXANDER, D.; ARAB, L. Soy consumption and colorectal cancer. **Nutr 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. **Anal Chem**, v. 39, n. 10, p. 1412-5, 1967.

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. **Anal Biochem**, 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. **J Agric Food Chem**, 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. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 67, n. 7, p. 1620-2, 2003.

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

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

THORNTON, J. M. Disulphide bridges in globular proteins. **J Mol Biol**, v. 151, p. 261-87, 1981.

TIENGO, A. **Bioatividade do grão de amaranto: avaliação in vitro da atividade ligante de ácidos biliares e inibidora da enzima conversora de angiotensina**. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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.

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

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 Physiol**, v. 103, p. 1407-12, 1993.

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. **J Liq Chromatogr**, v. 9, p. 3559-76, 1986.

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.

WANG, W.; DE MEJIA, E. G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comp Rev Food Sci 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.

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. **J Auto Chem**, v. 8, n. 4, p. 170-7, 1986.

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

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. **J Agric Food Chem**, v. 49, n. 1, p. 501–6, 2001.

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

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.

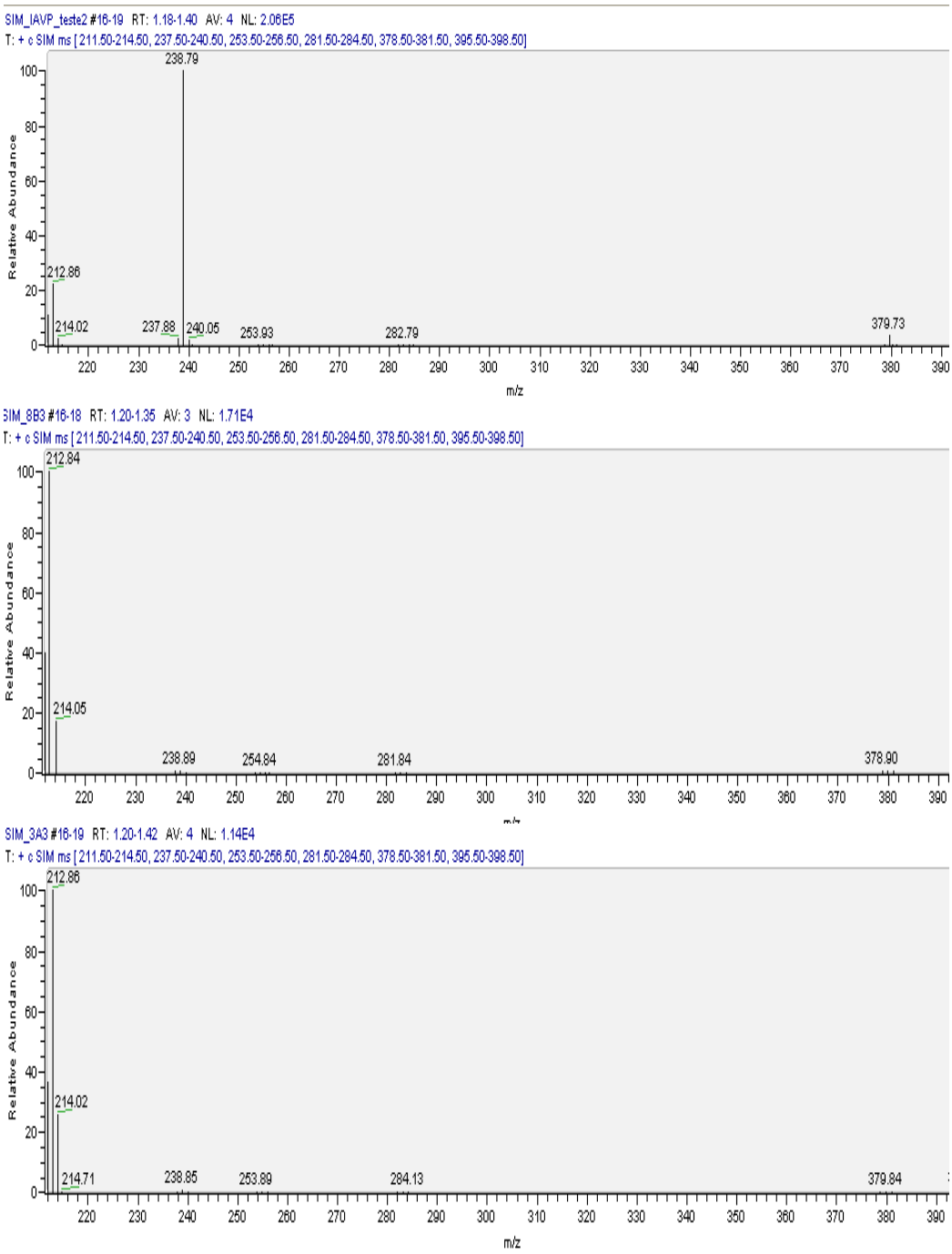
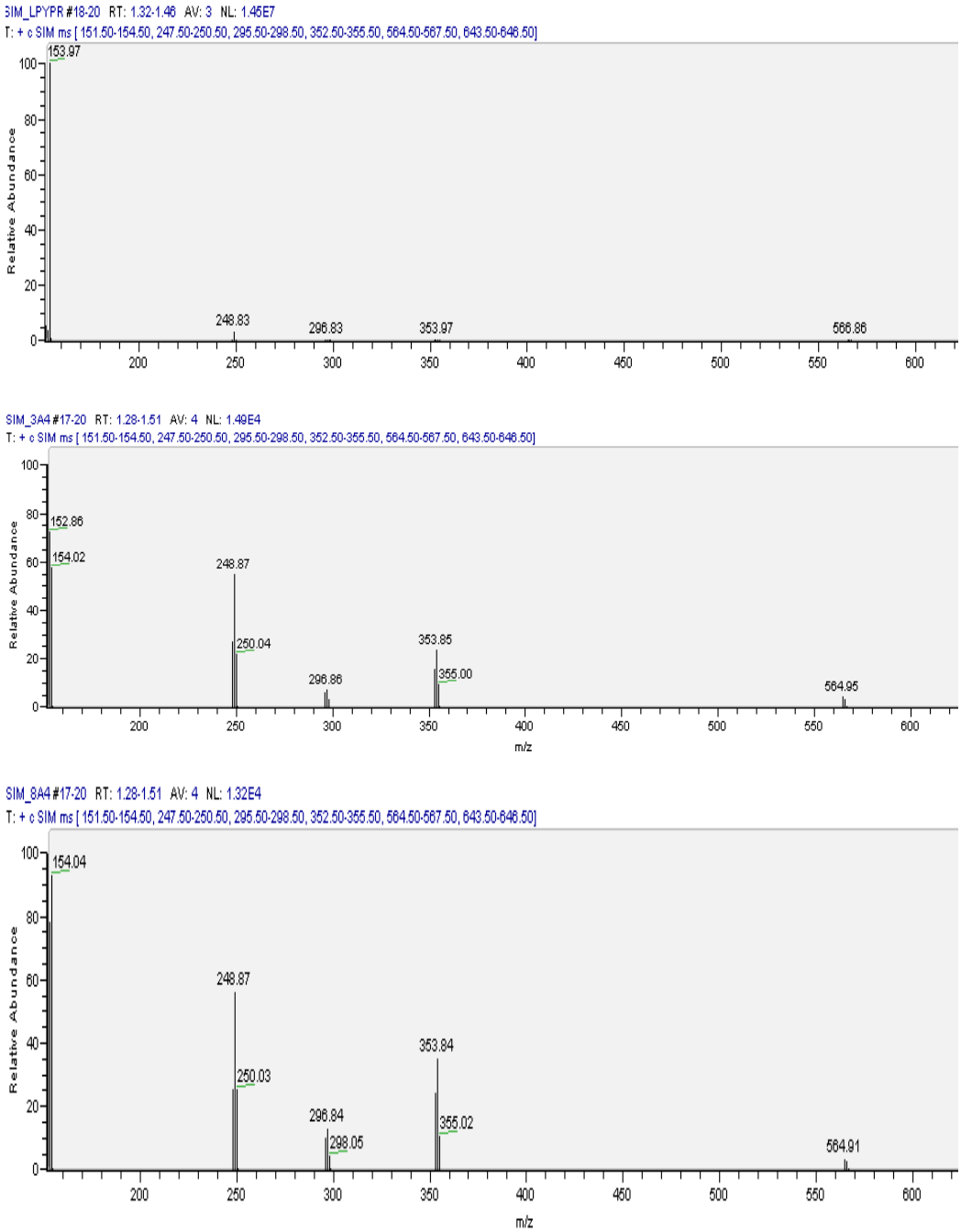
YOSHIKAWA, M.; FUJITA, H.; MATOBA, N.; TAKENAKA, Y.; YAMAMOTO, T.; YAMAUCHI, R.; TSURUKI, H.; TAKAHATA, K. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle- related diseases. **BioFactors**, v. 12, n. 1–4, p.143–6, 2000.

YOSHIKAWA, M.; TAKAHASHI, M.; YANG, S. Delta opioid peptides derived from plant proteins. **Curr Pharm Des**, v. 9, n. 16, p. 1325-30, 2003.

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.

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. **J Liq Chromatogr**, v. 18, n. 1. p. 93–103, 1995.

Anexo I - Espectros em MS-EI em modo SIM a 70 eV do peptídeo sintético IAVP (acima), de uma das frações da amostra HB (no meio) e de uma das frações da amostra HA. (abaixo).



Anexo II - Espectros em MS-EI em modo SIM a 70 eV do peptídeo sintético LPYPR (acima), de uma das frações da amostra HA resfriada (no meio) e de uma das frações da amostra HB com TCA. (abaixo).