



Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Departamento de Alimentos e Nutrição

Avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante de grãos de amaranto  
(*Amaranthus cruentus*)

Caroline Pazinato  
Nutricionista

Profa. Dra. Flavia Maria Netto  
Orientadora

Campinas – 2008



Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Departamento de Alimentos e Nutrição

Avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante de grãos de amaranto  
(*Amaranthus cruentus*)

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Caroline Pazinato  
Nutricionista

Profa. Dra. Flavia Maria Netto  
Orientadora

Campinas – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P298a Pazinato, Caroline  
Avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante de grãos de amaranto  
(*Amaranthus cruentus*) / Caroline Pazinato. -- Campinas, SP: [s.n.],  
2008.

Orientador: Flavia Maria Netto  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Hidrolisados protéicos. 2. Digestão *in vitro*. 3. Compostos  
fenólicos. 4. DPPH. 5. ORAC. I. Netto, Flavia Maria. II.  
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de  
Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: *In vitro* antioxidant capacity evaluation of amaranth grains (*Amaranthus cruentus*)

Palavras-chave em inglês (Keywords): Hydrolyzed protein, *In-vitro* digestion, Phenolic Compounds, DPPH, ORAC

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Flavia Maria Netto

Débora de Queiroz Tavares

Gláucia Maria Pastore

Maria Inés Genovese Rodriguez

Severino Matias de Alencar

Data de defesa: 04/06/2008

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Flavia Maria Netto  
(Orientadora)

---

Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares  
(Suplente Interno)

---

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore  
(Membro)

---

Profa. Dra. Maria Inés Genovese Rodriguez  
(Membro)

---

Profa. Dr. Severino Matias de Alencar  
(Suplente - Externo)

Campinas, 04 de junho de 2008.

## **DEDICATÓRIA**

**Aos amados pais Renato e Rosângela e às minhas queridas irmãs, em especial à Cathy. Amor Eterno!**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus - alicerce de tudo.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro ao projeto concedido na forma de Auxílio à Pesquisa processo n° 05/60860-7.

À Profa. Dra. Flávia Maria Netto, pela orientação, paciência e confiança, permitindo o desenvolvimento deste trabalho, e por toda a experiência adquirida no decorrer do vai-e-vem das correções.

Aos professores presentes na banca: Débora de Queiroz Tavares, Gláucia Maria Pastore, Maria Inês Genovese Rodriguez e Severino Matias de Alencar pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán pela gentileza em permitir a utilização de equipamentos e materiais do Laboratório de Fontes Protéicas e do NEPA.

Ao Dr. Renato Grimaldi do Laboratório de óleos e Gorduras (DTA-FEA) pelas análises realizadas.

Ao Laboratório de Análises de Alimentos (DCA-FEA), em nome de Rodrigo Scherer, pelas análises realizadas.

À Profa. Gláucia Maria Pastore e sua aluna Luciana Malta pelas análises realizadas em conjunto com o Bioaromas. À Lu que se mostrou mais que uma colega, dedicando-se às análises e aos momentos de descontraídas trocas de experiências.

Ao Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira e ao Prof. Nilo Sérgio Sabbião Rodrigues pela oportunidade, durante os PEDs, de vivenciar e acreditar que na docência. “A gente ganha pouco, mas se diverte!”. Aprendi muito com vocês!

Aos amigos e funcionários da FEA: Helena (DEA), Andréa (Carlita), Maria Inês, Éder Chico, Suzana, Fátima, Cidinha pelas trocas de experiência, momentos de distração e desabafos, tornando a caminhada mais branda.

Às companheiras do LBN. À Eliana pela paciência e pelos auxílios sempre que solicitada. À Bete pelas palavras de otimismo - sempre colocando todo mundo pra cima. Às amigas Andréa Tiengo e Liz pela recepção e por dividirem comigo suas experiências no lab. À Lucia, Sarah, Michele e Isabele pelo companheirismo. Vou sentir saudades do LBN lotado e do congestionamento dos equipamentos...

Às amigas Camila, Elis, Michely, Júlia, Cynthia, Taísa e Ro por me agüentarem. Sei que não é fácil dividir o mesmo teto que eu.

À Família Depan 2006: Aline, Cinthia, Jane, Michele, Rafa, e em especial as irmãzinhas de todas a horas Mari (Condessa) e Li. Vou sentir muitas saudades das reuniões de família e da companhia de vocês nos momentos de esfriar a cabeça! Adoro vocês!

Ao Alexandre (Conde) pelos auxílios na formatação da dissertação. Sua ajuda foi fundamental no cumprimento dos prazos.

Aos amigos e amigas que apesar da distância estavam sempre torcendo por mim: Sônia Monteiro, Milene, D'Lawery, Mila Zanetti, Matheus Diacov, Marco Antônio e à recém reencontrada Ro Rizzi.

Às irmãzinhas das antigas Ana Paula (Leitão) e Alê (a primeira mamãe da turma), e à Isa Gama pelos divertidos (ou não) finais de semana - Recarga na bateria pra agüentar mais uma longa semana em Campinas...

Ao David, pessoa especialmente presente na minha vida, pelo apoio, incentivo e carinho.

À toda a minha família querida que sempre me incentivou, vibrou comigo nas vitórias e me ofereceu carinho nos momentos de desânimo. Em especial ao vô Brito, à tia Meire, aos primos: Karime, Rayne, Giselle, Grazielle e Thiago, ao meu cunhado Henrique e às minhas irmãs Cathy e Louise. E um merecido agradecimento ao “padrasto” Henze, que demonstrou sincero interesse na minha pesquisa e contribuiu com seu valioso senso crítico e inglês britânico.

Aos amados pais, Rosângela e Renato, exemplos de amor e disciplina. Obrigada pela dedicação, apoio, carinho e pelo pulso firme nos momentos necessários. Agradeço pela família linda que construíram pra mim, um pouco exótica, mas de valores únicos!

Agradeço à todos que contribuíram para a realização deste trabalho e por fazerem parte do que sou hoje: mais do que ontem e menos do que amanhã!



*"Seja lá o que você pode fazer, ou sonha que pode, comece a fazer.  
Os intrépidos carregam gênio, mágica e poder consigo".  
(Goethe)*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Objetivo</b> .....	4
2.1 Objetivos específicos .....	4
<b>3. Revisão Bibliográfica</b> .....	5
3.1 Amaranto .....	5
3.2 Atividades bioquímicas com potencial fisiológico .....	10
3.3 Capacidade antioxidante .....	10
3.3.1 Proteínas, Peptídeos e aminoácidos .....	12
3.3.2 Compostos fenólicos .....	14
3.3.3 Tocoferóis .....	20
3.4 Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade antioxidante .....	21
3.4.1 Ensaio baseado nas reações de transferência de elétron .....	22
3.4.1.1 Método do DPPH .....	22
3.4.2 Ensaio baseado em reações de transferência de átomos de hidrogênio .....	25
3.4.2.1 ORAC .....	25
<b>4. Material e Métodos</b> .....	28
4.1 Material .....	28
4.2 Obtenção do concentrado protéico .....	28
4.3 Obtenção dos hidrolisados a partir da FDA e CPA .....	30
4.4 Digestão <i>in vitro</i> das proteínas de amaranto .....	31
4.5 Caracterização das farinhas, concentrado e hidrolisados protéicos de amaranto .....	32
4.5.1 Composição centesimal .....	32
4.5.2 Composição de ácidos graxos, esqualeno e tocoferóis na FIA e FDA .....	32
4.5.2.1 Perfil de ácidos graxos na FIA e FDA .....	32
4.5.2.2 Teor de esqualeno na FIA e FDA .....	32
4.5.2.3 Perfil de tocoferóis e tocotrienóis .....	33
4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	34
4.6 Obtenção dos extratos de amaranto .....	35
4.6.1 Obtenção de extrato aquoso .....	35
4.6.2 Obtenção de extrato metanólico .....	35
4.7 Compostos fenólicos .....	35
4.7.1 Teor de fenóis totais .....	36
4.7.2 Determinação dos compostos fenólicos .....	37
4.8 Determinação da capacidade antioxidante .....	38
4.8.1 Determinação da capacidade sequestradora de radicais (DPPH) .....	38
4.8.2 Ensaio de ORAC .....	39
4.10 Análise estatística .....	40
<b>5. Resultados e Discussão</b> .....	41
5.1 Caracterização das farinhas .....	41
5.1.1 Composição centesimal .....	41
5.1.2 Ácidos graxos, esqualeno e tocoferóis .....	41
5.1.3 Caracterização da fração protéica das farinhas de amaranto (FIA e FDA), CPA e de seus hidrolisados .....	48
5.1.4 Digestão <i>in vitro</i> .....	50
5.2 Compostos fenólicos .....	53
5.3 Capacidade antioxidante .....	60
5.3.1 Capacidade sequestradora do radical DPPH .....	60
5.3.2 ORAC .....	62
5.3.3 Relação entre capacidade antioxidante e teor de fenólicos totais .....	64
<b>6. Conclusões</b> .....	69
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	70

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>FIA</b>	Farinha integral de amaranto
<b>FDAst</b>	Farinha desengordurada de amaranto sem tratamento térmico
<b>FDAtt</b>	Farinha desengordurada de amaranto tratada termicamente
<b>HFDAst</b>	Hidrolisado da farinha desengordurada de amaranto sem tratamento térmico
<b>HFDAtt</b>	Hidrolisado farinha desengordurada de amaranto tratada termicamente
<b>DFDAst</b>	Digerido da farinha desengordurada de amaranto sem tratamento térmico
<b>DFDAtt</b>	Digerido da farinha desengordurada de amaranto tratada termicamente
<b>DHFDAst</b>	Digerido do hidrolisado da farinha desengordurada de amaranto sem tratamento térmico
<b>DHFDAtt</b>	Digerido do hidrolisado farinha desengordurada de amaranto tratada termicamente
<b>CPAst</b>	Concentrado protéico de amaranto sem tratamento térmico
<b>CPAtt</b>	Concentrado protéico de amaranto tratado termicamente
<b>HPAst</b>	Hidrolisado do concentrado protéico de amaranto sem tratamento térmico
<b>HPAtt</b>	Hidrolisado do concentrado protéico de amaranto tratado termicamente
<b>DCPAst</b>	Digerido do concentrado protéico de amaranto sem tratamento térmico
<b>DCPAtt</b>	Digerido do concentrado protéico de amaranto tratado termicamente
<b>DHPAst</b>	Digerido do hidrolisado do concentrado protéico de amaranto sem tratamento térmico
<b>DHPAtt</b>	Digerido do hidrolisado do concentrado protéico de amaranto tratado termicamente

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Cortes transversal e longitudinal do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus*). (Fonte: Adaptado de BETSCHART *et al.*, 1981). ..... 7

Figura 2. Doenças e danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS). (Adaptado de Madhujith e Shahidi, 2005). .....12

Figura 3. Estrutura química dos tocoferóis. A – Tocols; B – Tocotrienóis. ....20

Figura 4. Fluxograma da obtenção do concentrado protéico de amaranto. (FDA - farinha desengordurada de amaranto e CPA - concentrado protéico de amaranto). .....29

Figura 5. Estrutura Química do Trolox .....38

Figura 6. Perfis cromatográficos (CG) de ácidos graxos: a) padrões, b) Farinha integral de amaranto (FIA) e c) Farinha desengordurada de amaranto (FDA). Os ácidos graxos estão representados por: 1 - merístico; 2- palmítico; 3- palmitoléico; 4- esteárico; 5- oléico; 6- linoléico; 7- linolênico; 8- araquídico; 9- araquidônico; 10- behênico; 11- erúcido; 12- lignocérico; (\*) esqualeno sem identificação comprovada. ....44

Figura 7. Perfis cromatográficos (CLAE) de esqualeno: a) padrão, b) Farinha integral de amaranto (FIA) e c) Co-cromatografia (FIA + padrão). .....45

Figura 8. Perfis cromatográficos (CLAE) dos tocoferóis e tocotrienóis: a) padrões, b) Farinha integral de amaranto (FIA) e c) Farinha desengordurada de amaranto (FDA). .....47

Figura 9. Eletroforese em SDS-PAGE da FDA, CPA e hidrolisados (amostras a 0,4% de proteína). Coluna 1 – padrões; Coluna 2 – FIA; Coluna 3 – FDAst; Coluna 4 – FDAtt; Coluna 5 – CPAst; Coluna 6 – CPAtt. Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas. ....49

Figura 10. Eletroforese em SDS-PAGE Tricina da FDA, CPA e hidrolisados. FDAst e FDAtt a 0,4% de proteína e as demais amostras a 2%. Coluna 1 - padrões; Coluna 2 - FDAst; Coluna 3 - FDAtt; Coluna 4 - HFDAst; Coluna 5 - HFDAAtt; Coluna 6 - CPAst; Coluna 7 - CPAtt; Coluna 8 - HPAst; Coluna 9 – HPAtt. Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas. ....51

Figura 11. Eletroforese (SDS-PAGE Tricina) dos digeridos da FDA, CPA e hidrolisados. Amostras a 2% de proteína. Coluna 1 - padrões; Coluna 2 - DFDAst; Coluna 3 - DFDAAtt; Coluna 4 - DHFDAst; Coluna 5 - DHFDAAtt. Coluna 6 - DCPAst; Coluna 7 - DCPAtt; Coluna 8 - DHPAst; Coluna 9 - DHPAtt. Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas. ....53

Figura 12. Perfis cromatográficos (CLAE) dos compostos fenólicos: A) FDA; B) HFDAAtt; C) DFDAAtt; D) DHFDAAtt. As figuras a direita referem-se aos cromatogramas de identificação da catequina (280 nm) as figuras a esquerda do p-cumárico (320 nm). Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas. ....57

Figura 13. Estrutura química dos compostos fenólicos identificados no *Amaranthus cruentus*. ....58

Figura 14.. Correlação entre a capacidade antioxidante (DPPH ou ORAC) e o teor de fenóis totais (n = 15). .....66

Figura 15. Correlação entre os compostos fenólicos identificados (catequina e p-cumárico) e a capacidade antioxidante (DPPH ou ORAC) .....67

Figura 16. Correlação entre os resultados obtidos por capacidade seqüestradora de radicais DPPH e capacidade seqüestradora de radicais peroxil (ORAC) (n = 15). .....68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal da farinha integral (FIA) e das farinhas desengorduradas de amaranto, sem e com tratamento térmico prévio (FDAst e FDAtt) .....	41
Tabela 2. Composição de ácidos graxos nas frações lipídicas das farinhas integral (FIA) e desengordurada (FDA) de amaranto .....	43
Tabela 3. Teor de tocoferóis e tocotrienóis das farinhas integral e desengordurada de amaranto (FIA e FDA) .....	46
Tabela 4. Teor de proteínas e lipídios nos concentrados protéicos sem e com tratamento térmico prévio (CPAst e CPAtt) .....	48
Tabela 5. Teor protéico e grau de hidrólise (GH) da farinha desengordurada, concentrado e hidrolisados protéicos de <i>Amaranthus cruentus</i> , antes e após a digestão <i>in vitro</i> .....	52
Tabela 6. Teor de fenóis totais (mg EAG/ g amostra) nas farinhas, concentrado protéico e hidrolisados protéicos de <i>Amaranthus cruentus</i> , antes e após a digestão <i>in vitro</i> .....	54
Tabela 7. Teores de catequina e p-cumárico detectados nas farinhas, concentrado e hidrolisados protéicos de <i>Amaranthus cruentus</i> , antes e após digestão <i>in vitro</i> .....	59
Tabela 8. Capacidade seqüestrante do radical DPPH de farinhas, concentrados e hidrolisados protéicos de <i>Amaranthus cruentus</i> , antes e após digestão <i>in vitro</i> . Resultados expressos em $\mu\text{mol TE/g}$ amostra .....	62
Tabela 9. Capacidade seqüestrante de radicais peroxil (valor de ORAC) de farinhas, concentrados e hidrolisados protéicos de <i>Amaranthus cruentus</i> , antes e após digestão <i>in vitro</i> . Resultados estão expressos em $\mu\text{mol TE/g}$ amostra. ....	63

## RESUMO

O amaranto se destaca por seu perfil protéico, rico em aminoácidos essenciais e pela presença de outros compostos tais como: fibras, esqualeno, tocoferóis, tocotrienóis e compostos fenólicos, que lhe confere propriedades especiais, incluindo propriedade antioxidante. A fácil adaptação da planta a diferentes condições climáticas, juntamente com as suas qualidades nutricionais e funcionais, aumentam o interesse em introduzir a cultura do amaranto no Brasil. Apesar de bem caracterizado quimicamente e de apresentar compostos com potencial fisiológico, poucos estudos foram realizados para avaliar o potencial do grão de amaranto como alimento funcional. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade antioxidante dos diferentes produtos obtidos a partir do grão integral de amaranto (*Amaranthus cruentus*). Após a moagem e o desengorduramento dos grãos para a obtenção da farinha desengordurada, diferentes processos, incluindo a hidrólise com Alcalase, foram utilizados na produção dos diversos produtos de amaranto que foram posteriormente digeridos *in vitro* com as enzimas pepsina e pancreatina. Os efeitos dos processos e da digestão *in vitro* das frações protéicas, e o efeito dos compostos fenólicos totais na capacidade antioxidante, em extrato aquoso e metanólico, foram avaliados utilizando o ensaio da capacidade seqüestradora de radicais DPPH e o ensaio de ORAC. O teor de fenóis totais apresentou elevada correlação com a capacidade antioxidante quando avaliada no extrato metanólico. Entretanto, a correlação foi menor quando avaliada no extrato aquoso, sugerindo que os compostos hidrossolúveis podem interferir nas avaliações. A hidrólise com Alcalase elevou significativamente o potencial antioxidante das amostras, de 2 a 4 vezes a capacidade seqüestradora de radicais DPPH e de 13 a 15 vezes os valores de ORAC. A digestão *in vitro* aumentou a capacidade antioxidante medida por ambos os ensaios (até 7 vezes para a capacidade seqüestradora de radicais DPPH e 12 para o valor de ORAC), especialmente para o concentrado protéico e seus hidrolisados. O elevado teor de fenóis totais liberados e o aumento da capacidade antioxidante dos produtos de amaranto após a digestão *in vitro* sugerem que o mesmo ocorre após a digestão fisiológica. Os resultados sugerem que a inclusão de produtos de amaranto na dieta, especialmente concentrado protéico e seus hidrolisados, pode promover benefícios à saúde.

**Palavras-chave:** Concentrado protéico, hidrolisado protéico, digestão *in vitro*, compostos fenólicos, DPPH, ORAC.

## ABSTRACT

Amaranth is well known for its protein profile, rich in essential amino acids and the presence of other compounds such as fiber, squalen, tocols (tocopherols and tocotrienols) and phenolic compounds that are responsible for its special properties, including antioxidant capacity. The easy adaptation of the plant to different climate conditions, together with its nutritional qualities and functional properties, increase the interest to introduce the culture of amaranth in Brazil. Despite being well characterized chemically and exhibiting compounds with physiological potential, few studies have been conducted to evaluate the potential of amaranth grain, as a functional food. This study aims to evaluate the antioxidant capacity of different products obtained from amaranth grain (*Amaranthus cruentus*). After milling and defatting the grain to obtain defatted amaranth flour, different processes, including Alcalase hydrolysis, were used to produce a variety of products that were digested *in vitro* with pepsin and pancreatin. The effects of the processes and of the digestion *in vitro* of the protein fractions, and the effect of the total content of phenolic compounds on the antioxidant capability in aqueous and methanolic extracts were evaluated using scavenging capacity of DPPH radical and ORAC assays. Total phenolic compounds content showed high correlation with the antioxidant capacity, when evaluated in methanolic extract. However, the correlation was lower when using the aqueous extract, suggesting that water soluble compounds may interfere in these evaluations. Hydrolysis with Alcalase increased significantly the antioxidant potential, from 2 to 5 times the scavenging DPPH capacity and 13 to 15 the ORAC values. *In vitro* digestion increased the antioxidant capacity measured by both assays (up to 7 times for scavenging DPPH capacity and 12 times for ORAC assays), especially for protein concentrate and its hydrolysates. The high content of phenolic compounds released and the increase in antioxidant capacity after *in vitro* digestion of the amaranth products suggests that the same occurs after the physiological digestion. These results suggest that the inclusion of these products, especially concentrate and its hydrolysates, in the diet should promote health benefits.

**Keywords:** protein concentrate, hydrolyzed protein, *in vitro* digestibility, phenolic compounds, DPPH, ORAC.

## **1. Introdução**

Os radicais livres ou ROS (sigla em inglês para espécies reativas de oxigênio) podem ser produzidos pelo organismo de forma endógena, como resultado de processos metabólicos, entre eles, o metabolismo do oxigênio, e exogenamente por compostos carcinogênicos e radiações ionizantes (MELLO *et al.*, 2006; MENDIS, RAJAPAKSE e KIM, 2005). No organismo, os ROS (radical hidroxila, ânion superóxido e oxigênio *singlet*) reagem com biomoléculas tais como proteínas e lipídios, causando sérias lesões na membrana celular e em seu DNA (MADHUJITH e SHAHIDI, 2005; MELLO *et al.*, 2006).

O corpo humano é munido de um efetivo sistema de defesa celular capaz de regular os níveis de ROS através dos sistemas enzimático e não enzimático (Kim *et al.*, 2005). Entre as enzimas com ação antioxidante estão a superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase. O sistema de defesa ainda inclui antioxidantes de alto peso molecular, como albumina e ferritina, e antioxidantes de baixo peso molecular como a glutathione e ácido úrico (ISSA, VOLATE e WARGOVICH, 2006). O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a formação e a detoxificação dos radicais livres pelos sistemas de defesa do organismo (ISSA, VOLATE e WARGOVICH, 2006; Kim *et al.*, 2005).

Acredita-se que o estresse oxidativo seja o grande responsável pelas inúmeras doenças decorrentes do próprio processo de envelhecimento, incluindo certos tipos de câncer, doenças neurodegenerativas (MADHUJITH e SHAHIDI, 2005), doenças cardiovasculares (aterosclerose) (MADHUJITH e SHAHIDI, 2005; MENDIS, RAJAPAKSE e KIM, 2005) e doenças inflamatórias (MENDIS, RAJAPAKSE e KIM, 2005).

Compostos antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; e o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através de



doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (MATTHÄUS, 2002).

Alguns nutrientes são conhecidos por suas propriedades antioxidante e coadjuvante no sistema de defesa do organismo (MENDIS, RAJAPAKSE e KIM, 2005). Entre eles, os mais conhecidos são as vitaminas E (em castanhas e sementes oleaginosas), C (em frutas cítricas) e carotenóides (em legumes e frutas de coloração amarela e laranja) e os compostos fenólicos (em grãos, verduras e chás). Peptídeos e aminoácidos livres, embora menos conhecidos, não são menos importantes (PARK, KOO e CARVALHO, 1997). Estudos também têm relatado que proteínas de diferentes fontes apresentam atividade antioxidante. Segundo Tong *et al* (2000), as proteínas são capazes de exercer esta atividade por seqüestrarem metais de transição e/ou radicais livres pelos aminoácidos tirosina e cisteína. Os hidrolisados enzimáticos de proteínas de origem animal como ovo, leite, peixes, entre outros, têm sido estudados por sua significativa propriedade antioxidante (AMAROWICZ e SHAHIDI, 1997; JE, PARK e KIM, 2005; MENDIS, RAJAPAKSE e KIM, 2005; WANG e XIONG, 2005; ZHU, ZHOU e QIAN, 2006).

Os efeitos nutracêuticos do amaranto (antioxidante, hipocolesterolemia e anticarcinogênico) estão relacionados, possivelmente, à presença de compostos tais como: fibras, esqualeno, tocoferóis, tocotrienóis, compostos fenólicos (BREENE, 1991; DANZ e LUPTON, 1992; HE *et al.*, 2002; LEHMANN, PUTNAM e QURESHI, 1994; LEHMANN, 1996; ESCUDERO *et al.*, 2004).

Czerwinski *et al.* (2004) verificaram que tanto a aveia como o amaranto apresentaram atividade antioxidante, determinada utilizando modelos *in vitro* tais como o do  $\beta$ -caroteno e do óxido nítrico (NO), usando butilato hidroxianisole (BHA) como padrão. A aveia apresentou maior atividade antioxidante (34,6%) que as farinhas de amaranto (23,2%-26,0%), possivelmente em decorrência da maior quantidade de compostos fenólicos. Tsaliki, Lagouri e Doxastakis (1999) reportaram a atividade antioxidante da farinha de tremço e derivados e verificaram maior atividade antioxidante desta farinha quando comparada à farinha de soja, também decorrente da presença de altas concentrações de fenóis totais.

A composição aminoacídica do amaranto com a presença dos aminoácidos essenciais e de aminoácidos conhecidos por sua capacidade antioxidante: sulfurados (cisteína e metionina), aromáticos (tirosina e triptofano), lisina, histidina, prolina, glicina, alanina e treonina também podem conferir capacidade antioxidante ao amaranto (MENDONÇA, 2006).

Apesar de o amaranto ter sido bem caracterizado quimicamente e apresentar componentes relacionados a diferentes atividades bioquímicas com potencial fisiológico, pouco se conhece sobre sua capacidade antioxidante. Ao avaliar o potencial antioxidante do amaranto, este trabalho poderá fornecer informações que possam levar à maior utilização do amaranto como alimento funcional, incentivando e agregando valor a esta cultura ainda incipiente no Brasil.

## **2. Objetivo**

Avaliar, *in vitro*, a capacidade antioxidante de produtos derivados de grãos de *Amaranthus cruentus* (variedade BR-Alegria).

### **2.1 Objetivos específicos**

- Produzir e caracterizar as farinhas de amaranto (farinha integral e farinha desengordurada), concentrado e os hidrolisados protéicos;
- Caracterizar a fração protéica e os compostos fenólicos dos produtos;
- Avaliar o potencial antioxidante das farinhas integral e desengordurada, do concentrado protéico, e hidrolisados e digeridos protéicos de amaranto.

### **3. Revisão Bibliográfica**

#### **3.1 Amaranto**

O amaranto é uma planta originária da América Central, muito comum na dieta da América pré-Colombiana (MARCÍLIO *et al.*, 2003; TOSI *et al.*, 2001). Nas últimas décadas, o cultivo de amaranto reapareceu não somente no México e América Central, mas também se espalhou pela América Latina, Ásia, Europa e alguns países da África (ESCUDERO *et al.*, 2004). Na década de 80, a National Academy of Science (EUA) o incluiu entre as 36 culturas mais promissoras para alimentar a humanidade. O potencial do amaranto como fonte de nutrientes é elevado, o que gerou o interesse em alguns países de aproveitá-lo como fonte alimentar (BRESSANI, 1989; COELHO, 2006).

O aproveitamento da planta é integral: as folhas são consumidas como verdura e as sementes como cereal, podendo ser utilizadas tanto para nutrição humana quanto para animal (ESCUDERO *et al.*, 2004; MARTIROSYAN, MIROSHNICHENKO e KULAKOVA, 2007). Estudos arqueológicos conduzidos no Peru, México e Estados Unidos relataram o cultivo do amaranto na região em períodos antes de Cristo. Os incas e astecas reconheciam a importância deste alimento e o incluíram em suas cerimônias religiosas, mas o seu consumo foi proibido pelos colonizadores espanhóis pela associação desse alimento com os rituais pagãos (BRESSANI, 1989; TEUTONICO e KNORR, 1985).

O amaranto pertence à classe das dicotiledôneas e família das *amarantáceas*. Suas espécies são morfologicamente semelhantes e possuem sementes pequenas com formato lenticular, de 1,0 a 1,5 mm e peso de 0,6 a 1,2 mg. A planta pode alcançar 2 m de altura. As raízes profundas da planta de amaranto favorecem o uso mais eficiente da água, permitindo seu cultivo em regiões de climas áridos e semi-áridos. Suas principais características agrônômicas são: resistência à seca, ao calor e às pestes; rápido crescimento; habilidade de produzir grande biomassa em espaço reduzido; potencial de uso

como forragem (BRESSANI, 1989; COELHO, 2006; GUILLEN-PORTAL, BALTENSPERGER e NELSON, 1999).

Foram identificadas mais de 60 espécies de amaranto, sendo três delas as mais consumidas e estudadas: *Amaranthus cruentus* L., *Amaranthus caudatus* L. e *Amaranthus hipocondriacus* L. (BARBA DE LA ROSA *et al.*, 1992; BECKER, 1989; BRESSANI, 1989; SEGURA-NIETO *et al.*, 1992; TOSI *et al.*, 2001). Devido às características e propriedades semelhantes aos grãos de cereais, é considerado um pseudocereal (BECKER, 1989; BREENE, 1991; TOSI *et al.*, 2001; MARCÍLIO *et al.*, 2003).

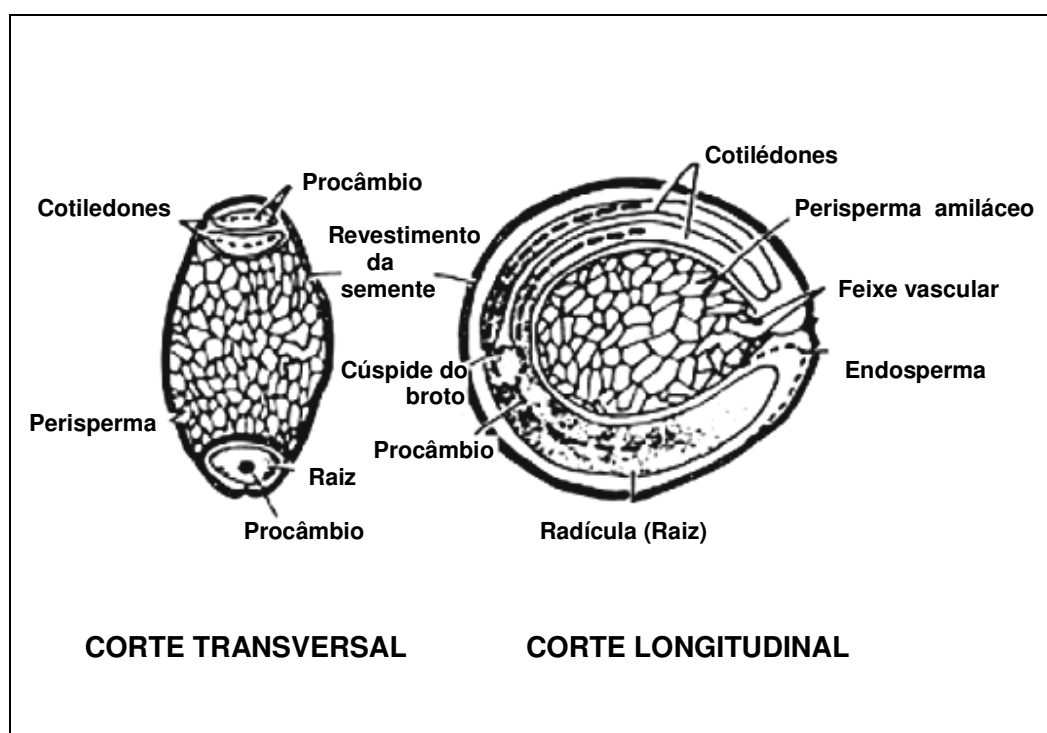
O amaranto possui 12 a 22% de proteínas (BARBA DE LA ROSA *et al.*, 1992; BECKER, 1989; BREENE, 1991; SEGURA-NIETO *et al.*, 1992; TOSI *et al.*, 2001; ESCUDERO *et al.*, 2004), 50 a 66% de amido (BECKER, 1989; BREENE, 1991; TOSI *et al.*, 2001; ESCUDERO *et al.*, 2004) e 3,1 a 11,5% de lipídios (BECKER, 1989; BREENE, 1991; TOSI *et al.*, 2001; MARCÍLIO *et al.*, 2003). A quantidade de fibra alimentar encontrada por Tosi *et al.* (2001) foi de 14,2%, sendo 8,1% correspondente às fibras insolúveis e 6,1% às fibras solúveis. O amaranto também possui altos teores de cálcio (187 mg/100g), fósforo (455 mg/100 g), ferro (10 mg/100 g), potássio (420 mg/100 g), magnésio (288 mg/100 g), zinco (3,8 mg/100 g), cobre (0,9 mg/100 g), sódio (32 mg/100 g) e Riboflavina (0,21 mg/100 g) comparado aos encontrados em cereais (BECKER, 1989). Segundo Becker (1989), os carotenóides não estão presentes no grão de amaranto e os fatores antinutricionais taninos, inibidores de tripsina e fitatos, ocorrem em baixos níveis.

Uma das características mais importantes do grão de amaranto é o alto teor de proteínas de estocagem e melhor balanço de aminoácidos essenciais do que o de cereais e leguminosas, sendo semelhante ao da caseína e ao padrão da FAO/WHO – 1973 (BECKER, 1989; SEGURA-NIETO *et al.*, 1992; SILVA-SANCHEZ *et al.*, 2004). O teor de proteínas do grão é superior aos 10% encontrado nos cereais. No entanto, a quantidade e qualidade protéica variam de acordo com a espécie, sendo que o *A. caudatus* contém as menores quantidades

e a espécie *A. cruentus*, as maiores. Podem ocorrer variações mesmo dentro das espécies devido a diferenças genéticas, condições ambientais e práticas de cultivo (BRESSANI, 1989).

As farinhas podem apresentar diferentes composições em função do grau de extração, pois há maior concentração de nutrientes no pericarpo e germe da semente quando comparado ao grão inteiro. O grão integral é composto por 18,5% de proteína, 7,4% de lipídeos, 3,3% de fibra e 3,2% de cinzas, enquanto o pericarpo e o germe apresentam 42,0% de proteína, 19,2% de lipídeos, 7,7% de fibra e 7,0% de cinzas. O perisperma possui basicamente amido na forma de amilopectina com 7,7% de proteína, 2,3% de lipídeos, 0,9% de fibra e 1,2% de cinzas (BETSCHART *et al.*, 1981).

A Figura 1 mostra a estrutura do grão de Amarantho.



**Figura 1.** Cortes transversal e longitudinal do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus*). (Fonte: Adaptado de BETSCHART *et al.*, 1981).

As proteínas do amaranto possuem elevados teores de lisina, triptofano e aminoácidos sulfurados (ESCUADERO *et al.*, 2004; SEGURA-NIETO *et al.*, 1992), porém são limitantes em leucina e isoleucina (SEGURA-NIETO *et al.*, 1992). Os cereais são geralmente pobres em lisina, sendo que o milho também é pobre em triptofano, e o arroz e o trigo em treonina. O alto teor de aminoácidos sulfurados torna o amaranto um bom complemento para as leguminosas que tem estes aminoácidos como limitante (ESCUADERO *et al.*, 2004; SEGURA-NIETO *et al.*, 1992).

Segundo Breene (1991), as frações protéicas do amaranto são compostas de aproximadamente 65% de albumina, 17% de globulina, 11% de prolamina e 7% de glutelina. Outros autores concordam quanto às maiores frações serem de albumina e globulina, mas reportam que a menor fração protéica é de prolamina (BARBA DE LA ROSA *et al.*, 1992; LEHMANN, 1996). De acordo com Martinez e Añón (1996), a proporção das diferentes frações na proteína isolada e suas propriedades funcionais e nutricionais dependem do método de extração usado.

Tanto para o amaranto como para a soja, as albuminas e as globulinas são as principais proteínas de estocagem (MARTINEZ, CASTELLANI e AÑÓN, 1997). As globulinas mais importantes do amaranto são as 11S, globulina P e pequena quantidade de globulina 7S (CASTELLANI, MARTINEZ e AÑÓN, 2000; AVANZA e AÑÓN, 2007). As albuminas são ricas em aminoácidos sulfurados, lisina e valina, as globulinas em lisina e valina, as prolaminas em leucina, treonina e fenilalanina, e as glutelinas em leucina, treonina, histidina e pobres em lisina (BARBA DE LA ROSA *et al.*, 1992; SEGURA-NIETO *et al.*, 1992). A fração 11S tem valor nutricional superior às demais frações, devido à presença de vários aminoácidos essenciais (triptofano, metionina, lisina, histidina, fenilalanina, valina e isoleucina) (MARCONE, 1999). O conteúdo de gliadina, uma prolamina de baixo peso molecular, menor que 0,01% em algumas espécies, torna o amaranto útil para a produção de alimentos aos portadores de doença celíaca (BECKER, 1989; TOSI *et al.*, 2001). Segundo o estudo comparativo de Gorinstein *et al.* (1991), o amaranto apresentou menor teor de gliadina que os cereais aveia, milho e arroz.

A fração lipídica é composta predominantemente de ácidos graxos insaturados. Os ácidos graxos presentes em maior quantidade são linoléico (47%), oléico (26%) e palmítico (19%). A razão entre os ácidos graxos saturados e insaturados varia de 0,12 a 0,5 dependendo da espécie (BERGER *et al.*, 2003; YÁNEZ *et al.*, 1994).

O óleo do amaranto é relativamente rico em tocoferóis (vitamina E) e tocotrienóis (BREENE, 1991). Tocotrienóis são análogos insaturados da vitamina E, que têm demonstrado ação reguladora no metabolismo do colesterol, atividade antitumoral e alta capacidade antioxidante *in vitro*. Tocoferóis e tocotrienóis têm importante propriedade antioxidante (LEHMANN, PUTNAM e QURESHI, 1994; ESCUDERO *et al.*, 2004). Segundo Lehmann, Putnam e Qureshi, (1994), as variedades de tocoferóis mais encontrados em várias espécies de amaranto pesquisadas foram  $\alpha$ -tocoferol (2,97 a 15,65 mg/kg de grão),  $\beta$ -tocotrienol (5,92 a 11,47 mg/kg de grão) e  $\gamma$ -tocotrienol (0,95 a 8,69 mg/kg de grão).

O esqualeno é outro composto que aparece com destaque na fração lipídica do grão de amaranto. É um precursor biossintético dos esteróides, entre eles, o colesterol. A redução do risco de vários tipos de câncer estaria associada ao esqualeno, que também estaria relacionado à redução do colesterol sérico quando associado ou não a tocotrienóis (HE *et al.*, 2002). O óleo de amaranto apresenta quantidades superiores (2,4 a 8,0%) às da maioria dos óleos vegetais, como de oliva, de germe de trigo e de farelo de arroz e de algodão (BECKER *et al.*, 1981; BECKER, 1989; HE e CORKE, 2003).

O amaranto é considerado uma excelente fonte de fibras insolúveis, composta principalmente por celulose e lignina, com teores superiores aos encontrados em cereais (SAUNDERS e BECKER, 1984). Tiengo (2007), estudando as fibras dietéticas da farinha desengordurada de *A. cruentus*, obteve teor de 6% de fibras totais, das quais 5% eram fibras insolúveis e 1% fibra solúvel.

Os efeitos nutracêuticos (antioxidante, hipocolesteremiante e anticarcinogênico) do amaranto estão relacionados, possivelmente, à presença de



compostos como: fibras, esqualeno, tocoferóis, tocotrienóis, compostos fenólicos (BREENE, 1991; DANZ e LUPTON, 1992; LEHMANN, PUTNAM e QURESHI, 1994; LEHMANN, 1996; ESCUDERO *et al.*, 2004).

A adaptabilidade da planta juntamente às qualidades nutricionais e funcionais do amaranto vem agregando valor ao crescente interesse em trazer esta planta para o cultivo comercial. O *Amaranthus cruentus* BR – Alegria originou-se de uma linhagem procedente dos Estados Unidos, foi trazida e adaptada ao solo brasileiro pela Embrapa Cerrados a partir do ano de 1998. A Embrapa Cerrados desenvolve, desde então, um projeto para introdução da cultura do amaranto como cultivo secundário em regiões de plantio de soja (MENDONÇA, 2006). Observou-se tempo médio de cultivo de 90 dias para colheita e rendimento de 2.359 kg por hectare plantado (MENDONÇA, 2006).

### **3.2 Atividades bioquímicas com potencial fisiológico**

Alimento funcional é a denominação atribuída ao alimento que além de suas funções nutricionais como fonte de energia e de substratos para crescimento e desenvolvimento humano, possui em sua composição uma ou mais substâncias (nutriente ou não nutriente) capazes de agir no sentido de modular processos metabólicos ou fisiológicos com o objetivo de melhorar as condições de saúde, promover o bem-estar e reduzir os riscos do aparecimento precoce de doenças crônico-degenerativas (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 1999; SGARBIERI e PACHECO, 1999).

De acordo com Sgarbieri e Pacheco (1999), para classificar um alimento como funcional, não é suficiente conter substâncias com propriedades fisiológicas ativas no alimento. É necessário também que tais substâncias se apresentem em quantidades suficientes e adequadas, para produzir o efeito biológico desejado.

### **3.3 Capacidade antioxidante**

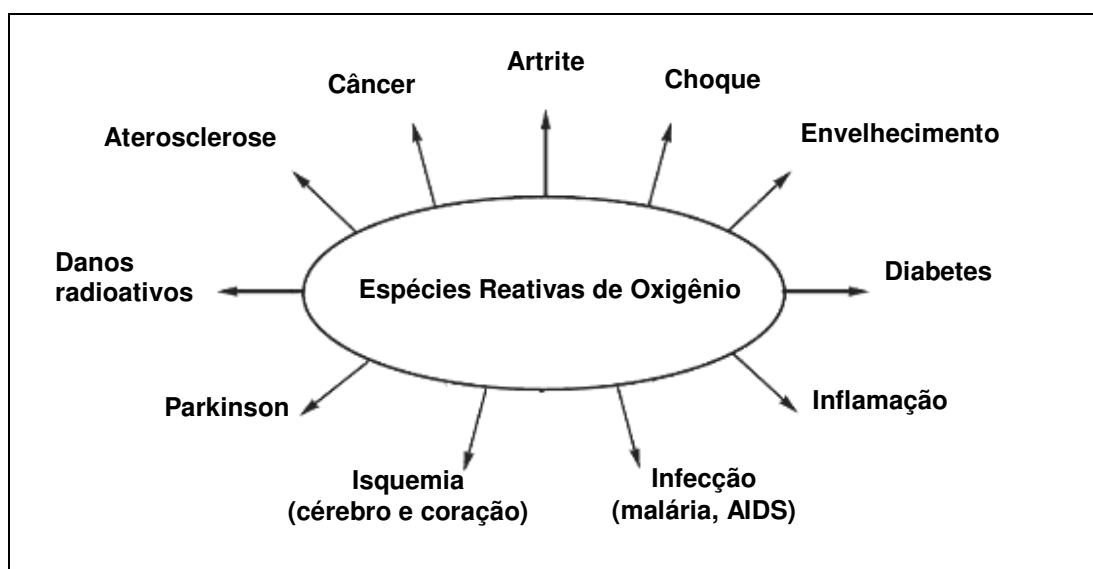
Na última década, estudos com antioxidantes naturais tiveram um enorme desenvolvimento (PEÑA-RAMOS, XIONG e ARTEAGA, 2004). As suspeitas de que os antioxidantes sintéticos são carcinogênicos dirige as pesquisas aos antioxidantes naturais, principalmente os encontrados em plantas (SINGH, MURTHY e JAYAPRAKASHA, 2002). O objetivo é que estes compostos venham substituir os artificiais ou atuar em conjunto com os mesmos, reduzindo a sua quantidade nos alimentos (SOARES, 2002).

A oxidação causa várias alterações indesejáveis nos alimentos, que podem levar tanto às mudanças nas características sensoriais quanto à redução do valor nutricional. Por esta, razão os antioxidantes possuem um importante papel no processamento e estocagem dos alimentos (KLIMCZAK e PACHOLEK, 2002).

Em organismos vivos, as espécies reativas de oxigênio (ROS) ou radicais livres (radical hidroxila, ânion superóxido e oxigênio *singlet*) reagem com biomoléculas como proteínas e lipídios, causando sérias lesões na membrana celular e em seu DNA. Existem indícios de que estes processos estejam fortemente associados à carcinogênese e aos processos degenerativos da idade (MADHUJITH e SHAHIDI, 2005; MELLO *et al.*, 2006).

O corpo humano é munido de um efetivo sistema de defesa capaz de neutralizar a ação tóxica dos ROS. Este sistema inclui enzimas com ação antioxidante, como superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase. O sistema de defesa ainda inclui antioxidantes de alto peso molecular, como albumina e ferritina, e antioxidantes de baixo peso molecular como glutathione e ácido úrico (ISSA, VOLATE e WARGOVICH, 2006). Alguns nutrientes encontrados em alimentos, como os compostos fenólicos (flavonóides, derivados do ácido cinâmico, cumarinas, tocoferóis e ácidos orgânicos polifuncionais), possuem capacidade antioxidante e atuam como coadjuvantes neste sistema de defesa (MENDIS, RAJAPAKSE e KIM, 2005).

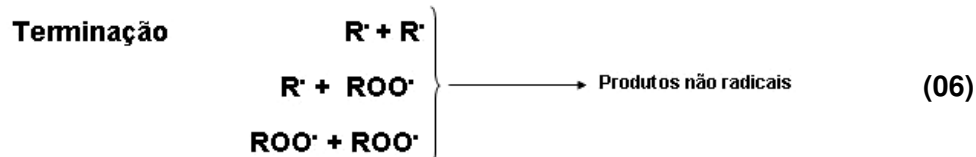
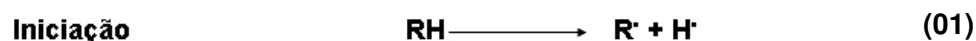
O estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre a produção das espécies reativas de oxigênio e a detoxificação dos mesmos (ISSA, VOLATE e WARGOVICH, 2006). Acredita-se que os radicais livres são os grandes responsáveis por inúmeras doenças, incluindo certos tipos de câncer, doenças neurodegenerativas (MADHUJITH e SHAHIDI, 2005), doenças cardiovasculares (aterosclerose) (MADHUJITH e SHAHIDI, 2005; MENDIS, RAJAPAKSE e KIM, 2005) e doenças inflamatórias (MENDIS, RAJAPAKSE e KIM, 2005) (Figura 2). Os radicais livres podem ser produzidos de forma endógena, como resultado de processos metabólicos e metabolismo do oxigênio, e/ou exogenamente por compostos carcinogênicos e radiações ionizantes (MELLO *et al.*, 2006; MENDIS, RAJAPAKSE e KIM, 2005).



**Figura 2.** Doenças e danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS). (Adaptado de Madhujith e Shahidi, 2005).

A autoxidação é um processo natural que ocorre entre o oxigênio molecular e os lipídios insaturados presentes no meio. O mecanismo de autoxidação é uma reação em cadeia, que ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Equações 01 a 06). A reação pode ser iniciada pela presença de oxigênio singlet

( $^1O_2$ ), metais de transição, ou pela exposição à luz (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992). Os antioxidantes atuam reduzindo agentes (radical livre terminal), quelando minerais e seqüestrando oxigênio singlet (MELLO *et al.*, 2006).



Os antioxidantes são classificados, de acordo com seu mecanismo de ação, em duas categorias: os antioxidantes preventivos, e os antioxidantes que interrompem a reação oxidativa (KLIMCZAK e PACHOLEK, 2002; OU *et al.*, 2002). Os preventivos, como a superóxido dismutase, catalase, peroxidase e a transferrina, inibem a formação dos ROS impossibilitando a etapa de iniciação. Os antioxidantes que interrompem a reação oxidativa, também conhecidos como *chain-breaking*, seqüestram os radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila ( $RO^\bullet$ ) e peroxila ( $RO_2^\bullet$ ), inibindo esta etapa do processo oxidativo. Os antioxidantes *chain-breaking* mais conhecidos são: as vitaminas C e E, ácido úrico, bilirrubina, compostos fenólicos, entre outros (MATTHÄUS, 2002; OU *et al.*, 2002).

Os compostos capazes de interromper a autoxidação podem atuar por duas vias: a primeira envolve a transferência de átomos de hidrogênio (TAH), o radical livre capta o átomo de hidrogênio do antioxidante, resultando na formação de um

radical estável do antioxidante, e a reação oxidante é interrompida; a segunda é baseada na transferência de elétron (TE) (OU *et al.*, 2002). A Equação 07 a seguir ilustra o processo antioxidante de transferência de átomos de hidrogênio (TAH).



A segunda via de ação do antioxidante (TE), é ilustrada pelas Equações 08 e 09:



### 3.3.1 Proteínas, Peptídeos e aminoácidos

Os aminoácidos tirosina, metionina, histidina, lisina, triptofano (CHEN *et al.*, 1996; PEÑA-RAMOS, XIONG e ARTEAGA, 2004), prolina (MENDIS, RAJAPAKSE e KIM, 2005; PEÑA-RAMOS, XIONG e ARTEAGA, 2004), glicina, alanina (MENDIS, RAJAPAKSE e KIM, 2005), treonina (AMAROWICZ e SHAHIDI, 1997) e cisteína (SINHA *et al.*, 2006) têm capacidade de retardar a oxidação lipídica. Segundo Wang e Xiong (2005), os resíduos de cisteína e triptofano presentes na proteína da batata e liberados após hidrólise atuam como potentes antioxidantes.

Peptídeos bioativos têm sido obtidos a partir de diferentes proteínas, pelo uso de enzimas gastrointestinais, como pepsina e tripsina. Outras enzimas isoladas ou em combinação, também são utilizadas, entre estas são incluídas a alcalase, quimotripsina, pancreatina, pepsina e enzimas de fonte bacteriana ou fúngica (KORHONEN e PIHLANTO, 2005). Segundo Zhu, Zhou e Qian (2006), várias atividades fisiológicas foram detectadas em hidrolisados enzimáticos de proteínas alimentares. Peptídeos e hidrolisados de proteínas de origem animal e vegetal têm sido estudados por suas significantes propriedades antioxidantes (AMAROWICZ e SHAHIDI, 1997; WANG e XIONG, 2005).

Estudos têm demonstrado a capacidade antioxidante dos hidrolisados de proteínas como: albumina do ovo, caseína, elastina (WANG e XIONG, 2005), albumina sérica bovina (JE, PARK e KIM, 2005), proteína da gema de ovo (SAKANAKA *et al.*, 2004), de peixes (JE, PARK e KIM, 2005; MENDIS, RAJAPAKSE e KIM, 2005) e as miofibrilares (WANG e XIONG, 2005).

Wu, Chen e Shiau (2003) comprovaram a propriedade antioxidante do hidrolisado protéico do “mackerel” (*Scomber austriasicus*), utilizando radicais DPPH ( $\alpha,\alpha$ -diphenil- $\beta$ -picrylhydrazyl) e o método do tiocianato férrico. A habilidade dos hidrolisados protéicos de inibir alterações causadas pela oxidação lipídica parece estar relacionada à composição (PEÑA-RAMOS, XIONG e ARTEAGA, 2004), à seqüência dos aminoácidos (CHEN *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2001; KORHONEN e PIHLANTO, 2005; SUETSUNA, UKEDA e OCHI, 2000; WANG *et al.*, 2006) e ao tamanho dos peptídeos liberados na hidrólise (WANG e XIONG, 2005; WANG *et al.*, 2006). De acordo com Cumby *et al.* (2008), a presença de aminoácidos aromáticos afeta a capacidade antioxidante de um peptídeo, já que o grupo hidroxil presente nestes aminoácidos é capaz de doar hidrogênio e estabilizar radicais livres.

A capacidade antioxidante de proteínas de batata, estudada por Wang e Xiong (2005), foi relacionada aos peptídeos de baixo peso molecular (<6 kDa) e aos aminoácidos livres. Je, Park e Kim (2005) fracionaram o hidrolisado protéico de pescado (*Alaska Pollack*) de acordo com o peso molecular, e observaram maior capacidade antioxidante na fração de menor peso molecular (<1 kDa).

A capacidade antioxidante do hidrolisado de soja foi atribuída aos peptídeos com a seqüência Leu-Leu-Pro-His-His (PEÑA-RAMOS, XIONG e ARTEAGA, 2004). De acordo com Wang *et al.* (2006), os aminoácidos His, Leu, Val e Ala presentes nos peptídeos do glúten são os responsáveis pelo potencial antioxidante do hidrolisado.

Os peptídeos são caracterizados como potenciais antioxidantes por sua capacidade de quelar metais (CHEN *et al.*, 1996; DÍAZ e DECKER, 2004;

SAKANAKA *et al.*, 2004) ou seqüestrar radicais livres (CHEN *et al.*, 1996; WANG *et al.* 2006). A caseína é um exemplo de proteína que atua pelos dois mecanismos antioxidantes: seqüestrando radicais livres e seqüestrando metais pró-oxidantes (KITTS, 2005).

### **3.3.2 Compostos fenólicos**

A capacidade antioxidante das frutas e vegetais, bem como de seus extratos, depende dos compostos antioxidantes presentes tais como os compostos fenólicos, seus derivados e isômeros, tocoferóis, carotenóides, ácido ascórbico e compostos nitrogenados (KLIMCZAK e PACHOLEK, 2002; MADHUJITH e SHAHIDI, 2005). A capacidade antioxidante dos extratos de plantas envolve, em geral, dois ou mais compostos antioxidantes agindo de acordo com seus diferentes mecanismos de ação. Por esta razão, o interesse prático é maior no extrato botânico, que nos compostos isolados (KLIMCZAK e PACHOLEK, 2002).

Os principais antioxidantes naturais são os compostos fenólicos extraídos de plantas (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários, produzidos em resposta a agentes agressores como a radiação ultravioleta, temperatura, patógenos, etc. (FENNEMA, 1996; NSIMBA, KIKUZAKI e KONISHI, 2008). São formados quimicamente por uma estrutura de anéis aromáticos associados diretamente a grupamentos hidroxila, como os fenóis (FENNEMA, 1996; SOUSA *et al.*, 2007). Os polifenóis constituem uma classe de substâncias representada por mais de 8 mil compostos diferentes (MARTINEZ-VALVERDE, PERIAGRO e ROS, 2000).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides. Os flavonóides são os que apresentam a estrutura química descrita como C6-C3-C6 e são agrupados em antocianinas e antoxantinas. Os não flavonóides são classificados como: derivados das estruturas químicas C6-C1 específicas dos derivados do ácido hidroxibenzóico; derivados das estruturas

químicas C6-C3 específicas dos derivados do ácido hidroxicinâmico; e derivados das estruturas químicas C6-C2-C6 específicas do trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glicosídeo (BURNS *et al.*, 2001; KING e YOUNG, 1999; MANACH *et al.*, 2004; SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992, SOUSA *et al.*, 2007).

O grupo dos flavonóides é o maior grupo dos fenóis presentes nos vegetais e é também conhecido como polifenólicos (FENNEMA, 1996; KING e YOUNG, 1999). Geralmente ocorrem na forma de glicosídeos, sendo uma das substâncias responsáveis pelo perfil sensorial de frutas (FENNEMA, 1996).

As antocianinas são moléculas de pigmentos vermelho, azul e violeta. As antoxantinas são moléculas incolores ou branco-amareladas e incluem os flavonóis (quercetina, caempferol, e miricetina), flavonas (apigenina e luteolina), flavanóis (catequina e epicatequina), e isoflavonas (genisteína e daidzeína) (KING e YOUNG, 1999).

Os flavonóides são reconhecidos nutricionalmente como agentes antioxidantes capazes de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de reduzirem significativamente as tendências às doenças trombóticas (RAUHA *et al.*, 2000).

Os ácidos fenólicos estão reunidos em dois grupos: derivados do ácido hidroxicinâmico e derivados do ácido hidroxibenzóico. Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por 3 carbonos ligada a um anel. Os ácidos p-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico são os hidroxicinâmicos mais comuns na natureza. No grupo dos ácidos hidroxibenzóicos, compostos que possuem grupo carboxílico ligado ao anel aromático, destacam-se os ácidos procatecuíco, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálico (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

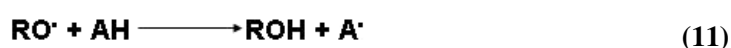
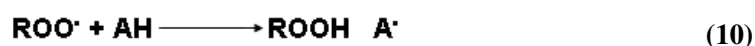
Os ácidos sináptico, ferúlico e p-cumárico são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico, tais como ácido procatecuíco, siríngico e



vanílico. Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico (-HC=CH-COOH), que participa da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica (WANASUNDARA, AMAROWICZ e SHAHIDI, 1994). Os ácidos fenólicos como o caféico, cumárico e ferúlico são formados pela via metabólica do ácido shiquímico em tecidos vegetais. A fenilalanina e a tirosina são sintetizadas nessa mesma via do ácido shiquímico, atuando como importantes precursores na formação dos ácidos fenólicos nos vegetais (FENNEMA, 1996).

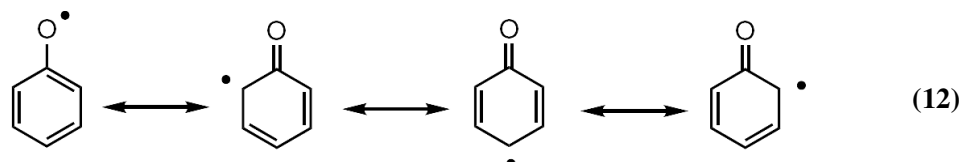
Os compostos fenólicos localizam-se principalmente nas camadas externas dos grãos, atuando como protetores contra patógenos e pestes. Por esta razão o teor de fenóis presentes em farinhas depende do grau de extração. Os principais fenólicos presentes em cereais são os ácidos fenólicos e em menores quantidades os taninos e flavonóides. Estes compostos são parcialmente associados aos benefícios de uma dieta rica em cereais (MICHALSKA, CEGLINSKA e ZIELINSKI, 2007).

A capacidade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na redução ou seqüestro de radicais livres (como oxigênio singlet) e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992; SOUSA *et al.*, 2007). Os fenólicos antioxidantes interferem na oxidação lipídica pela rápida doação de átomos de hidrogênio aos radicais lipídicos (Equações 10 e 11).



Além de excelentes doadores de elétrons, os radicais intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido

à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Equação 12) (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992; JEONG, *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2007).



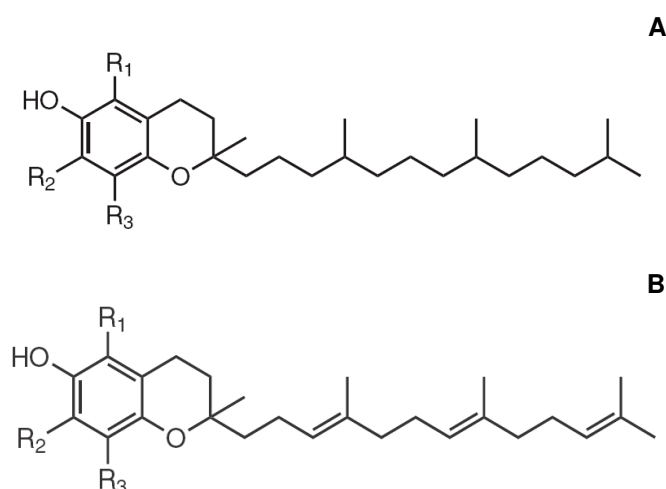
A absorção intestinal dos polifenóis ocorre em quantidades diferenciadas e depende da matriz de nutrientes no lúmen intestinal. Ao atingirem a corrente sanguínea, os metabólitos polifenólicos ligam-se às proteínas plasmáticas, sobretudo à albumina, principal responsável pelo transporte destas substâncias (HALLIWELL, RAFTER e JENNER, 2005). A retenção dos polifenóis nos tecidos corporais ainda não é claramente explicada, porém já se sabe que a quantidade de metabólitos fenólicos tende a ser maior nos vários tecidos corporais que no plasma sanguíneo (MANACH *et al.*, 2004).

Estudos indicam a relação entre o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante, enquanto outros não encontram justificativas para esta associação (ISMAIL, MARJAN e FOONG, 2004). Czerwinski *et al.* (2004) comprovaram capacidade antioxidante da aveia e do amaranto, utilizando modelos *in vitro* como o do  $\beta$ -caroteno e óxido nítrico (NO), fazendo uso do butilato de hidroxianisole (BHA) como padrão. Segundo este estudo, a aveia apresentou maior capacidade antioxidante (34,6%) que as farinhas de amaranto (23,2% - 26,0%) devido à maior quantidade de compostos fenólicos. Klimckzaki e Pacholek (2002) obtiveram, para os compostos fenólicos de duas espécies de amaranto (*A. caudatus* e *A. paniculatus*), índice de capacidade antioxidante entre 88 e 84%, utilizando sistema  $\beta$ -caroteno-ácido-linoléico. Embora as duas espécies tenham apresentados resultados similares, tanto o teor de compostos fenólicos como sua

composição foram diferentes para as espécies estudadas. Kähkönen *et al.* (1999) não conseguiram relacionar o teor de fenólicos à capacidade antioxidante de plantas que continham compostos fenólicos, utilizando oxidação do metil linoleato (MeLo). Também não foi encontrada por Ismail, Marjan e Foong (2004) correlação entre a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos em vegetais.

### 3.3.3 Tocoferóis

O tocoferóis são antioxidantes monofenólicos amplamente distribuídos na natureza e correspondem ao principal antioxidante presente em óleos vegetais. A pequena quantidade de tocoferol presente na gordura animal provém de compostos vegetais advindos da dieta do animal (FENNEMA, 1996; SHAHIDI; JANITHA e WANASUNDARA, 1992).



**Figura 3.** Estrutura química dos tocoferóis. A – Tocols; B – Tocotrienóis.

Os tocoferóis abrangem 8 compostos diferentes, divididos em 2 famílias: os tocols e os tocotrienóis (Figura 3). Os prefixos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , estão relacionados ao número e à posição do grupo metil ligado ao anel. Nos tocols, a cadeia lateral é

saturada, enquanto nos tocotrienóis é insaturada (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992).

Os tocoferóis atuam no organismo como vitamina E. O  $\alpha$ -tocoferol é o tocoferol que possui a maior capacidade como vitamina E (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992). Em geral, os tocoferóis com maior atividade de vitamina E são menos efetivos como antioxidante que os com menor capacidade. Os tocoferóis exercem capacidade antioxidante de acordo com a seguinte ordem:  $\delta > \gamma > \beta > \alpha$  (FENNEMA, 1996).

Os tocoferóis exercem grande efeito antioxidante mesmo em baixas concentrações, como a naturalmente presente nos óleos vegetais. No entanto, em altas concentrações, podem exercer ação pró-oxidante. A capacidade antioxidante se dá pelo processo de transferência de átomos de hidrogênio (FENNEMA, 1996). A Equação 13 ilustra o mecanismo de ação dos tocoferóis, onde: TH<sub>2</sub> = tocoferol:



Os vegetais contêm concentrações consideráveis dos diferentes tocoferóis e tocotrienóis em sua fração lipídica. Os cereais, as oleaginosas, e as castanhas são as principais fontes de tocoferóis. O óleo de germe de trigo contém de 1750 a 2540 mg de tocoferóis/kg de óleo e de 100 a 280 mg de tocotrienóis/kg de óleo (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992).

### **3.4 Avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante**

A capacidade antioxidante pode ser avaliada por inúmeros métodos *in vitro*. Apesar disso ainda não há um método validado que seja realmente confiável para

medir a capacidade antioxidante de alimentos e amostras biológicas (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

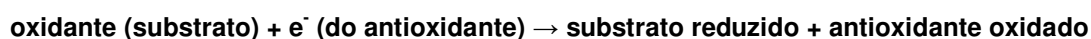
Os métodos de avaliação da capacidade antioxidante são divididos em ensaios baseados nas reações de transferência de elétron (TE) e ensaios baseados nas reações de transferência de átomos de hidrogênio (TAH), de acordo com as reações químicas envolvidas, como na classificação dos compostos antioxidantes (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

Os ensaios baseados na TE envolvem uma reação de redução, com o agente oxidante como indicador da reação final. Os ensaios baseados na TAH, geralmente utilizam um gerador sintético de radicais livres, um agente oxidante (marcador), e um antioxidante doador de átomos de hidrogênio. Aparentemente a reação de transferência de átomos de hidrogênio é a chave de uma das etapas da oxidação. O método baseado na TAH é mais relevante na capacidade antioxidante de interromper a cadeia da reação de oxidação. Devido às particularidades dos métodos, é extremamente difícil comparar os resultados entre os diferentes ensaios (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

### **3.4.1 Ensaios baseados nas reações de transferência de elétron**

Incluem-se nestes ensaios: ensaio da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), ensaio da capacidade antioxidante do íon férrico, ensaio da capacidade redutora de Cu(II), e o método da capacidade seqüestrante do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

Segundo Huang, Ou e Prior (2005), participam das reações dos ensaios baseados na TE: um composto antioxidante e um oxidante, onde a transferência de elétrons ocorre da seguinte forma:

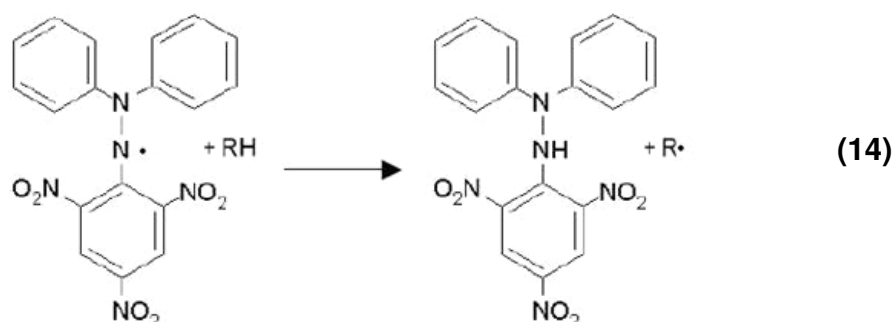


O substrato por si só é um agente oxidante, que subtrai um elétron do antioxidante (agente redutor), causando alterações na cor do substrato. A concentração de antioxidante presente é proporcional à alteração na cor do substrato. Quando não ocorre mais alteração na cor do substrato, significa que a reação chegou ao fim (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

#### **3.4.1.1 Método do DPPH**

O método da capacidade de seqüestrar o radical DPPH é um dos mais comuns para se determinar a capacidade antioxidante de modo prático, rápido e sensível. Este método envolve um radical cromóforo que simula as espécies reativas de oxigênio (ROS), que na presença de um composto antioxidante tem sua coloração alterada (ARNAO, 2000).

O radical livre DPPH é um radical orgânico de nitrogênio, estável e comercialmente disponível, que possui absorção de UV-Vis máxima em 515 nm em meio metanólico e sua solução possui coloração violeta intensa (ARNAO, 2000; BLOIS, 1958 *apud* ADELMAN, 2005). Uma vez reduzido por um antioxidante (Equação 14), seu elétron se torna emparelhado e a coloração da solução se enfraquece; o progresso da reação é monitorado por espectrofotômetro (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995; HUANG, OU e PRIOR, 2005). Pode-se verificar pela estrutura do DPPH (Equação 14), que o composto pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável, que apenas raramente pode ser oxidada irreversivelmente (BLOIS, 1958 *apud* ADELMAN, 2005).



O método do DPPH é tecnicamente simples, mas algumas desvantagens limitam sua aplicação. Além do mecanismo de ação ser diferente das reações dos métodos de TAH, que ocorrem normalmente entre antioxidantes e radicais peróxil, o DPPH é um radical de nitrogênio de vida longa, que não possui qualquer similaridade com a elevada reatividade e transitoriedade dos radicais peróxil envolvidos na peroxidação lipídica. Muitos antioxidantes que reagem rapidamente com radicais peróxido podem reagir vagorosamente ou mesmo serem inertes ao DPPH. Conseqüentemente a capacidade antioxidante não é apropriadamente mensurada. A reação cinética entre o DPPH e os antioxidantes não é linear à concentração de DPPH, tornando arbitrário expressar os resultados da capacidade redutora do DPPH utilizando a EC<sub>50</sub>. Além disso, foi reportado que a reação do DPPH com o composto fenólico eugenol é reversível, o que resulta em leituras falsamente baixas da capacidade antioxidante de amostras deste ou de outro composto com estrutura similar (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

Embora amplamente utilizados, os métodos baseados em radicais estáveis como o DPPH têm sido criticados já que estes, por serem estáveis, são estranhos aos sistemas biológicos, em contraste com os radicais de vida curta, como hidroxil e peróxil, que ocorrem como intermediários do processo oxidativo (BECKER, NISSEN e SKIBSTED, 2004).

### 3.4.2 Ensaios baseados em reações de transferência de átomos de hidrogênio

Nestes ensaios, são utilizados geradores térmicos de radicais que levam a fluxos constantes de radicais peroxil em soluções saturadas de ar. Ocorre competição entre o antioxidante adicionado e o oxidante (substrato) pelos radicais. Deste modo, a oxidação do substrato (oxidante) é inibida ou retardada (HUANG, OU e PRIOR, 2005). Os ensaios que apresentam estas características são: ensaio de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*); de descoloração da crocina, entre outros (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

Estes ensaios são realizados com os seguintes compostos: (a) um radical iniciador azo, normalmente 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH); (b) um marcador (UV ou fluorescente) para monitorar o progresso da reação; e (c) antioxidante. O método baseado em TAH, que utiliza fluoresceína como sonda, possui um mecanismo similar ao da peroxidação lipídica, mas sob as condições de ensaio, a concentração do substrato (fluoresceína) é normalmente inferior à concentração do antioxidante. Esta é uma contradição com a situação real, pois nos alimentos a concentração dos antioxidantes é muito menor que a de substrato (por ex. lipídios) (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

#### 3.4.2.1 ORAC

O ensaio de ORAC é um entre os diversos métodos utilizados na análise da capacidade antioxidante total de alimentos e outros compostos químicos *in vitro* (ISSA, VOLATE e WARGOVICH, 2006). O ensaio de ORAC é baseado na inibição da oxidação induzida pelos radicais peroxil iniciada pela decomposição térmica dos compostos azo, como o AAPH (PRIOR *et al.*, 2003)

A primeira versão do método de ORAC empregava a B-ficoeritrina (B-PE, uma proteína fluorescente) como marcador. A diminuição da fluorescência desta proteína era um indicativo do dano provocado pela reação com um radical peroxil. Mais tarde foram observadas algumas desvantagens do uso da B-PE: (1) é uma proteína isolada do *Porphyridium cruentum*, por isso sofre muita variabilidade; (2)



é fotosensível e descora sob as condições da análise; e (3) reage com os polifenóis e descora mesmo sem a adição do gerador de radicais. A fluoresceína começou a ser utilizada em substituição à B-PE, pois superaria as limitações da B-PE. A fluoresceína é um marcador sintético não protéico cujos produtos de reação com os radicais peróxil foram caracterizados e se encaixavam perfeitamente no mecanismo da reação de TAH (HUANG, OU e PRIOR, 2005; PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIZTO, 2006).

O método de ORAC utiliza a AUC (sigla em inglês de área abaixo da curva) para calcular a capacidade antioxidante das amostras. A vantagem da AUC é que esta pode ser igualmente aplicada para amostras que apresentam fase lag distintas e para amostras que não apresentam a fase lag. A fase lag ocorre quando as alterações ainda não foram suficientes para promover mudanças espectrofotométricas visíveis no marcador. A AUC torna este método muito útil na análise dos alimentos, já que estes possuem muitos ingredientes e reações cinéticas complexas (HUANG, OU e PRIOR, 2005). Este método era, originalmente, limitado à determinação da capacidade antioxidante de substâncias hidrofílicas, devido à propriedade hidrofílica do gerador de radicais e do detector (EBERHARDT *et al.*, 2005). O aprimoramento da técnica aumentou sua sensibilidade, tornando possível a determinação do potencial antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos (EBERHARDT *et al.*, 2005; HUANG, OU e PRIOR, 2005).

A capacidade antioxidante de um composto depende de sua interação com o meio. Como diversos antioxidantes são lipofílicos, o ensaio de ORAC, que utiliza solvente orgânico, pode ser particularmente útil para as amostras lipofílicas (HUANG, OU e PRIOR, 2005). No entanto, o ensaio de ORAC original é limitado para medir antioxidantes lipofílicos, porque este utiliza gerador de radicais e detector hidrofílicos (fluoresceína) (EBERHARDT *et al.*, 2005; HUANG, OU e PRIOR, 2005). Além disso, a fluorescência da fluoresceína em meio apolar é relativamente baixa (HUANG, OU e PRIOR, 2005). Para superar estas limitações, Naguib (2000) utilizou BODIPY 581/591 ou BODIPY 665/676 (4,4-difluoro-3,5-

bis(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene) como marcador fluorescente e 2,2'-azobis-2,4-dimethylvaleronitrile (AMVN) como gerador de radicais peroxil. Porém, este ensaio mostrou-se 100 vezes menos sensível que o ensaio de ORAC original, devido, possivelmente, à pouca eficiência do gerador de radicais (AMVN) (HUANG, OU e PRIOR, 2005) e da fotosensibilidade do BODIPY (PRIOR *et al.*, 2003). Posteriormente, Huang *et al.* (2002) descreveram este mesmo método utilizando  $\beta$ -ciclodextrina metilada randomizada, o que melhoraria a solubilidade dos compostos lipofílicos no meio aquoso.

O ensaio de ORAC utiliza o radical peroxila assemelhando-se aos sistemas biológicos, e é o único método que combina o tempo e o grau de inibição na avaliação da capacidade antioxidante (PRIOR *et al.*, 2003).

## **4. Material e Métodos**

### **4.1 Material**

O amaranto (*Amaranthus cruentus* variedade BR Alegria) foi produzido no município de Ituporanga, estado de Santa Catarina. A farinha integral de amaranto (FIA) foi obtida a partir da moagem dos grãos em moinho de facas (modelo MA630, Marconi, Piracicaba-SP, Brasil), com controle de temperatura ( $16 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) e peneirados em peneiras de 60 mesh até a obtenção da farinha integral de amaranto (FIA) com granulometria  $\leq 250 \mu\text{m}$ .

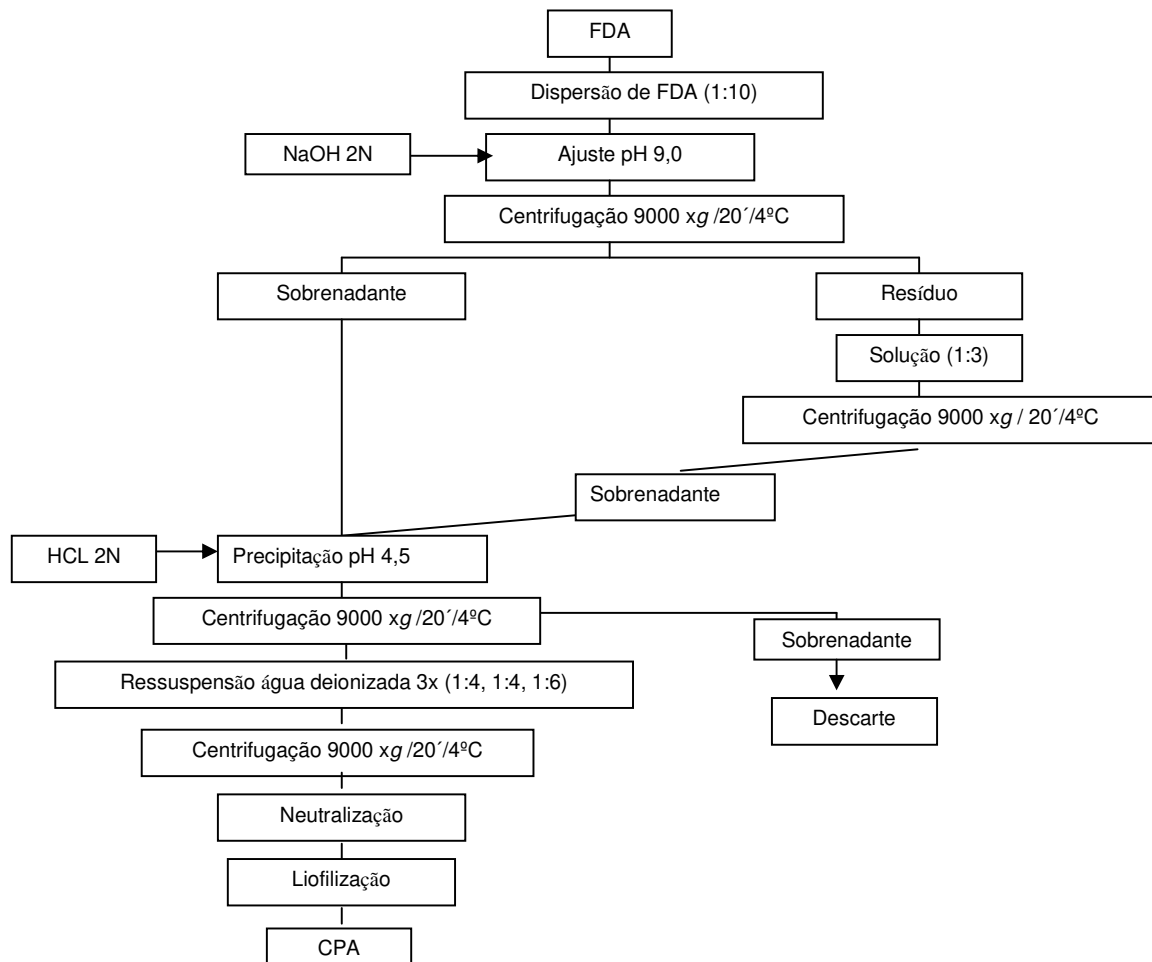
A farinha desengordurada de amaranto (FDA) foi obtida pelo desengorduramento da FIA realizado com hexano na proporção de 1:3 p/v por 12 h. Após este período, o solvente em excesso foi retirado e um novo volume de hexano igual ao inicial adicionado. A mistura ficou em repouso por mais 12 h a temperatura ambiente, depois foi retirado novamente o sobrenadante, e o resíduo foi centrifugado ( $1500 \times g/20 \text{ min}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ ) para remoção do solvente. O solvente residual foi evaporado em capela a temperatura ambiente por aproximadamente 48h.

Os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico ou cromatográfico.

### **4.2 Obtenção do concentrado protéico**

A produção do concentrado protéico de amaranto (CPA) baseou-se na solubilização da proteína em meio alcalino seguida pela precipitação isoelétrica e neutralização, que é o usual para a obtenção de isolados protéicos. No entanto, o material obtido apresentou teor de proteína inferior a 95%, valor mínimo para isolados protéicos (Sgarbieri, 1996), foi denominado como concentrado protéico.

O concentrado protéico de amaranto (CPA) foi obtido a partir da farinha desengordurada de amaranto (FDA) (Figura 4), segundo a metodologia descrita, por Martinez e Añón (1996) para obtenção de isolado protéico.



**Figura 4.** Fluxograma da obtenção do concentrado protéico de amaranto. (FDA - farinha desengordurada de amaranto e CPA - concentrado protéico de amaranto).

### 4.3 Obtenção dos hidrolisados a partir da FDA e CPA

Os hidrolisados protéicos foram obtidos a partir da FDA e do CPA. As condições de reação para obtenção dos hidrolisados protéicos de amaranto com a enzima Alcalase (Alcalase 2.4L - Novozymes, Araucária, PR, Brasil) foram: relação enzima:substrato (E:S, 1:50, p/p), pH 8,0 e 60°C. A relação enzima substrato foi calculada baseando-se no teor de proteína das amostras. As suspensões, 10% de amostra (p/v), foram preparadas em água destilada. A hidrólise foi realizada sem (st) e com tratamento térmico (tt) prévio da dispersão de FDA (FDAst; FDAAtt) e de CPA (CPAst; CPAAtt), realizado a 90°C/30 min. A enzima Alcalase foi adicionada após a dispersão ter alcançado as condições estabelecidas para a reação. A reação foi monitorada por pH-*stat*, utilizando o titulador automático Metler Toledo modelo DL 25 (Schwerzenbach, Switzerland) e o pH foi mantido constante por adição contínua de NaOH 1N. O grau de hidrólise (GH) foi calculado de acordo com Adler-Nissen (1986). Ao atingir 12% de GH, a reação foi interrompida por aquecimento a 90°C/10 min, centrifugada (1500 x g/10 min a 21°C) e o sobrenadante, que contém a proteína hidrolisada, foi congelado e liofilizado.

O GH dos hidrolisados também foi determinado pelo método do TNBS (ADLER-NISSEN, 1979). Este método fundamenta-se na reação colorimétrica do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) com os grupos  $\alpha$ -amino livres das proteínas e peptídeos formados durante a reação de hidrólise. O GH foi calculado utilizando a seguinte expressão (Equação 15):

$$GH = \frac{mMLeu}{h_{tot}} \times 100 \quad (15)$$

onde: *mMLeu* = grupamentos amínicos livres, calculados a partir da curva padrão de leucina; *htot* = número de equivalentes de pontes peptídicas por unidade de massa protéica, cujo valor é de 8,12 mmol/g de proteína para o amaranto. O valor do *htot* foi obtido a partir da análise da composição aminoacídica do CPA (g

aminoácido/100 g proteína), somando-se todos os aminoácidos constituintes em mmol/100g de proteína. O triptofano não foi considerado para este cálculo (TIENGO, 2007).

Os hidrolisados protéicos obtidos foram codificados da seguinte forma: HFDAst e HFDAAtt (hidrolisados de FDAst e FDAAtt, respectivamente); HPAst e HPAtt (hidrolisados de CPAst a CPAtt, respectivamente).

#### **4.4 Digestão *in vitro* das proteínas de amaranto**

A digestão *in vitro* foi realizada de acordo com procedimento descrito por Vermeirssen *et al.* (2003). Dispersões aquosas (10% de amostra p/v) de FDAst, FDAAtt, CPAst, CPAtt e seus hidrolisados com Alcalase foram ajustadas a pH 2,5 com HCl 2 N, para a digestão com a pepsina (pepsina da mucosa de estômago de suíno, cód. P-7012, lote: 120K7654 - Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), (E:S 1:100 p/p), a 37°C durante 2 horas. Em seguida, a solução foi neutralizada pela adição de NaOH 2 N para digestão com a pancreatina (pancreatina suína, cód. P-1625, lote: 41K1271 - Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), (E:S 1:50 p/p), a 37°C durante 4 horas. A reação foi interrompida por aquecimento a 90°C por 10 min e centrifugada (1500 x g/10 min/21°C). Os sobrenadantes, contendo o material digerido, foram congelados e liofilizados.

As proteínas íntegras e os hidrolisados após a digestão foram codificados da seguinte forma: DFDAst e DFDAAtt (digeridos da FDAst e FDAAtt, respectivamente); DCPAst e DCPAtt (digeridos do CPAst e CPAtt, respectivamente); DHFDAst e DHFDAAtt (digeridos do HFDAst e HFDAAtt, respectivamente); e DHPAst e DHPAtt (digeridos do HPAst e HPAtt, respectivamente).

Nitrogênio total foi determinado por micro-Kjeldahl, segundo a AOAC (1995). Para o cálculo da proteína dos hidrolisados protéicos e digeridos, foi utilizado o fator de conversão 5,85 (SCILINGO *et al.*, 2002).

## **4.5 Caracterização das farinhas, concentrado e hidrolisados protéicos de amaranto**

### **4.5.1 Composição centesimal**

As análises de umidade, cinzas e nitrogênio total da farinha e produtos foram determinadas de acordo a AOAC (1995). Para a conversão de nitrogênio total em proteína total, multiplicou-se o teor de nitrogênio pelo fator de conversão 5,85 (SCILINGO *et al.*, 2002). Lipídeos totais foram determinados pelo método de Bligh e Dyer (1959). O teor de carboidratos foi calculado por diferença. As determinações foram realizadas em triplicata.

### **4.5.2 Composição de ácidos graxos, esqualeno e tocoferóis na FIA e FDA**

A extração da fração lipídica da FIA e FDA foi realizada segundo o método de Bligh e Dyer (1959). A evaporação final foi realizada com fluxo de nitrogênio para evitar oxidação da amostra.

#### **4.5.2.1 Perfil de ácidos graxos na FIA e FDA**

Os ácidos graxos foram identificados como ésteres metílicos de ácidos graxos através de cromatografia gasosa (CG). As análises de ácidos graxos foram realizadas em duplicata e os valores expressos em percentual do ácido graxo presente nos óleos. A formação de ésteres metílicos de ácidos graxos seguiu o método descrito por Hartman e Lago (1973). A análise foi realizada em Cromatógrafo Gasoso Capilar CGC Agilente 6850 Series GC System, equipado com coluna capilar DB-23 Agilent (50% cyanopropyl) – methylpolysiloxane de 60 metros, diâmetro interno de 0,25 mm, 0,25 µm filme. O forno foi operado com temperatura inicial de 110 °C e final de 215 °C, com rampa de 5 °C/min; a temperatura do injetor foi de 250 °C e do detector 280 °C. O gás de arraste utilizado foi hélio, com fluxo de 1,0 mL/min. Foi injetado um volume de amostra de 1 µL de amostra. Os picos dos principais ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados pelo tempo de retenção comparado com o do padrão primário FAME - Nu-Chek GLC 15A (Nu-Chek Prep. Inc., Elysian, MN, USA), e com padrão

secundário composto por óleo de mostarda, injetado no mesmo dia dos ésteres metílicos. A análise foi qualitativa, sendo a proporção de cada ácido graxo calculada dividindo-se a área do seu pico pela área total da corrida. Foram seguidas as ordens de eluição dos componentes, segundo a descrição da prática recomendada pela AOCS (1998), método Ce 1f-96.

#### **4.5.2.2 Teor de esqualeno na FIA e FDA**

A análise de esqualeno seguiu a metodologia descrita por Nenadis e Tsimidou (2002), realizada por CLAE, em sistema isocrático Perkin Elmer LC Pump 250. A fase móvel utilizada foi acetona/acetonitrila (40:60 v/v) com fluxo de 1,0 mL/min em coluna LiChrosorb® Si60 - 5µm, 250 x 4 mm (Merck KgaA, Darmstadt, Germany). A coluna analítica foi mantida a 30°C e o volume de injeção utilizado foi de 20 µL. O detector utilizado foi IR Waters 2414. A quantificação do composto foi feita através de uma curva de calibração externa usando padrão de esqualeno (cód. S-3626, lote 60H7709 - Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, EUA).

#### **4.5.2.3 Perfil de tocoferóis e tocotrienóis**

Os tocoferóis/tocotrienóis foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguindo o método (Ce 8-89) descrito pela AOCS (1996). A identificação dos tocoferóis foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Series 200, Perkin Elmer), equipado com detector UV/Vis (UV/Vis Spectrofotometric Detector LC 290, Perkin Elmer) no comprimento de onda de 292 nm, injetor manual equipado com loop de 20 µL, e coluna LiChrosorb® Si60 – 5µm, 250 x 4 mm (Merck KgaA, Darmstadt, Germany). A fase móvel utilizada foi hexano/isopropanol (99/1), com fluxo de 1,0 mL/min. Os picos das amostras de amarantho foram identificados por comparação com padrões conhecidos de tocoferóis e tocotrienóis. As análises foram realizadas em duplicata e os valores expressos em mg de tocoferol ou tocotrienol / 100g de amostra seca.



#### **4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Os perfis de distribuição de peso molecular da FIA, FDA, CPA e dos hidrolisados protéicos (HFDAst, HFDAAtt, HPAAst, HPAAAtt) de amaranço foram determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Nesse sistema utiliza-se dois géis com concentrações diferentes de acrilamida, sendo: gel de separação (12% T e 4%) e gel de empilhamento (4% T e 2,67% C). As amostras foram diluídas em tampão redutor (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%), aquecidos a 90°C por 30 minutos. Foram aplicadas alíquotas de 10  $\mu$ L da solução das amostras contendo 0,4% de proteína. O padrão utilizado foi o de baixo peso molecular (6 a 97 kDa, Biorad, cód. 161-0304 - 6,5 Aprotinina; 14,4 Lisozima; 21,0 inibidor de tripsina ; 31,0 anidrase carbonica ; 45,0 ovoalbumina; 66,2 soro albumina; 97,4 Fosforilase b). Após a corrida, o gel foi corado em Comassie Blue G-250 0,1% e descorado por meio de várias lavagens em solução ácido acético/metanol/água (1:4:5).

As mesmas amostras analisadas em SDS-PAGE, mais os digeridos foram avaliadas em sistema SDS-PAGE-Tricina (SCHÄGER e JAGOW, 1987), por ser mais adequado para avaliação de hidrolisados protéicos com peptídeos de baixo peso molecular. Diferentemente do sistema SDS-PAGE descrito por Laemmli (1970) que utiliza como íon carreador a glicina, no sistema SDS-PAGE Tricina o íon carreador é a Tricina. A utilização deste método permite a separação das proteínas na faixa molecular de 1–100 kDa, mesmo em baixas concentrações de acrilamida (10%) (HAMES, 1998).

Nesse sistema utilizam-se géis com três diferentes concentrações de acrilamida: gel de separação (14,6% T e 4% C), gel espaçador (10% T e 3% C) e gel de empilhamento (4% T e 3% C). As amostras foram diluídas em tampão redutor (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS 10%, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%), aquecidos a 40°C por 30 minutos. Foram aplicadas alíquotas de 20  $\mu$ L da solução contendo 0,4% de proteína (FDAst e FDAAtt) ou 2% de proteína para as demais amostras. O padrão utilizado foi o de peso molecular

ultra-baixo, entre 6,5 e 26,6 kDa (1 a 26 kDa, Sigma, M3548 - 1,06 Bradiquinina; 3,496 Cadeia  $\beta$  da insulina bovina oxidada; 6,5 Aprotinina de pulmão bovino; 14,2  $\alpha$ -Lactolbumina de leite bovino; 17,0 Mioglobina de coração de cavalo; 26,6 Isomerase triosefosfato de músculo de coelho). Após as corridas, os géis foram inicialmente fixados por 1 hora em solução metanol/ácido acético/água (5:1:4) e corados por 48 horas em Comassie Blue G250 (0,04% de Comassie em ácido acético 10%). Posteriormente foram descorados em ácido acético 10%.

#### **4.6 Obtenção dos extratos de amaranto**

Foram realizadas duas diferentes extrações das amostras de amaranto, descritas a seguir:

##### **4.6.1 Obtenção de extrato aquoso**

O extrato aquoso de amaranto para as análises de fenólicos totais e capacidade antioxidante (DPPH e ORAC) foi preparado utilizando o método de Eberhardt *et al.* (2005). As amostras foram suspensas em água destilada na proporção de (0,25 g/5 mL), agitadas em agitador magnético por 30 minutos, centrifugadas (35735 x g/15 min/ T ambiente) e filtradas em papel Whatman n. 1. O volume final foi completado para o volume inicial (5 mL) com água destilada.

##### **4.6.2 Obtenção de extrato metanólico**

O extrato metanólico foi obtido de acordo com o método descrito por Tsaliki, Lagouri e Doxastakis (1999). As amostras foram suspensas em metanol (HPLC, cod. 9093-68, lote C52E02 – JTBaker, Mallinckrodt Baker, Inc. Phillisburg, NJ, USA), colocadas em tubos com rosca, agitadas em agitador de tubos por 10 min e levadas ao banho-maria onde permaneceram a 50 °C por 1 hora e, em seguida a 65 °C por 5 min. Os extratos foram filtrados em filtros Millipore 13 mm, 0,45  $\mu$ m e armazenados em tubos de vidro com rosca a - 20 °C até sua utilização. A extração foi realizada em concentrações variáveis, de 1:5 a 1:50 (p/v), dependendo da capacidade de absorção do metanol pela amostra.

## **4.7 Compostos fenólicos**

### **4.7.1 Teor de fenóis totais**

A quantificação espectrofotométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas. A técnica que utiliza o Reagente de Folin-Ciocalteu é a mais utilizada. O reagente consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6<sup>+</sup> porém, em presença de certos agentes redutores como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (SOUSA *et al.*, 2007).

O teor de fenólicos totais foi determinado a partir dos extratos aquoso e metanólico, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (cod. 9252, lote 026K0008 - Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, EUA), conforme descrito por Gamel *et al.*, 2006. O extrato (100 µL) foi adicionado a 2 mL de solução aquosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 2% em tubos de vidro. Após 2 min, 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, diluído em água destilada (1:1) foram adicionados à mistura e homogeneizado em Vortex. A solução foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 30 min. A absorbância foi medida a 750 nm contra o branco da reação, utilizando espectrofotômetro (Beckman Coulter, DU 640, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, EUA). O branco foi preparado substituindo a amostra por água na reação. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg EAG/100g amostra seca) usando curva padrão de ácido gálico (gallic acid (3,4,5-Trinydroxybenzoic acid, cod. G-7384, lote 109H0018 - Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, EUA), dissolvido em água destilada, nas concentrações de 0,02 a 0,12 mg/mL.

#### **4.7.2 Determinação dos compostos fenólicos**

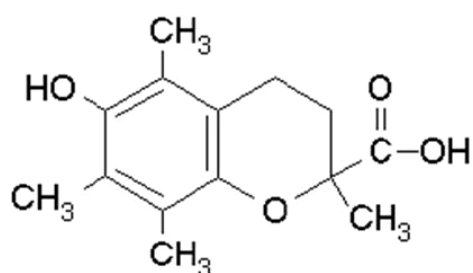
Os compostos fenólicos foram determinados segundo Scherer e Godoy (2007) por CLAE, em cromatógrafo Agilent HP 1100 series (Alemanha), equipado com desgasificador (G1322A), bomba quaternária (G1311A), injetor automático (G1313A) forno para coluna (G1316A) e detector DAD (G1315A). Na determinação, foi utilizada uma coluna de fase reversa C 18 monomérica (VYDAC, 250 x 4,6 mm ID, 5  $\mu$ m) em um sistema de gradiente, no qual a fase móvel A foi água com 0,1 % de ácido fórmico e a fase móvel B metanol com 0,1 % de ácido fórmico. A condição inicial do gradiente foi de 85 % de A e 15 % de B, passando para 50 % de cada em 10 minutos, de 10 a 25 minutos o gradiente atingiu 20 % de A e 80 % de B. O recondicionamento da coluna para a condição inicial ocorreu em 10 minutos, totalizando 35 minutos. A vazão utilizada foi de 0,7 mL/min, o volume de injeção foi de 20  $\mu$ L e a detecção em detector de arranjo de diodos (DAD) com  $\lambda = 280$  e  $\lambda = 320$  nm. A identificação foi realizada através dos tempos de retenção, espectros de absorção e co-cromatografia quando necessário. A quantificação foi realizada por padronização externa para cada composto. Foram utilizados os padrões: ácido gálico, ácido protocatecuico, catequina, epicatequina, metilgalato, etilgalato, propilgalato, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido sinápico, ácido ferúlico, resveratrol, ácido trans cinâmico, rutina, miricetina, morina, quercetina, luteolina, kaempferol, apigenina (Sigma-Aldrich. Steinheim, Alemanha).

A validação do método foi realizada somente com os compostos fenólicos encontrados na amostra, e os parâmetros avaliados foram: faixa de linearidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação. A faixa de linearidade foi avaliada durante a elaboração das curvas de calibração. A precisão foi avaliada pela repetibilidade (10 injeções sucessivas, n=10). O limite da detecção foi considerado como a concentração mínima do analíto cuja altura do pico foi de 3 vezes a amplitude do sinal de ruído, e 5 vezes para o limite de quantificação.

## 4.8 Determinação da capacidade antioxidante

### 4.8.1 Determinação da capacidade seqüestradora de radicais (DPPH)

A determinação da capacidade antioxidante das amostras de amaranto em extrato aquoso e metanólico foi realizada utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, cód. D9132, lote 056K1147 - Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, EUA), de acordo com Thaipong *et al.* (2006). Foi preparada uma solução estoque de DPPH (24 mg de DPPH/100 mL de metanol) e a partir desta foi preparada a solução de trabalho (8,6 mL de sol. estoque/50 mL de metanol), a solução estoque foi armazenada a - 20°C. A reação foi realizada com 150 µL do extrato e 2,9 mL da solução de trabalho, e após 24hs de reação no escuro foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Beckman Coulter, DU 640, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, EUA) a 515 nm. A curva padrão foi preparada com o análogo hidrossolúvel da vitamina E (Figura 5), Trolox ((R)-(+)-6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylcroman-2-carboxylic acid, 98%, cód. 391913, lote 09808HE - Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, EUA), dissolvido em metanol, nas concentrações de 25 a 935 µM. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em mg equivalente em trolox (ET)/ g de amostra.



**Figura 5.** Estrutura Química do Trolox

#### **4.8.2 Ensaio de ORAC**

O ensaio de ORAC hidrofílico foi realizado a partir dos extratos aquoso e metanólico, seguindo a metodologia descrita por Dávalos, Gómez-Córdovés e Bartolomé (2004) com algumas adaptações. Os reagentes são colocados em poços da placa onde ocorre a reação. Para o ensaio, foram adicionados 20 µL de extrato (com concentração final, ou seja no poço da placa de 1 mg/mL), 120 µL de fluoresceína (Fluoresceína sódica, lote 0604815 – VETEC Química Fina LDTA., Duque de Caxias, RJ, BR) em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) na concentração final de 0,378 µg/mL (preparada a partir de uma solução estoque de 3,87 mg/mL) e 60 µL de AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride, 97%, cód. 44,091-4, lote 11120JC-505 - Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, EUA) em água (concentração final de 108 mg/mL). A solução de AAPH deve ser preparada minutos antes de ser colocada na placa. Para o branco, o extrato foi substituído por tampão fosfato de potássio. Como padrão foi utilizado Trolox em tampão fosfato de potássio (0,1 ; 1,0 ; 10 ; 25 ; 50 ; 80 e 100 µM). Após a adição de todos os reagentes na placa, fez-se a leitura da fluorescência, (Fluorímetro Novo Star, BMG Labtechnologies, número de série 700-0054-equipamento adquirido com a verba FAPESP, processo número 00/08587-0), a cada 1 minuto, por 80 minutos. Foram utilizados os seguintes filtros: emissão 520 nm e excitação 485 nm. A temperatura do equipamento era de 37°C. Todos os extratos foram lidos em triplicata. Para cada leitura, fez-se uma nova curva padrão de Trolox.

As leituras da fluorescência foram utilizadas no cálculo da AUC (sigla em inglês para área abaixo da curva), onde x corresponde ao tempo e y ao decaimento da fluorescência. A fórmula utilizada para o cálculo da AUC foi a seguinte (Equação 16):

$$AUC = 1 + f_2/f_1 + f_3/f_1 + f_4/f_1 + f_n/f_1 \quad (16)$$

Onde:

$f_1$  = leitura da fluorescência no tempo 1 minuto

$f_2$  = leitura da fluorescência no tempo 2 minutos

$f_n$  = leitura da fluorescência no tempo 80 minutos

A AUC foi calculada para as amostras, diferentes concentrações do Trolox e para o branco. Subtraiu-se da AUC do padrão e das amostras, a AUC do branco. Os valores de AUC das amostras foram substituídos na equação da reta obtida pela curva padrão de Trolox e os valores expressos em  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalente (TE)/g amostra.

#### **4.10 Análise estatística**

Os resultados das análises físico-químicas e cromatográficas foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados obtidos pelas análises de grau de hidrólise, fenóis totais e capacidade antioxidante foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, para análise das diferenças entre as médias. Para as análises estatísticas, utilizou-se o programa computacional SAS - Statistical Analysis System (versão 9.1.3, 2003, N.C., EUA). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Caracterização das farinhas

#### 5.1.1 Composição centesimal

A composição centesimal das farinhas integral (FIA) e desengordurada (FDA) está apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição centesimal da farinha integral (FIA) e das farinhas desengorduradas de amaranto, sem e com tratamento térmico prévio (FDAst e FDAAtt)

Composição (%)	FIA	FDAst	FDAAtt
<b>Proteínas*</b>	13,7±0,3	14,7±0,3	15,4±0,1
<b>Lipídeos</b>	6,4±0,1	0,9±0,3	(nd)
<b>Cinzas</b>	4,8±0,2	5,5±0,1	(nd)
<b>Umidade</b>	12,0±0,0	13,4±0,1	(nd)
<b>Carboidratos**</b>	63,1	66,4	(nd)

\* Nx 5,85

\*\* Calculado pela diferença (base seca)

(nd) não determinado

Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas

O teor de proteínas da FIA, 13,7%, foi semelhante ao reportado para o *A. cruentus* colhido no estado de Santa Catarina (Ituporanga) (BLÁCIDO, 2006) e na da região do cerrado brasileiro (Planaltina – DF) (COELHO, 2006; MENDONÇA, 2006) 14,1, 13,7 e 13,9%, respectivamente e inferior ao encontrado para outras variedades de *A. cruentus*, 16 a 18% (BECKER *et al.*, 1981; DANZ e LUPTON, 1992; MARCÍLIO *et al.*, 2003). A FDA apresentou teor de proteína de 14,7%, valor ligeiramente inferior ao obtido em outros trabalhos onde a FDA também foi obtida pelo tratamento da FIA com hexano, de 16 e 15,7% (COELHO, 2006; MENDONÇA, 2006).



O teor de lipídios da FIA, 6,4%, foi similar ao reportado por Danz e Lupton (1992) e Marcílio *et al.* (2003), 6,7 e 6,8%, respectivamente. O tratamento com hexano reduziu em 86% o teor de lipídios da FIA.

### **5.1.2 Ácidos graxos, esqualeno e tocoferóis**

Na Figura 6 estão apresentados os cromatogramas dos padrões de ácidos graxos (Figura 6a), da fração lipídica da FIA (Figura 6b) e da FDA (Figura 6c). O pico marcado com asterisco (\*), embora sem identificação conclusiva, possivelmente refere-se ao esqualeno. A composição de ácidos graxos da FIA e FDA está apresentada na Tabela 2. A fração lipídica do amaranto é composta principalmente pelos ácidos graxos insaturados palmitoléico, oléico, linoléico, linolênico e erúcido, que perfazem aproximadamente 70% do total dos ácidos graxos. Os ácidos linoléico e oléico são os mais abundantes, representando 36 e 31% dos ácidos graxos totais, respectivamente. O teor de lipídios totais e o perfil de ácidos graxos da FIA é similar ao reportado em outros estudos para o *A. cruentus* (BECKER, 1989; BERGANZA *et al.*, 2003; ESCUDERO *et al.*, 2004). A composição do óleo de amaranto é similar aos óleos de milho, algodão, gérmen de trigo, aveia e arroz, cujas frações lipídicas são ricas em ácido linoléico e possuem aproximadamente 70% de ácidos graxos insaturados (BECKER, 1989; BREENE, 1991).

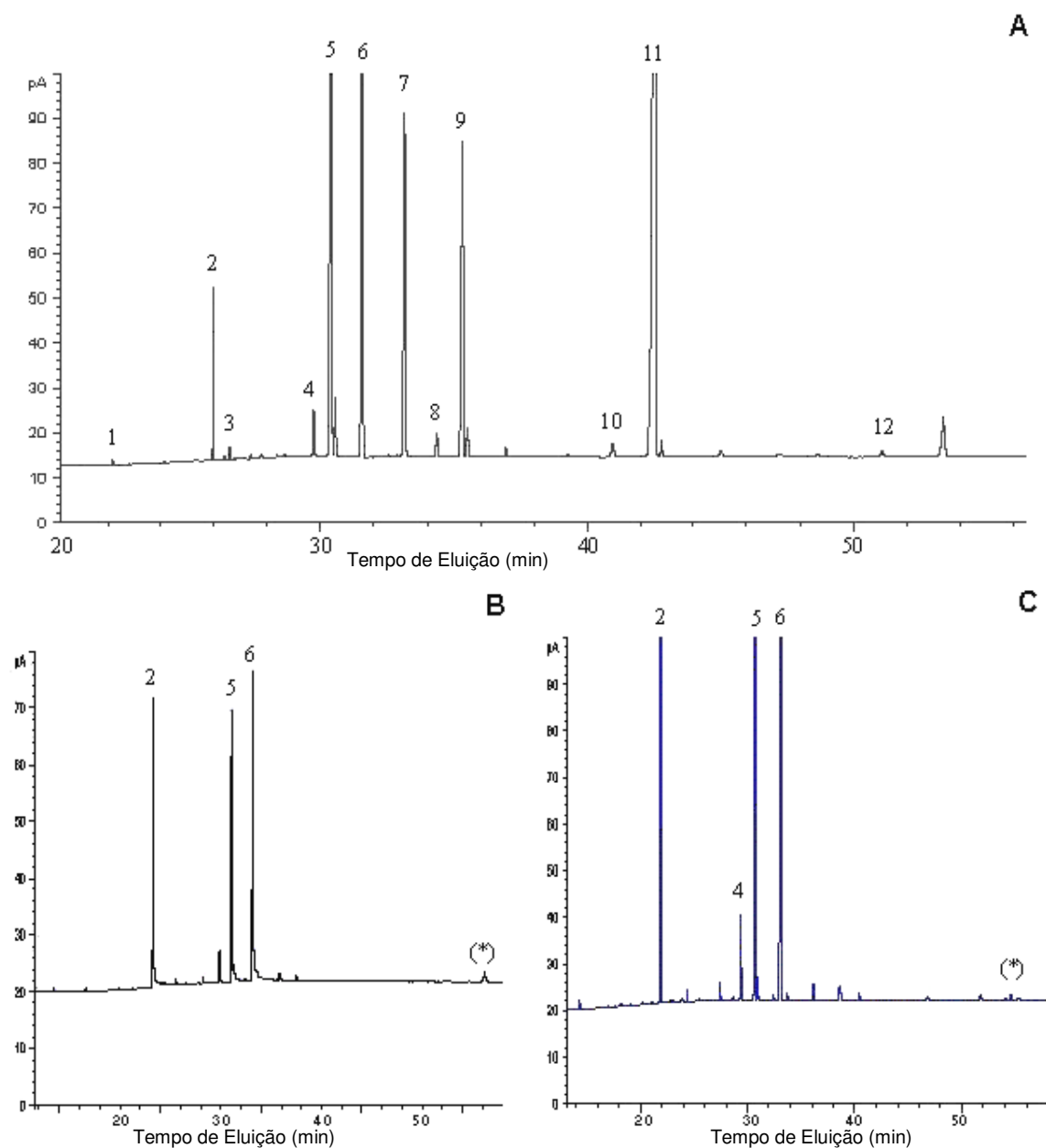
O perfil cromatográfico do padrão de esqualeno e de uma das amostras analisadas (FIA) pode ser observado na Figura 7. O teor de esqualeno da FIA foi 4,0% e o da FDA 2,2% da fração lipídica (Tabela 2). Becker (1989) e Escudero *et al.* (2004) reportaram 6,9% e 6,2% de esqualeno no óleo da farinha de amaranto, enquanto Berganza *et al.* (2003) observaram valores variando de 2,26 a 5,90% para farinhas de *A. cruentus* obtidos de diferentes localidades da Guatemala. A concentração de esqualeno no óleo amaranto é muito superior à encontrada em outros vegetais, que varia de 0,1 a 0,7% nos óleos de algodão, gérmen de trigo, farelo de arroz e oliva (BECKER *et al.*, 1981; BECKER, 1989).

**Tabela 2.** Composição de ácidos graxos nas frações lipídicas das farinhas integral (FIA) e desengordurada (FDA) de amaranto.

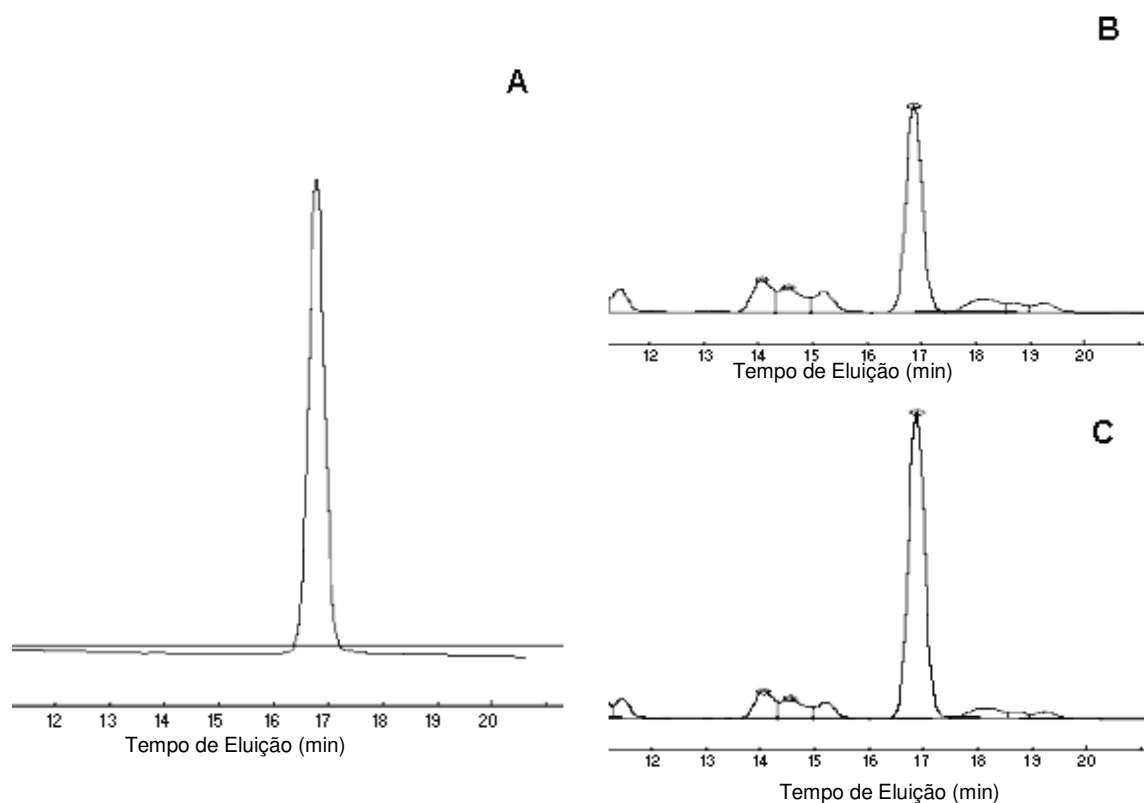
Ácido Graxo		FIA (g /100g óleo)	FDA (g /100g óleo)
Láurico	C12:0	0,3	0,0
Merístico	C14:0	0,3	0,3
Palmítico	C16:0	24,8	22,8
Palmitoléico	C16:1	0,2	0,1
Esteárico	C18:0	3,0	3,6
Oléico ( $\omega$ -9)	C18:1	30,6	31,4
Linoléico ( $\omega$ -6)	C18:2	35,4	36,0
Linolênico ( $\omega$ -3)	C18:3	0,7	0,9
Araquídico	C20:0	0,5	0,8
Araquidônico	C20:1	0,2	0,3
Behênico	C22:0	0,0	0,4
Erúcico	C22:1	0,0	0,6
Lignocérico	C24:0	0,0	0,4
Esqualeno		4,0	2,2

Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas

O esqualeno é um potente antioxidante que contribui para a estabilidade de diversos óleos vegetais (MOREDA, PÉREZ-CAMINO e CERT, 2001). Além disso, como um precursor metabólico, tem ação redutora do colesterol sérico, por meio da inibição da enzima HMGCoA redutase, que é a chave reguladora da biossíntese do colesterol (DANZ e LUPTON, 1992).



**Figura 6.** Perfis cromatográficos (CG) de ácidos graxos: a) padrões, b) Farinha integral de amaranto (FIA) e c) Farinha desengordurada de amaranto (FDA). Os ácidos graxos estão representados por: 1 - merístico; 2- palmítico; 3- palmitoléico; 4- esteárico; 5- oléico; 6- linoléico; 7- linolênico; 8- araquídico; 9- araquidônico; 10- behênico; 11- erúico; 12- lignocérico; (\*) esqualeno sem identificação comprovada.



**Figura 7.** Perfis cromatográficos (CLAE) de esqualeno: a) padrão, b) Farinha integral de amaranto (FIA) e c) Co-cromatografia (FIA + padrão).

Os teores e composição dos tocoferóis e tocotrienóis da FIA e FDA estão apresentados na Tabela 3. A concentração de  $\beta$ -tocoferol na FIA (24,5 mg/Kg de farinha) foi maior que a faixa reportada por Lehmann, Putnam e Qureshi (1994), 5,92 a 11,47 mg/Kg de grão. Michalska, Ceglinska e Zielinski (2007), ao analisarem compostos bioativos na farinha de centeio, encontraram maior quantidade de tocotrienóis (9,78 mg/Kg de farinha) que a encontrada no presente estudo (0,5 mg/Kg de grão) para o amaranto. No entanto, a farinha de amaranto possui teor de tocoferóis quase seis vezes maior que o presente no centeio, correspondendo a 34,5 e 6,19 mg/Kg de grão, respectivamente.

**Tabela 3.** Teor de tocoferóis e tocotrienóis das farinhas integral e desengordurada de amaranto (FIA e FDA)

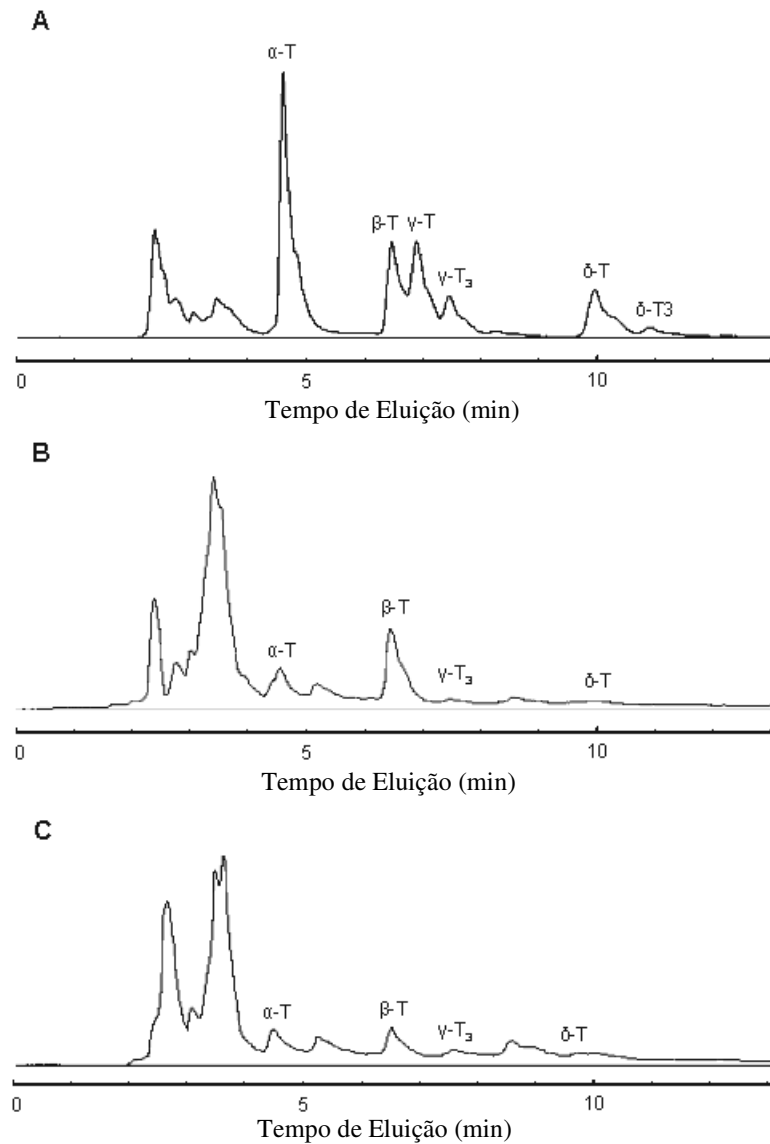
	<b>FIA</b> <b>(mg/Kg de farinha)</b>	<b>FDA</b> <b>(mg/Kg de farinha)</b>
$\alpha$ -tocoferol (mg/Kg)	8,9	1,5
$\beta$ -tocoferol (mg/Kg)	24,5	2,0
$\gamma$ -tocoferol (mg/Kg)	-	-
$\delta$ -tocoferol (mg/Kg)	1,1	0,4
$\gamma$ -tocotrienol (mg/Kg)	1,2	0,5
<b>TOTAL</b>	<b>35,7</b>	<b>4,4</b>

(-) composto não detectado

Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas

A presença de tocoferóis e tocotrienóis na dieta é essencial devido aos efeitos multiprotetores exercidos por estes compostos. Os tocoferóis e os tocotrienóis podem destruir alguns compostos presentes em alimentos que são associados a doenças como o câncer. Além disso, os tocotrienóis são inibidores da síntese do colesterol (MICHALSKA, CEGLINSKA e ZIELINSKI, 2007).

Na Figura 8 estão apresentados os perfis cromatográficos do padrão de tocoferóis e tocotrienóis e das farinhas. Comparando-se os resultados de composição do óleo extraído da FIA e da FDA verifica-se que o tratamento com hexano removeu de forma proporcional a fração lipídica, sem alterar os perfis de ácidos graxos, squaleno, tocoferóis e tocotrienóis.



**Figura 8.** Perfis cromatográficos (CLAE) dos tocoferóis e tocotrienóis: a) padrões, b) Farinha integral de amaranto (FIA) e c) Farinha desengordurada de amaranto (FDA).

### 5.1.3 Caracterização da fração protéica das farinhas de amaranto (FIA e FDA), CPA e de seus hidrolisados

Os teores de proteínas e de lipídios dos concentrados protéicos estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Teor de proteínas e lipídios nos concentrados protéicos sem e com tratamento térmico prévio (CPAst e CPAtt)

Composição (%)	CPAst	CPAtt
Proteínas*	75,1±0,9	77,4±1,0
Lipídeos	4,6±0,1	(nd)

\* Nx 5,85

(nd) não determinado

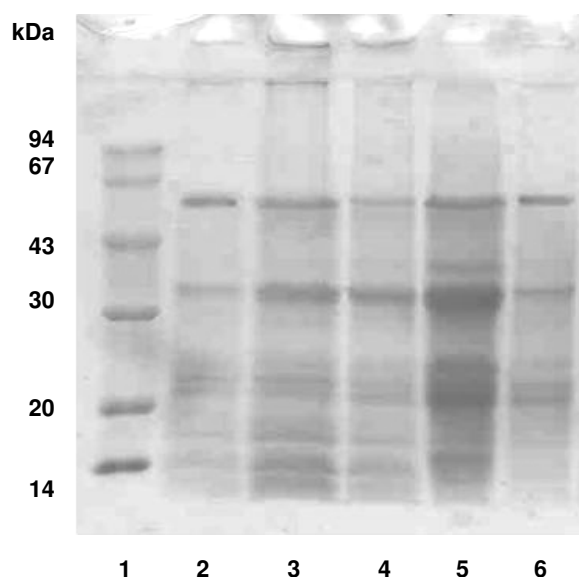
Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas

O teor de proteína do CPAst (75,1%) foi superior ao reportado por Paredes-López, Mora-Escobedo e Ordorica-Falomir (1988) para concentrado protéico de *A. hypochondriacus* (64%) com os mesmos valores de pH de solubilização e precipitação. A força utilizada nas etapas de centrifugação para a obtenção do CPA no presente estudo foi maior que o dobro da utilizada no trabalho de Paredes-López, Mora-Escobedo e Ordorica-Falomir (1988), o que poderia justificar o maior teor de proteína, devido à retirada de outros componente como o amido.

O CPA apresentou 4,6% de lipídios, teor superior ao do material de origem, FDA, possivelmente devido ao arraste dos lipídeos nas diversas etapas de obtenção do concentrado protéico. O mesmo ocorreu no estudo de Mendonça (2006), que obteve isolado protéico com 7,7% partindo de farinha com 2% de lipídios.

Os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE) das proteínas das farinhas e concentrados protéicos antes e após o tratamento térmico (90 °C/ 30min) estão apresentados na Figura 9. De forma geral, os perfis apresentaram-se semelhantes

aos reportados para concentrados e isolados protéicos de amaranto reportados na literatura. As frações de PM entre 20 a 43 kDa correspondem às globulinas 7S e 11S (MARCONE, 1999) e as frações entre 43 e 67 kDa correspondem as glutelinas, uma das frações protéicas encontradas em menor quantidade nas proteínas de amaranto (GAMEL *et al.*, 2005). As bandas na região de PM 14 kDa, bastante evidentes em todas as amostras, apareceram de forma mais tênue no perfil do CPAAtt (Figura 9 – Coluna 6), sugerindo que o tratamento térmico pode causar alteração nestas frações.



**Figura 9.** Eletroforese em SDS-PAGE da FDA, CPA e hidrolisados (amostras a 0,4% de proteína). Coluna 1 – padrões; Coluna 2 – FIA; Coluna 3 – FDAst; Coluna 4 – FDAAtt; Coluna 5 – CPAst; Coluna 6 – CPAAtt. Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas.

Tendo em vista que nem todas as frações protéicas presentes na farinha estavam presentes nos concentrados protéicos, os hidrolisados foram obtidos a partir tanto da FDA como do CPA. Além disto, antes da hidrólise enzimática, ambas as matérias primas sofreram tratamento térmico, pois trabalhos anteriores (Henn e Netto, 1998; Costa, Gontijo e Netto, 2007) mostraram que proteínas com diferentes graus de desnaturação, submetidas às mesmas condições de hidrólise,



podem liberar diferentes peptídeos. A Alcalase foi a enzima escolhida para a obtenção dos hidrolisados, pois vem sendo utilizada não apenas para a produção de hidrolisados com melhores características nutricionais e funcionais que as proteínas intactas, mas também para a produção de peptídeos bioativos. Hidrolisados podem possuir características físico-químicas e bioativas não encontradas na proteína original, como a capacidade antioxidante (ZHU, ZHOU e QIAN, 2006; CUMBY et al., 2008).

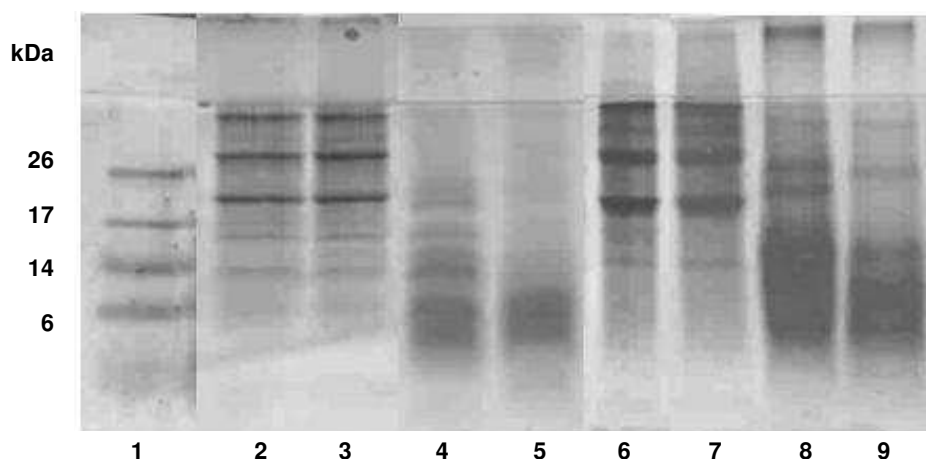
Os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE-Tricina) dos hidrolisados bem como das respectivas proteínas de origem estão apresentados na Figura 10. Com a hidrólise, as bandas de PM > 26 kDa da FDA desapareceram e houve a formação de banda larga e difusa abaixo de 14 kDa, indicando que a Alcalase hidrolisou as frações originais, levando à formação dos peptídeos de baixo PM. A hidrólise da FDAtt parece ter sido mais efetiva que na FDAst, pois as bandas com PM > 14 kDa presentes no HFDAst não foram ser observadas no perfil da HFDAAtt.

Nos perfis dos hidrolisados do CPA, observou-se que as bandas de PM > 26 kDa foram atenuadas e duas bandas se formaram próximas à região de 26 kDa; no HPAtt foi observada apenas uma dessas bandas. Em decorrência da hidrólise, houve a formação de banda densa e difusa de PM < 17 kDa. Hidrolisados do CPA (HPAst e HPAtt) mostram perfil diferente dos obtidos da FDA (HFDAst e HFDAAtt). Os hidrolisados do CPA apresentaram frações de alto peso molecular e peptídeos distribuídos na faixa de até 14 kDa, enquanto os hidrolisados da FDA apresentaram apenas bandas discretas de alto PM e peptídeos distribuídos até a faixa de 6kDa.

#### **5.1.4 Digestão *in vitro***

A digestão *in vitro* da farinha, do concentrado e dos hidrolisados protéicos de amaranto foi realizada por ser uma forma de simular a digestão humana e avaliar o seu efeito na capacidade antioxidante dos produtos em estudo. Além de avaliar o efeito das enzimas gastrintestinais nas frações protéicas, foi também

estudado o efeito da digestão na liberação dos compostos fenólicos (item 5.2 - Tabela 6), pois estes são um dos principais compostos responsáveis pela capacidade antioxidante de alimentos.



**Figura 10.** Eletroforese em SDS-PAGE Tricina da FDA, CPA e hidrolisados. FDAst e FDAtt a 0,4% de proteína e as demais amostras a 2%. Coluna 1 - padrões; Coluna 2 - FDAst; Coluna 3 - FDAtt; Coluna 4 - HFDAst; Coluna 5 - HFDAAtt; Coluna 6 - CPAst; Coluna 7 - CPAtt; Coluna 8 - HPAst; Coluna 9 – HPAtt. Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas.

Na Tabela 5 estão apresentados o teor de proteína e GH das farinhas, concentrados e hidrolisados protéicos antes e após a digestão *in vitro*. Os teores de proteína da FDA e HFDA se mantiveram constantes após a digestão com as enzimas gastrintestinais enquanto que para o CPA e seus hidrolisados houve diminuição após a digestão com as enzimas gastrintestinais. As diferenças no teor de proteína das amostras pode ser explicada pela adição de HCl e NaOH para ajuste do pH no processo de digestão *in vitro*. Pacheco, Amaya-Farfan e Sgarbieri (2002) e Tiengo (2007), também reportaram diminuição do teor protéico após hidrólise enzimática.

Os hidrolisados protéicos após a digestão apresentaram maior grau de hidrólise que as proteínas íntegras digeridas. O aumento do GH após a digestão

indica que a ocorreu aumento dos grupos  $\alpha$ -amino e peptídeos foram formados durante a reação de hidrólise, o que significa que a ação das enzimas gastrintestinais foi efetiva, mesmo nos produtos previamente hidrolisados com Alcalase.

**Tabela 5.** Teor protéico e grau de hidrólise (GH) da farinha desengordurada, concentrado e hidrolisados protéicos de *Amaranthus cruentus*, antes e após a digestão *in vitro*

Amostras	Teor de proteína (%)		GH (%)*	
	antes da digestão com pep+panc	após a digestão com pep+panc	antes da digestão com pep+panc	após a digestão com pep+panc
FDAst	14,7 ± 0,3	15,5 ± 0,2	(nd)	24,2 ± 0,5 d
FDAtt	15,4±0,1	16,3 ± 0,3	(nd)	21,9 ± 0,6 e
HFDAst	14,3 ± 0,0	14,2 ± 0,2	24,4 ± 0,8 a	31,3 ± 0,5 a
HFDAtt	14,6 ± 0,0	13,7 ± 0,2	18,6 ± 0,9 b	27,8 ±0,8 b,c
CPAst	75,1 ± 0,9	61,3 ± 0,5	(nd)	27,2 ±1,2 c
CPAtt	77,4 ± 1,0	64,6 ± 0,1	(nd)	25,1 ± 1,2 d
HPAst	71,5 ± 0,6	58,6 ± 0,2	15,8 ±0,3 c	29,6 ± 0,9 a,b
HPAtt	71,4 ± 0,8	57,7 ± 0,3	19,7 ± 0,9 b	30,1 ± 1,4 a

\* determinado pelo método do TNBS (ADLER-NISSEN, 1979)

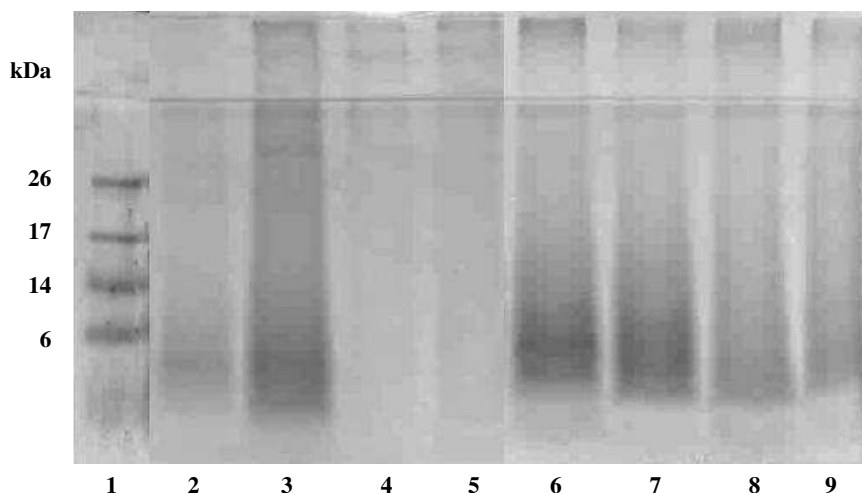
(nd) não determinado

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ )

Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas

Na Figura 11 observa-se o perfil eletroforético (SDS-PAGE-Tricina) dos digeridos da FDA, CPA e de seus hidrolisados. De acordo com os perfis, houve efetiva ação da digestão *in vitro* na produção dos peptídeos de baixo peso molecular, visto que as frações de PM > 17 kDa desapareceram nas amostras digeridas, com exceção do digerido da FDAtt (Figura 11 – Coluna 3), no qual observou-se a presença de uma banda tênue de PM > 26 kDa. O tratamento térmico das amostras teve pouco efeito sobre o perfil de peptídeos formados na digestão *in vitro*. Nos perfis dos digeridos dos hidrolisados da FDA (Figura 11 –

Colunas 4 e 5) não foram observadas a presença de bandas, sugerindo a formação de peptídeos de PM < 3 kDa ou aminoácidos livres, que não são corados eficientemente pelo Coomassie. Os digeridos representam um *pool* de peptídeos, simulando a digestão do amaranto no organismo.



**Figura 11.** Eletroforese (SDS-PAGE Tricina) dos digeridos da FDA, CPA e hidrolisados. Amostras a 2% de proteína. Coluna 1 - padrões; Coluna 2 - DFDAst; Coluna 3 - DFDAtt; Coluna 4 - DHFDAst; Coluna 5 - HFDAtt. Coluna 6 - DCPAst; Coluna 7 - DCPAtt; Coluna 8 - DHPAst; Coluna 9 - DHPAtt. Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas.

## 5.2 Compostos fenólicos

Os teores de fenóis totais nos extratos aquoso e metanólico das amostras (FIA, FDA, CPA, hidrolisados antes e após a digestão *in vitro*) estão apresentados na Tabela 6. Os teores de fenóis totais extraídos com metanol foram inferiores aos obtidos com água, comportamento similar ao reportado por Matthäus (2002), para amostras de sementes oleaginosas. No entanto, as propriedades dos solventes com diferentes polaridades levam às diferenças tanto no teor de compostos fenólicos como na capacidade antioxidante avaliada nos extratos (MATTHÄUS, 2002; GORINSTEIN *et al.*, 2007). O Reagente de Folin-Ciocalteu, utilizado na análise, não é específico para compostos fenólicos e pode ser reduzido por compostos não fenólicos, tais como aminas alifáticas terciárias, vitamina C, Cu (I), açúcares, aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina), entre outros.

Sendo assim, os teores de fenólicos reportados para os extratos aquosos podem estar superestimados, pois podem estar também abrangendo açúcares, além de proteínas, peptídeos e aminoácidos liberados pelos processos de obtenção do CPA e particularmente dos hidrolisados e digeridos (GAHLER, OTTO e BOHM, 2003; MATTHÄUS, 2002; MICHALSKA, CEGLINSKA e ZIELINSKI, 2007).

**Tabela 6.** Teor de fenóis totais (mg EAG/ g amostra) nas farinhas, concentrado protéico e hidrolisados protéicos de *Amaranthus cruentus*, antes e após a digestão *in vitro*

Amostras	Extrato aquoso		Extrato metanólico	
	antes da digestão com pep+panc	após a digestão com pep+panc	antes da digestão com pep+panc	após a digestão com pep+panc
FIA	1,6 ± 0,1 d	(nd)	0,5 ± 0,0 c,d	(nd)
FDAst	1,5 ± 0,0 d,C	2,9 ± 0,1 e,A	0,4 ± 0,0 d,D	2,1 ± 0,1 e,B
HFDAst	4,9 ± 0,2 b,c,A	5,3 ± 0,0 d,A	0,6 ± 0,0 c,d,C	3,6 ± 0,2 d,B
HFDAtt	4,7 ± 0,2 c,A	5,1 ± 0,1 d,A	0,8 ± 0,0 c,B	4,5 ± 0,2 d,A
CPAst	5,6 ± 0,3 b,B	19,6 ± 0,3 c,A	0,7 ± 0,0 c,C	19,2 ± 0,2 c,A
HPAst	26,0 ± 0,1 a,B	28,2 ± 0,1 a,A	20,3 ± 0,2 b,D	21,1 ± 0,0 b,C
HPAtt	26,5 ± 0,3 a,A	24,9 ± 0,1 b,B	22,6 ± 0,0 a,C	22,4 ± 0,2 a,C

(nd) não determinado

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ )

Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas

Os teores de fenóis totais das farinhas (FIA e FDA) e concentrado protéico (0,4 a 5,6 mg EAG/g amostra) estão na faixa dos valores reportados para amaranto na literatura, de 0,15 a 5,24 mg EAG/g amostra (CHITINDINGU *et al.*, 2007; CZERWINSKI *et al.*, 2004; GAMEL *et al.*, 2006; GORINSTEIN *et al.*, 2007).

Os produtos obtidos diretamente da farinha desengordurada apresentaram teores de fenólicos na mesma faixa: CPA, com 5,6 e 0,7 mg EAG/g amostra, em água e em metanol respectivamente e HFDAst com 4,9 e 0,6 mg EAG/g amostra,

em água e em metanol respectivamente. Por outro lado, os hidrolisados obtidos a partir dos concentrados protéicos apresentaram valores mais de 5 vezes superiores aos produtos obtidos diretamente da farinha. Estes valores indicam que a hidrólise com Alcalase após o processo de concentração das proteínas foi mais eficiente na liberação dos compostos fenólicos do que quando agiu diretamente na farinha, que tem uma matriz mais complexa.

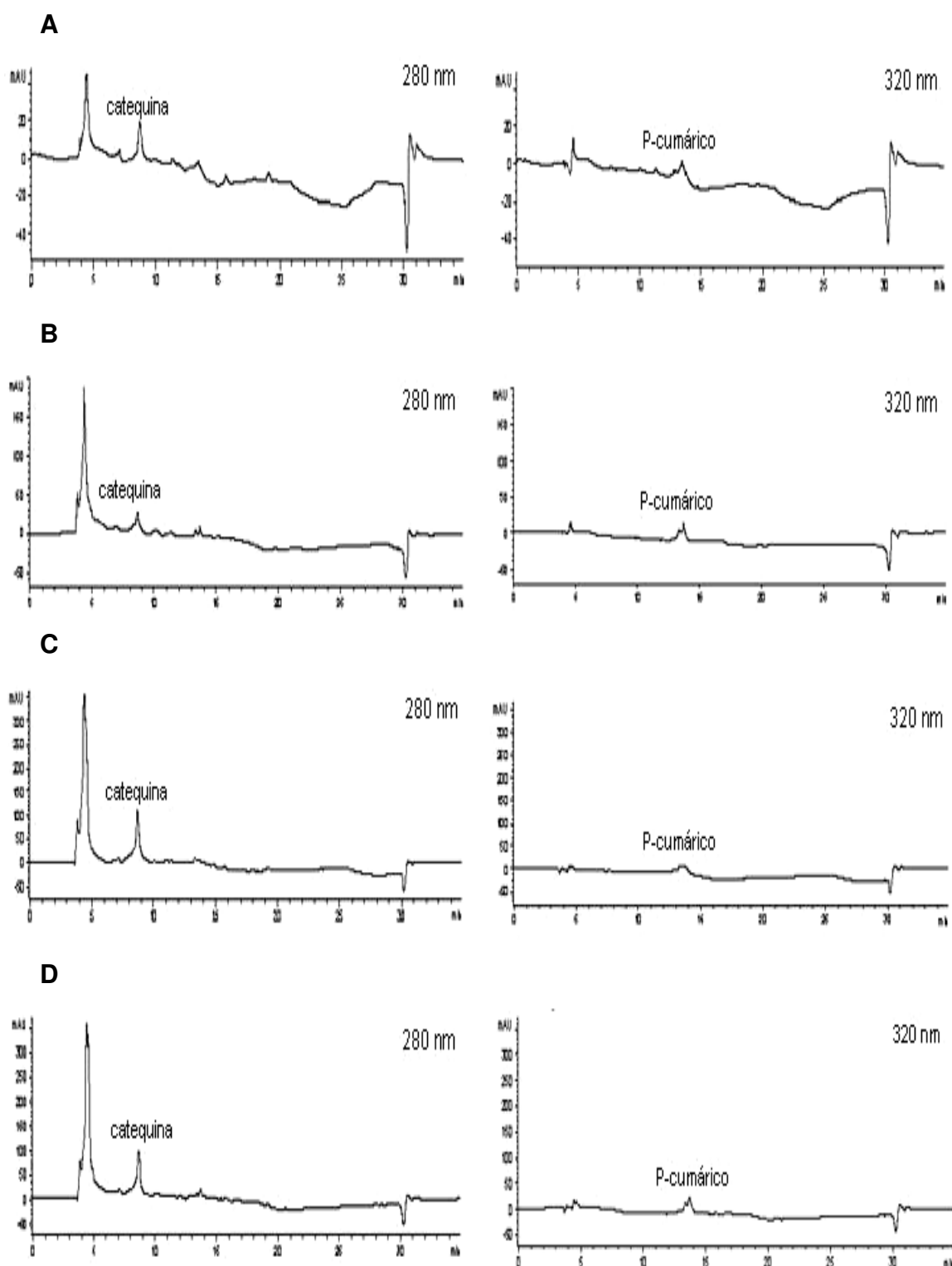
A digestão da FDA e do CPA foi bastante eficiente na liberação dos compostos fenólicos, o teor de fenóis no digerido do CPA foi 27 vezes maior que o presente no CPA antes da digestão. No entanto as diferenças antes e após a digestão não foram tão marcantes para os hidrolisados da FDA, em meio aquoso, e para os hidrolisados do CPA, em metanol ou em água. O teor de fenóis totais nos digeridos dos hidrolisados foi significativamente maior que nos digeridos das amostras de origem. Os fenóis, em geral covalentemente ligados aos polímeros da parede celular, podem ser liberados por tratamentos com álcalis, ácidos ou enzimas (MICHALSKA, CEGLINSKA e ZIELINSKI, 2007). Gahler, Otto e Bohm (2003) reportaram aumento do teor de fenóis totais das sementes de tomates em aproximadamente 300% como consequência de hidrólise alcalina.

O tratamento térmico (90 °C / 30 min) prévio à hidrólise com Alcalase ou à digestão *in vitro* não promoveu alterações significativas no teor de fenóis totais na maioria das amostras. Como exceção, houve redução significativa no teor de fenóis totais no digerido do hidrolisado do CPA submetido ao tratamento térmico prévio, em extrato aquoso, e menor teor de fenóis totais nos extratos metanólicos dos hidrolisados do CPAst antes e após a digestão *in vitro*, em relação aos hidrolisados do CPAtt. Gamel *et al.* (2006) observaram redução no teor de fenólicos em farinhas obtidas de grãos de amaranto cozido e da pipoca de amaranto em relação à farinha do grão de amaranto cru, enquanto em outros estudos foi observado o aumento do teor de fenóis totais nas amostras tratadas termicamente (DEWANTO, WU e LIU, 2002; GAHLER, OTTO e BOHM, 2003; JEONG, *et al.*, 2004; LI, PICKARD e BETA, 2007). Nestes estudos, o aumento do teor de fenóis totais foi atribuído à possível liberação dos fenólicos da matriz

alimentícia pela ação do calor. Além de liberar os compostos fenólicos, a ruptura das células pelo calor pode liberar enzimas oxidativas e hidrolíticas, como a polifenol oxidase, que irão destruir os antioxidantes presentes no alimento. O tratamento térmico aplicado deverá ser suficiente para inativar estas enzimas e impedir a redução dos compostos fenólicos (DEWANTO, WU e LIU, 2002). De acordo com JEONG *et al.* (2004), os compostos fenólicos podem se ligar diferentemente aos compostos presentes nos alimentos, por esta razão, processos efetivos de liberação podem ser diferentes em diferentes matrizes.

Os resultados de fenóis totais em mg EAG/g amostra dos hidrolisados da FDA antes e após a digestão *in vitro*, em extrato aquoso, e após a digestão, em metanol, são próximos aos encontrados no tronco do cipó-cruz (*Arrabidaea chica*) (4,5 mg EAG/g amostra). Os hidrolisados do CPA e o CPA digerido, bem como os digeridos do HPA, em metanol, apresentaram teor de fenóis totais maiores que o encontrado nas folhas do cipó-cruz (10,2 mg EAG/g amostra) e próximos ao presente na casca da *Bauhinia macrostachya* (24,3 mg EAG/g amostra). A *Arrabidaea chica* e a *Bauhinia macrostachya*, são plantas originárias da região amazônica e conhecidas por sua propriedade antioxidante (SILVA *et al.*, 2007).

O perfil cromatográfico dos compostos fenólicos da farinha desengordurada e de seus hidrolisados, antes e após a digestão *in vitro* estão apresentados na Figura 12. Para todas as amostras em estudo, apenas catequina e p-cumárico foram identificados (Figura 13). A identificação dos demais picos não foi possível, pois o tempo de retenção não coincidiu com o dos padrões utilizados (ácido gálico, ácido protocatecuico, epicatequina, metilgalato, etilgalato, propilgalato, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido sinápico, ácido ferúlico, resveratrol, ácido trans cinâmico, rutina, miricetina, morina, quercetina, luteolina, kaempferol, apigenina). Outros compostos fenólicos presentes podem estar glicosilados ou ainda estar complexados a outros componentes da amostra, dificultando a sua identificação.

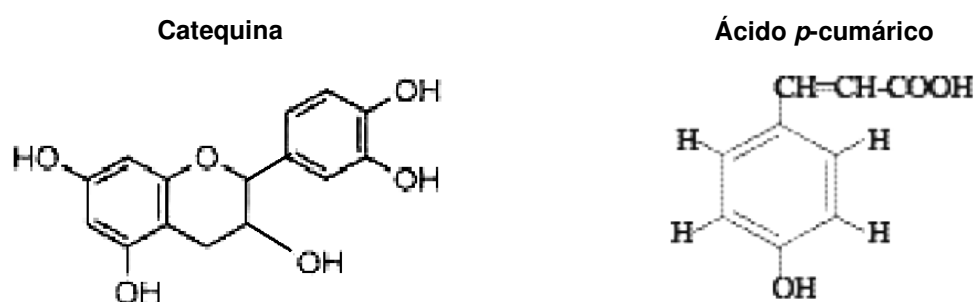


**Figura 12.** Perfis cromatográficos (CLAE) dos compostos fenólicos: A) FDA; B) HFDAtt; C) DFDAtt; D) DHFDAAtt. As figuras a direita referem-se aos



cromatogramas de identificação da catequina (280 nm) as figuras a esquerda do *p*-cumárico (320 nm). Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas.

Klimczak *et al.* (2002) reportaram para *A. cruentus* e *A. caudatus* a ocorrência dos ácidos fenólicos na forma livre: gálico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzóico, caféico, ferúlico, sináptico, salicílico e *p*-cumárico. O teor de *p*-cumárico variou de 5,20 a 43,57 µg/g de amostra, no *A. caudatus* e *A. paniculatus*, respectivamente. Os ácidos *p*-cumárico e ferúlico (derivados do ácido cinâmico) também foram identificados no caule do *A. hyponcondriacus* por Tejeda-Sartorius *et al.* (2004).



**Figura 13.** Estrutura química dos compostos fenólicos identificados no *Amaranthus cruentus*.

Os teores de catequina e *p*-cumárico estão apresentados na Tabela 7. O teor de catequina nas amostras não tratadas enzimaticamente se apresentou da seguinte forma: FDA> FIA> CPA (118,5; 97,3; 90,9 ug /g amostra respectivamente). A digestão *in vitro* promoveu a liberação de quantidades expressivas de catequina em particular no concentrado protéico e em seus hidrolisados, atingindo valores entre 1412,5 a 2978,8 ug /g amostra enquanto a hidrólise do CPA apenas com a Alcalase não teve efeito na liberação deste composto. Com exceção dos digeridos da farinha desengordurada, observou-se redução do teor de catequina nas amostras tratadas termicamente. O tratamento

térmico pode favorecer a reação fenol-proteína (BEJOSANO e CORKE, 1998; GAMEL *et al.*, 2006; PI-JEN e CHEN-HUE, 2006) o que pode ter levado à menor extração da catequina.

O teor de p-cumárico do CPA (8,3 ug /g amostra) foi maior que o da FIA e FDA (1,5 e 2,3 ug /g amostra). Os hidrolisados protéicos e todos os produtos após a digestão *in vitro* apresentaram menor teor de p-cumárico que o seu material de origem. Todas as amostras submetidas ao tratamento térmico prévio, com exceção do DHFDast, apresentaram maior teor de p-cumárico que as mesmas amostras não tratadas termicamente, ao contrário do observado para a catequina.

**Tabela 7.** Teores de catequina e p-cumárico detectados nas farinhas, concentrado e hidrolisados protéicos de *Amaranthus cruentus*, antes e após digestão *in vitro*

Amostras	Extrato metanólico			
	catequina (ug /g amostra)		p-coumarico (ug /g amostra)	
	antes da digestão com pep+panc	após a digestão com pep+panc	antes da digestão com pep+panc	após a digestão com pep+panc
<b>FIA</b>	97,3 ± 5,4	(nd)	1,5 ± 0,1	(nd)
<b>FDast</b>	118,5 ± 3,6	448,1 ± 4,8	2,3 ± 0,1	1,0 ± 0,0
<b>FDatt</b>	(nd)	576,1 ± 17,5	(nd)	1,4 ± 0,1
<b>HFDast</b>	218,8 ± 2,1	690,1 ± 23,3	1,7 ± 0,1	2,3 ± 0,1
<b>HFDatt</b>	175,2 ± 4,1	571,8 ± 10,1	2,0 ± 0,0	2,1 ± 0,1
<b>CPAst</b>	90,9 ± 0,5	2978,8 ± 59,2	8,3 ± 0,2	3,5 ± 0,0
<b>CPAtt</b>	(nd)	1412,5 ± 17,0	(nd)	4,1 ± 0,0
<b>HPAst</b>	-	2067,2 ± 26,0	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,0
<b>HPAtt</b>	-	1928,6 ± 35,5	2,6 ± 0,1	2,9 ± 0,2

(nd) não determinado

(-) composto não detectado

Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas

## **5.3 Capacidade antioxidante**

### **5.3.1 Capacidade seqüestradora do radical DPPH**

A capacidade seqüestradora do radical DPPH das farinhas, concentrado, hidrolisados e digeridos está apresentada na Tabela 8. Todos os produtos de amaranto analisados foram capazes de reagir com radicais livres e convertê-los em produtos estáveis. A FIA e a FDA apresentaram valores de capacidade antioxidante semelhantes, sugerindo que o desengorduramento parcial e a diminuição do teor de compostos tais como esqualeno, tocoferóis e tocotrienóis (Tabelas 2 e 3, respectivamente), conhecidos por sua propriedade antioxidante, mesmo em baixas concentrações (FENNEMA, 1996; MOREDA, PÉREZ-CAMINO e CERT, 2001), não afetaram a capacidade de reduzir o radical DPPH.

A capacidade antioxidante da FIA foi superior aos valores reportados na literatura para a farinha de soja e o isolado protéico de soja (0,67 e 0,58  $\mu\text{mol TE/g}$  amostra) (BARBOSA *et al.*, 2006). A hidrólise com Alcalase aumentou significativamente a capacidade antioxidante das farinhas (~2 vezes) e dos concentrados (~3 a 5 vezes) avaliada em ambos os solventes, com exceção do hidrolisado de farinha (HFDAtt) em metanol, cuja capacidade diminuiu após a hidrólise. O tratamento térmico prévio à hidrólise da farinha e do concentrado resultou em menor capacidade antioxidante dos hidrolisados ( $p < 0,05$ ), com exceção do extrato metanólico do hidrolisado do CPAAtt (HPAtt), que não apresentou alteração devido ao tratamento. Segundo Tsai e She (2006), os compostos fenólicos podem se modificar devido ao tratamento térmico, diminuindo a capacidade de seqüestrar o radical DPPH.

A digestão *in vitro*, tanto dos materiais originais (FDA e CPA) como dos seus hidrolisados, também resultou em aumento da capacidade antioxidante, em especial para o CPA e seus hidrolisados, que apresentaram os maiores valores de capacidade antioxidante. Yoshie-Stark *et al.* (2004) também observaram aumento da capacidade seqüestrante de DPPH da proteína de *Lupinus albus* após hidrólise com enzimas gastrintestinais.

Para a maioria das amostras, os extratos metanólicos e aquosos apresentaram valores diferentes de capacidade seqüestrante do DPPH. Para a farinha e seus hidrolisados e para o concentrado, os extratos aquosos apresentaram capacidade superior ou igual à dos extratos metanólicos enquanto para os hidrolisados do CPA o contrário foi observado: os extratos metanólicos apresentaram valores duas vezes superiores aos aquosos. A digestão *in vitro* alterou este quadro, pois os extratos metanólicos apresentaram maior capacidade antioxidante que os aquosos, de forma mais acentuada para os extratos do CPA e de seus hidrolisados. Estas diferenças podem ser devidas às interferências do próprio solvente ou aos diferentes compostos extraídos. Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2006) observaram que a capacidade antioxidante da mistura de ácido gálico: catequina (1 M:1 M) em água foi 19% menor que a das amostras em acetona/água (50:50 v/v) e metanol puro. Esta variação pode ser explicada pela interação dos compostos antioxidantes com o solvente e pela solubilidade dos compostos presentes nas amostras. É de se esperar que os extratos aquosos contenham proteínas e peptídeos formados devido à hidrólise com Alcalase e/ou com as enzimas gastrintestinais, pois são componentes, principalmente os últimos, que apresentam alta solubilidade em água (MAHMOUD, 1994; YIM e LEE, 2000) enquanto os extratos metanólicos contenham produtos de caráter hidrofóbico tais como os compostos fenólicos e eventualmente aminoácidos ou peptídeos hidrofóbicos.

Importante salientar que tanto a hidrólise com Alcalase como a digestão *in vitro* tiveram como resultado a diminuição do peso molecular dos peptídeos (comprovados por eletroforese Figuras 10 e 11) e liberação de compostos fenólicos (Tabela 6), sendo que ambos os efeitos foram mais evidentes para os produtos após a digestão com as enzimas gastrintestinais. Os principais compostos estudados que apresentam capacidade antioxidantes são os fenólicos e peptídeos, principalmente os de baixo peso molecular (MADHUJITH e SHAHIDI, 2005; PEÑA-RAMOS, XIONG e ARTEAGA, 2004), o que explicaria a maior capacidade antioxidante dos digeridos.

**Tabela 8.** Capacidade seqüestrante do radical DPPH de farinhas, concentrados e hidrolisados protéicos de *Amaranthus cruentus*, antes e após digestão in vitro. Resultados expressos em  $\mu\text{mol TE/g}$  amostra

Amostras	Extrato aquoso		Extrato metanólico	
	antes da digestão com pep+panc	após a digestão com pep+panc	antes da digestão com pep+panc	após a digestão com pep+panc
FIA	2,22 $\pm$ 0,00 e	(nd)	1,60 $\pm$ 0,03 c	(nd)
FDAst	1,98 $\pm$ 0,00 e,C	2,48 $\pm$ 0,03 c,B	1,48 $\pm$ 0,01 c,D	4,08 $\pm$ 0,07 e,A
HFDAst	4,21 $\pm$ 0,06 c,B	4,43 $\pm$ 0,08 b,B	3,00 $\pm$ 0,15 b,B	5,39 $\pm$ 0,03 d,A
HFDAtt	2,95 $\pm$ 0,04 d,B	4,02 $\pm$ 0,14 b,A	1,00 $\pm$ 0,01 d,C	4,00 $\pm$ 0,04 e,A
CPAst	2,27 $\pm$ 0,04 e,C	12,17 $\pm$ 0,21a,B	2,72 $\pm$ 0,01 b,C	19,70 $\pm$ 0,04 b,A
HPAst	7,97 $\pm$ 0,19 a,D	12,46 $\pm$ 0,03 a,C	14,98 $\pm$ 0,01a,B	21,22 $\pm$ 0,21 a,A
HPAtt	7,08 $\pm$ 0,12 b,D	12,20 $\pm$ 0,08 a,C	14,82 $\pm$ 0,17a,A	13,78 $\pm$ 0,19 c,B

(nd) não determinado

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ )

Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas

A presença de diferentes compostos na composição do material de análise, como no caso de alimentos, parece ser de grande importância na análise da capacidade antioxidante. Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2006) observaram que alguns compostos, como certos tipos de carboidratos e de aminoácidos, são capazes de potencializar o efeito antioxidante dos compostos fenólicos embora não sejam capazes de exercer tal efeito isoladamente. O contrário também ocorre: compostos que apresentaram resposta antioxidante isolados quando combinados a compostos fenólicos tiveram a capacidade antioxidante reduzida.

### 5.3.2 ORAC

Todas as amostras analisadas apresentaram proteção antioxidante contra os radicais peróxidos. Os valores de ORAC variaram de aproximadamente 9 a 370  $\mu\text{mol TE/g}$  amostra, dependendo do tratamento aplicado na amostra e do tipo de

extração (Tabela 9). Assim como mostrou a avaliação por DPPH, o desengorduramento da farinha não alterou a propriedade antioxidante da farinha. O CPA apresentou valor de ORAC 8 vezes superior ao da farinha quando avaliado o extrato aquoso e apenas 30% superior quando avaliado o extrato metanólico.

As amostras após a hidrólise com Alcalase mostraram aumento de até 13 vezes (HFDA<sub>tt</sub>) da capacidade antioxidante contra os radicais peroxil, quando a avaliação foi realizada em extrato aquoso. Quando avaliado o extrato metanólico, verificou-se que a hidrólise do CPA aumentou em 15 vezes o valor de ORAC, porém a hidrólise não aumentou o valor de ORAC da farinha desengordurada.

**Tabela 9.** Capacidade seqüestrante de radicais peroxil (valor de ORAC) de farinhas, concentrados e hidrolisados protéicos de *Amaranthus cruentus*, antes e após digestão *in vitro*. Resultados estão expressos em µmol TE/g amostra.

Amostras	Extrato aquoso		Extrato metanólico	
	antes d digestão com pep+panc	Após a digestão com pep+panc	Antes da digestão com pep+panc	Após a digestão com pep+panc
FIA	8,92 ± 0,79 e	(nd)	12,27 ± 1,44 c	(nd)
FDAs <sub>t</sub>	9,95 ± 0,36 e,C	110,13 ± 2,59 a,b,A	13,47 ± 1,37 c,C	29,22 ± 1,62 d,B
HFDA <sub>s</sub> <sub>t</sub>	60,70 ± 3,77 d,B	83,09 ± 2,51 b,A	17,71 ± 1,34 c,C	18,76 ± 2,23 d,C
HFDA <sub>tt</sub>	122,77 ± 11,94 b,A	25,71 ± 2,15 c,B	14,64 ± 0,07 c,B	4,97 ± 0,50 d,B
CPAs <sub>t</sub>	82,13 ± 2,64 c,C	129,82 ± 1,05 a,B	18,38 ± 0,61 c,D	213,91 ± 6,84 c,A
HPAs <sub>t</sub>	139,80 ± 4,26 a,C	152,46 ± 11,42 a,C	212,18 ± 19,81 b,B	279,17 ± 7,78 b,A
HPA <sub>tt</sub>	135,99 ± 4,81a,b,C	127,35 ± 2,16 a,C	282,60 ± 3,83 a,B	369,18 ± 20,93 a,A

(nd) não determinado

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença estatística (p < 0,05)

Significados das siglas estão apresentados na Lista de Abreviaturas

A digestão *in vitro* aumentou a capacidade antioxidante das amostras de origem em até 12 vezes. A capacidade antioxidante do CPA após a digestão

apresentou aumento cerca 1,5 vez em meio aquoso enquanto em meio metanólico aumentou cerca de 11 vezes . Para FDA, observou-se maior aumento da capacidade antioxidante, após a digestão, quando avaliada em meio aquoso (~10 vezes). Os hidrolisados da FDA apresentaram aumentos menores ou diminuição dos valores de ORAC (para ambos os solventes) após a digestão *in vitro*. Os hidrolisados de CPA apresentaram pequeno aumento da capacidade após a digestão, significativo apenas quando avaliada em extrato metanólico.

Os extratos aquosos dos hidrolisados da FDA, antes e após a digestão *in vitro*, e o do CPA, apresentaram maiores valores de ORAC que os extratos metanólicos enquanto os digeridos do CPA e de seus hidrolisados obtiveram maior valor de ORAC em meio metanólico.

Estes resultados sugerem que peptídeos de baixo peso molecular derivados da digestão *in vitro* assim como os compostos fenólicos são importantes antioxidantes, conforme avaliado pelo ensaio de ORAC. Segundo Gorinstein *et al.* (2007), a maioria dos antioxidantes em pseudocereais são polifenóis, no entanto as proteínas também exercem importante papel na atividade antioxidante, com efetivo efeito na inibição da peroxidação lipídica e atuando contra os radicais livres.

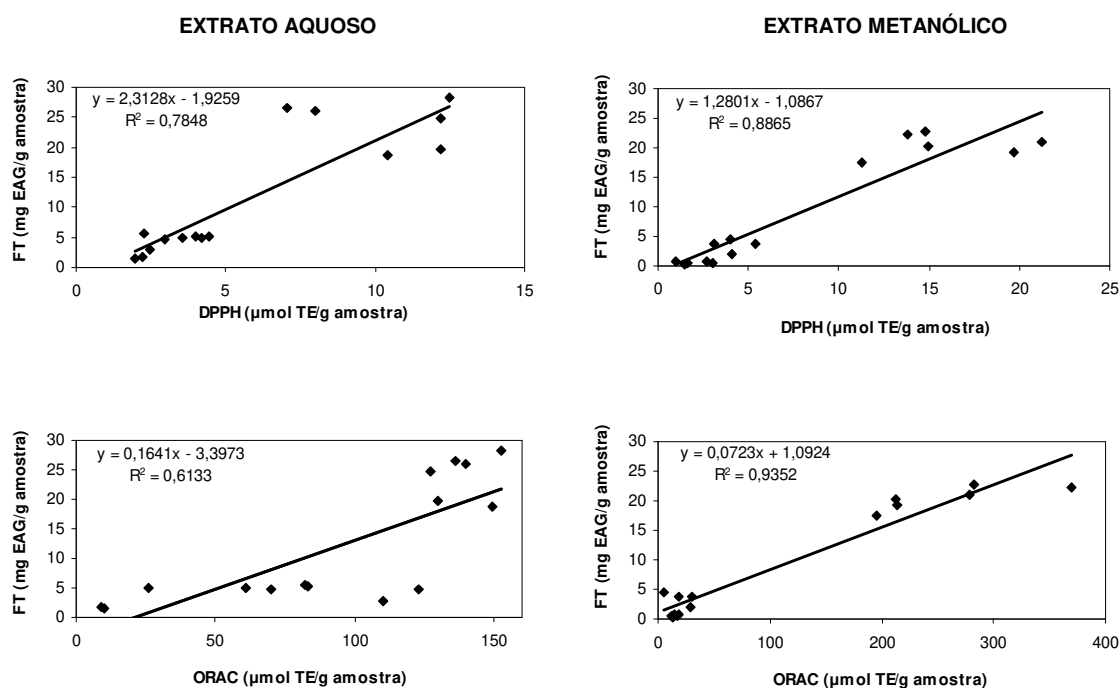
### **5.3.3 Relação entre capacidade antioxidante e teor de fenólicos totais**

Como os fenólicos são os principais compostos antioxidantes de origem alimentar, fez-se um estudo de correlação entre os teores de fenólicos dos produtos de amaranto e da capacidade antioxidante, avaliada tanto pelo método do DPPH como por ORAC (Figura 14). A correlação entre a capacidade antioxidante (DPPH ou ORAC) vs fenóis totais, avaliados em extrato metanólico, apresentou  $r^2$  0,89 e 0,94, respectivamente. Esta alta correlação sugere a maior influência dos compostos fenólicos em ambas as medidas da capacidade antioxidante. Zheng e Wang (2003) obtiveram correlação de 0,99 entre os valores de ORAC e fenóis totais para extratos de “berries”. Silva et al. (2007) também

reportaram alta correlação ( $r^2 = 0,70$ ,  $n = 62$ ) entre os valores de ORAC e o teor de compostos fenólicos presentes em diversas plantas da região amazônica.

Para a avaliação realizada em extrato aquoso, os valores de  $r^2$  foram inferiores aos obtidos para avaliação em extrato metanólico, 0,79 para DPPH e 0,61 para ORAC. Os valores de ORAC em extrato aquoso mostraram grande variabilidade na região de menor concentração de fenólicos, fato não observado para a habilidade de seqüestrar DPPH. Os extratos aquosos que apresentaram menor teor de fenóis foram os obtidos da farinha e seus hidrolisados, a variabilidade deve-se, possivelmente, à presença de outros compostos tais como peptídeos de diferentes tamanhos e estruturas, proteínas, açúcares, entre outros. Segundo Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2006), determinados carboidratos, proteínas e aminoácidos, podem elevar consideravelmente o efeito antioxidante dos fenólicos, mesmo não apresentando atividade individualmente, o que pode superestimar a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes nos alimentos. A capacidade antioxidante de hidrolisados está relacionada à composição e a seqüência dos aminoácidos (PEÑA-RAMOS, XIONG E ARTEAGA, 2004), e ao tamanho dos peptídeos liberados após a hidrólise (WANG *et al.*, 2006). Wang e Xiong (2005) e Je, Park e Kim (2005) observaram maior poder antioxidante em peptídeos de baixo peso molecular ( $< 6\text{kDa}$  e  $< 1\text{kDa}$ , respectivamente).

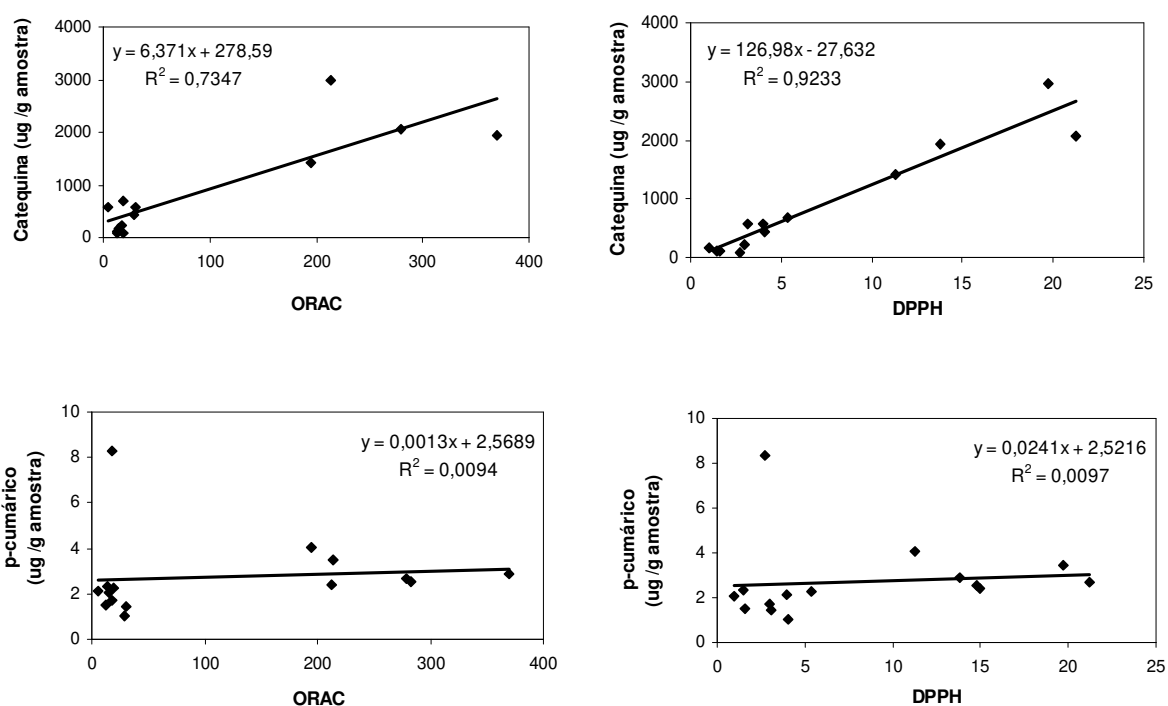




**Figura 14.** Correlação entre a capacidade antioxidante (DPPH ou ORAC) e o teor de fenóis totais (n = 15)

Tendo em vista que os compostos fenólicos identificados e quantificados – catequina e p-cumárico (Figura 13; Tabela 7) - apresentam diferentes estruturas químicas e concentrações, foi realizada análise da correlação entre o teor de catequina e p-cumárico e a capacidade de seqüestrar os radicais DPPH e peroxil (ORAC) das amostras de amaranto (Figura 15). Entre os teores de p-cumárico e capacidade antioxidante não houve correlação. Para a análise de correlação entre o teor de catequina e a capacidade antioxidante, os valores obtidos para os hidrolisados protéicos do CPA não foram utilizados, já que a catequina não foi identificada nestas amostras e a retirada destes pontos elevou o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,34 para 0,74 (ORAC) e de 0,49 para 0,92 (DPPH). Os resultados sugerem forte influência da catequina no poder antioxidante das amostras de amaranto. O número de radicais hidroxil e a presença de ligações duplas em ressonância influenciam a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos (FOTI *et al.*, 1996). Segundo Foti *et al.* (1996) a catequina apresentou

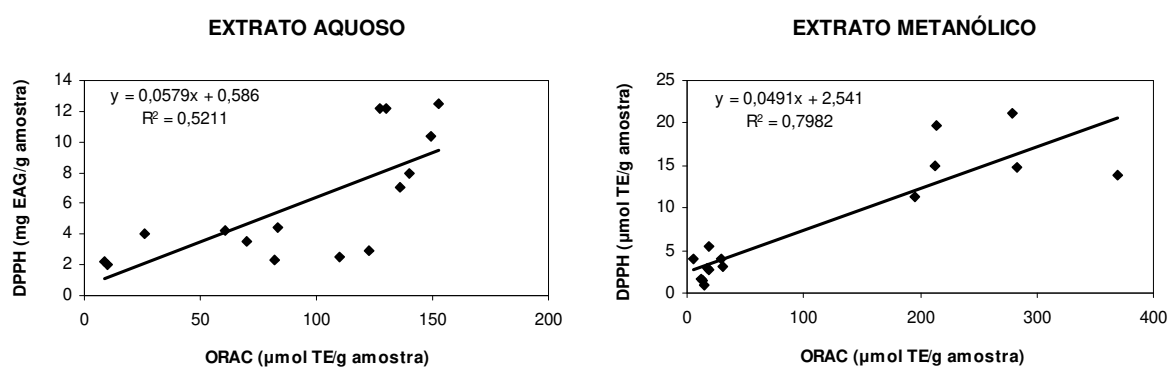
maior poder antioxidante que o ácido p-cumárico (~ 20 vezes), quando avaliada pela inibição da oxidação do ácido linoléico. A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos depende também da concentração dos compostos na amostra (ZHENG e WANG, 2003). A concentração da catequina foi até 3000 vezes maior que a do p-cumárico, o que contribuiu para sua maior influência na capacidade antioxidante dos produtos de amaranto.



**Figura 15.** Correlação entre os compostos fenólicos identificados (catequina e p-cumárico) e a capacidade antioxidante (DPPH ou ORAC)

A correlação entre os dois métodos de avaliação da capacidade antioxidante (DPPH vs ORAC) realizados no presente estudo foi 0,80 para o extrato metanólico e 0,52 para o extrato aquoso (Figura 16). A baixa correlação encontrada quando utilizado o extrato aquoso para avaliação mais uma vez sugere a importância dos compostos hidrossolúveis nas medidas realizadas. De

acordo com Silva et al. (2007), a baixa correlação entre dois métodos antioxidantes demonstra também que apenas um ensaio é insuficiente para avaliar a capacidade antioxidante total.



**Figura 16.** Correlação entre os resultados obtidos por capacidade sequestradora de radicais DPPH e capacidade sequestradora de radicais peroxil (ORAC) (n = 15).

## 6. Conclusões

As farinhas integral e desengordurada de amaranto possuem elevados teores de tocoferóis e tocotrienóis (35,7 e 4,4 mg/Kg de farinha) e de esqualeno (4,0 e 2,2 g /100g óleo) que fazem com que estes produtos apresentem alto potencial como alimento funcional. No entanto, a redução do teor destes compostos não teve impacto na atividade antioxidante destes produtos.

Os teores de compostos fenólicos determinados em meio aquoso foram superiores aos determinados em extrato metanólico, sugerindo que houve extração de açúcares, proteínas e/ou peptídeos, que também reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu.

Todos os produtos obtidos do amaranto apresentaram capacidade antioxidante, avaliada pela capacidade seqüestrante do DPPH e de radicais peroxil (valor de ORAC). As diferenças observadas entre os métodos de avaliação da capacidade antioxidante se devem à ação dos compostos presentes nos produtos em relação ao solvente e ao método utilizado. O processo de obtenção do concentrado, a hidrólise com Alcalase e a digestão *in vitro* resultaram em aumento da capacidade antioxidante devido ao aumento do teor de compostos fenólicos e à formação de peptídeos de baixo peso molecular como consequência dos tratamentos alcalino e enzimático utilizados.

O aumento da capacidade antioxidante em todos os produtos, após a digestão enzimática *in vitro*, com destaque para o concentrado protéico e para o hidrolisado do concentrado protéico, sugere que o mesmo ocorre no processo fisiológico.

A elevada capacidade antioxidante observada, em especial para o concentrado protéico e seu hidrolisado com Alcalase, indica o alto potencial do amaranto como fonte de ingredientes funcionais. Estes resultados, aliados à composição química, alto valor nutricional e às características de cultivo, mostram o grande valor da cultura do amaranto, ainda incipiente no Brasil.

## 7. Referências Bibliográficas

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.27, n.6, p.1256-1262, 1979.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier Applied Science, 1986. 427p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 14 de jun de 2006.

AVANZA, M.C.; AÑÓN, M.C. Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Hoboken: v.87, n.4, p.616-623, 2007.

AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. **Food Chemistry**, Oxford, v.58, n.4, p.355-359, 1997.

AOAC. Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemistry**. 16 ed. Arlington: AOAC, 1995.

American Oil Chemist's Society – AOCS. **Official and tentative methods. Method AOCS Ce 8-89**. Champaign, 1996. p.1-5, 37p.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**. v.11, n.11, p.419-421, 2000.

BARBA DE LA ROSA, A.P; GUEGUEN, J.; PAREDES-LÓPEZ, O.; VIROBEN, G. Fractionation procedures, eletrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.40, n.6, p.931-936. 1992.

BARBOSA, A.C.L.; HASSIMOTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas: v.26, n.4, p.921-926, 2006.

BARTOLOMÉ, B.; ESTRELLA, I.; HERNÁNDEZ, M.T. Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA). **Food Chemistry and Toxicology**, v.65, n.4, p.617-621, 2000.

BECKER, E.M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, Berlim, v.219, p.561-571, 2004.

- BECKER, R. Preparation, composition, and nutritional implications of amaranth seed oil. **Cereal Foods World**. v.34, n.11, p.950-953, 1989.
- BECKER, R; WHEELER, E.L; LORENZ, K.; STAFFORD, A.E; GROSJEAN, O.K.; BETSCHART, A.A.; SAUNDERS, R.M. A composition study of amaranth grain. **Journal of Food Science**. v.46, n.4, p.1175-1180, 1981.
- BEJOSANO, F.P.; CORKE, H. Protein quality evaluation of *Amaranthus* whole meal flours and protein concentrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken: v. 76, n.1, p. 100-106, 1998.
- BERGANZA, B.E.; MORAN, A.W.; RODRÍGUEZ M., G; COTO, N.M; SANTAMARÍA, M.; BRESSANI, R. Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth. **Plant Food for Human Nutrition**, Dordrecht, v.58, n.3, p.1-6, 2003.
- BERGER, A.; MONNARD, I.; DIONISI, F.; GUMY, D.; HAYES, K.C.; LAMBELET, P. Cholesterol-lowering properties of amaranth flakes, crude and refined oils in hamsters. **Food Chemistry**, Oxford, v.81, n.1, p.119-124, 2003.
- BETSCHART, A.A.; IRVING, D.W.; SHEPHERD, A.D.; SAUNDERS, R.M. *Amaranthus cruentus*: milling characteristics, distribution of nutrients within seeds components, and the effects of temperature on nutrition quality. **Journal of Food Science**. v.46, n.4, p.1181-1187, 1981.
- BLÁCIDO, D.R.T. Filmes a base de derivados do amaranto para uso em alimentos. **Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v.181, p.1199-1200, 1958.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**. V.28, n.1, p.25-30, 1995.
- BREENE, W.M. Food uses of grain amaranth. **Cereal Foods World**, v.36, n.5, p.426-430, 1991.
- BRESSANI, R. The proteins of grain amaranth. **Food Review International**, v.5, n.1, p.13-38, 1989.
- BURNS, J.; GARDNER, P.T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G.G.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.49, n.12, p.5797-5808, 2001.

CASTELLANI, O.F.; MARTINEZ, E.N.; AÑÓN, M.C. Amaranth globulin structure modifications induced by enzymatic proteolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.48, n.11, p.5624-5629, 2000.

CHEN, H.M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant activity of designed peptides base don the antioxidative peptide isolated from digest of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.44, n.1, p.2619-2623, 1996.

CHITINDINGU, K.; NDHLALA, A.R.; CHAPANO, C.; BENHURA, M.A.; MUCHUWETI, M. Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities of *Amaranthus hybridus* (Pigweed), *Brachiaria brizantha* (Upright brachiaria) and *Panicum maximum* (guinea grass). **Journal of Food Biochemistry**, v.31, n.2, p.206-216, 2007.

COELHO, K.D. Desenvolvimento e avaliação de aceitação de cereais matinais e barras de cereais à base de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.). **Dissertação de Mestrado em Saúde Pública** – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

COSTA, E.L; GONTIJO, J.A.R.; NETTO, F.M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 623-640, 2007.

CUMBY, N.; ZHONG, Y.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. **Food Chemistry**, Oxford, v.109, n.1, p.144-148, 2008.

CZERWINSKI, J.; BARTNIKOWSKA, E.; LEONTOWICZ, H.; LANGE, E.; LEONTOWICZ, M.; KATRICH, E.; TRAKTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol containing diets. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.15, n.10, p.622-629, 2004.

DANZ, R.A.; LUPTON, J.R. Physiological effects of dietary amaranth (*Amaranthus cruentus*) on rats. **Cereal Foods World**, v.37, n.7, p.489-494, 1992.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CÓRDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC- Fluorescein) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.52, n.1, p.48-54, 2004.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ,N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.5, n.1, p.33-40, 2004.

DEWANTO, V.; WU, X.; LIU, R.H. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.50, n.17, p.4959-4964, 2002.

DÍAZ, M.; DECKER, E. Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.52, n.26, p.8208-8213, 2004.

EBERHARDT, M.V.; KOBIRA, K.; KECK, A.S.; JUVIK, J.A.; JEFFERY, E.H. Correlation analysis of phytochemical composition, chemical, and cellular measures of antioxidant activity of broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. italica). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.53, n.19, p.7421-7431, 2005.

ESCUDERO, N.L.; ARELLANO, M.L.; LUCO, J.M.; GIMÉNEZ, M.S.; MUCCIARELLI, S.I. Comparison of the chemical composition and nutritional value of the *Amaranthus cruentus* flour and its protein concentrate. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.59, n.1, p.15-21, 2004.

FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3<sup>a</sup> ed. New York, 1996. 1069 p.

FOTI, M.; PIATELLI, M. BARATTA, M.T.; RUBERTO, G. **Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship**. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.44, n.2, p.497-501, 1996.

GAHLER, S.; OTTO, K.; BÖHM, V. Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.51, n.27, p.7962-7968, 2003.

GAMEL, T.H.; LINSSSEN, J.P.; MESALLEM, A.S.; DAMIR, A.A.; SHEKIB, L.A. Effect of seed treatments on the chemical composition and properties of two amaranth species: starch and protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Hoboken: v. 85, n. 2, p. 319-327, 2005.

GAMEL, T.H.; LINSSSEN, J.P.; MESALLEM, A.S.; DAMIR, A.A.; SHEKIB, L.A. Seed treatments affect functional and antinutritional properties of amaranth flours. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Hoboken: v.86, n.7, p.1095-1102, 2006.

GORINSTEIN, S.; NUE, I.A.; ARRUDA, O. Alcohol-soluble and total proteins from amaranth seeds and their comparison with other cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.33, p.848-850, 1991.

GORINSTEIN, S.; VARGAS, O.J.M.; JARAMILLO, N.O.; SALAS, I.A.; AYALA, A.L.M.; ARANCIBIA-AVILA, P.; TOLEDO, F.; KATRICH, E.; TRAKHTENBERG, S. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. **European Food Research and Technology**, New York, v.225, n.3-4, p.321-328, 2007.

GUILLEN-PORTAL, F.R.; BALTENSBERGER, D.D.; NELSON, L.A. Plant population influence on yield and agronomic traits in plainsman grain amaranth. In:



Janick (ed.), **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria, VA., ASHS Press, p. 190-193, 1999.

HALLIWELL, B.; RAFTER, A.; JENNER, A. Health promotion by tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.81, n.1, p.268S-276S, 2005.

HAMES, B.D. **Gel eletrophoresis of proteins – A practical approach**. 3<sup>a</sup> ed. New York, 1998. p.46-47.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**. Londres: v.22, n.7, p.475-476, 1973.

HE, H.P.; CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Extraction and purification of squalene from *Amaranthus* grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.50, n.2, p.368-372, 2002.

HE, H.P.; CORKE, H. Oil and squalene in *amaranthus* grain and leaf. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.51, n.27, p.7913-7920, 2003.

HENN, R.L.; NETTO, F.M. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v. 46, n. 8, p.3009-3015, 1998.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v. 50, n.7, p.1815-1821, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

ISMAIL, A.; MARJAN, Z.M.; FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, Oxford, v.87, n.4, p.581-586, 2004.

ISSA, A.Y.; VOLATE, S.R.; WARGOVICH, M.J. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, n.5, p.405-419, 2006.

JE, J.Y.; PARK, P.J.; KIM, S.K. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. **Food Research International**, v.38, n.1, p.45-50, 2005.

JEONG, S.M.; KIM, S.Y.; KIM, D.R.; JO, S.C.; NAM, K.C.; AHN, D.U.; LEE, S.C. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.52, n.11, p.3389-3393, 2004.

- KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUCHA, J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.47, n.10, p.3954-3962, 1999.
- KIM, S.K.; BYUN, H.G.; PARK, P.J.; SHAHIDI, F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.49, n.6, p.2992-2997, 2001.
- KIM, H.K.; KIM, M.J.; CHO, H.Y.; KIM, E.K.; SHIN, D.H. Antioxidative and anti-diabetic effects of amaranth (*Amaranthus esculantus*) in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochemistry and Function**, Great Britain, v.24, n.3, p.195-199, 2005.
- KITTS, D.D. Antioxidant properties of caseinphosphopeptides. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, n.12, p.549-554, 2005.
- KLIMCZAK, M.M.; PACHOLEK, B. Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. **Nahrung**, v.46, n.3, p.184-186, 2002.
- KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.945-960, 2005.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**. London. v.27, p.680-685, 1970.
- LEHMANN, J.W.; PUTNAM, D.H.; QURESHI, A.A. Vitamin E Isomers in Grain Amaranths (*Amaranthus* spp.). **Lipids**, Champaign, v.29, n.3, p.177-181, 1994.
- LEHMANN, J.W. Case history of grain amaranth as an alternative crop. **Cereal Foods World**, v.41, n.5, p.399-411, 1996.
- LI, W.; PICKARD, M.D.; BETA, T. Effect of thermal processing on the antioxidant properties of purple wheat bran. **Food Chemistry**, Oxford, v.104, n.3, p.1080-1086, 2007.
- MADHUJITH, T.; SHAHIDI, F. Antioxidant potencial of pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, v.70, n.1, p.s85-s90, 2005.
- MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 89-95, 1994.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.79, n.5, p.727-47, 2004.
- MARCÍLIO, R.; AMAYA-FARFAN, J.; CIACCO, C.F.; SPEHAR, C.R. Fracionamento do grão de *Amaranthus cruentus* brasileiro por moagem e suas

características composicionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.3, p.511-516, 2003.

MARCONE, M.F. Evidence confirming the existence of a 7S globulin-like storage protein in *Amaranthus hypochondriacus* seed. **Food Chemistry**, Oxford, v. 65, n. 4, p. 533-542, 1999.

MARTINEZ, E.N.; AÑÓN, M.C. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.44, n.9, p.2423-2430, 1996.

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

MARTINEZ-VALVERDE, L.; PERIAGRO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.50, n.1, p.5-18, 2000.

MARTIROSYAN, D.M.; MIROSHNICHENKO, L.A.; KULAKOVA, S.N. Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. **Lipids Research and Disease**, v.6, n.1, p.1-12, 2007.

MATTHÄUS, B. Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Residues of Different Oilseeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.50, n.12, p.3444-3452, 2002.

MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S.K. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.53, n.3, p.581-587, 2005.

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

MICHALSKA, A.; CEGLINSKA, A.; ZIELINSKI, H. Bioactive compounds in rye flours with different extraction rates. **European Food Research and Technology**, Berlin, v.225, n.3-4, p.545-551, 2007.

MOREDA, W.; PÉREZ-CAMINO, M.C.; CERT, A. Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, v.936, n.1-2, p.159-171, 2001.

NAGUIB, Y.M.A. A fluorimetric method for measurement of oxygen radical-scavenging activity of water-soluble antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v.284, n.1, p.93-98, 2000.

NENADIS, N.; TSIMIDOU, M. Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.79, n.3, p.257-259, 2002.

NSIMBA, R.Y; KIKUZAKI, H.; KONISHI, Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. **Food Chemistry**, Oxford, v.106, n.2, p.760-766, 2008.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.50, n.11, p.3122-3128, 2002.

PACHECO, M.T.; AMAYA-FARFAN, J.; SGARBIERI, V.C. Partial characterization of a whey protein concentrate and its enzyme hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v.26, n.4, p. 327-338, 2002.

PAREDES-LÓPEZ, O; MORA-ESCOBEDO, R; ORDORICA-FALOMIR, C. Isolation of amaranth proteins. **LWT – Food Science and Technology**. Oxford, v.21, n.1, p.59-61, 1988.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; CARVALHO, P.O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.31, n.2, p.200-2006, 1997.

PEÑA-RAMOS, E.A.; XIONG, Y.L.; ARTEAGA, G.E. Fractionation and characterization for antioxidant activity of hydrolyzed whey protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v.84, n.14, p.1908-1918, 2004.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**. v.39, n.7, p. 791-800, 2006.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.51, n.11, p.3273-3279, 2003.

RAUHA, J.P.; REMES, S.; HEINONEN, M; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of finish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam: v.56, n.1, p.3-12, 2000.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L.R. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in linoleic acid oxidation system. **Food Chemistry**, Oxford, v.86, n.1, p.99-103, 2004.

SAUNDERS, R.M.; BECKER, R. Amaranthus: a potencial food and feed resource. **Advances in Cereal Science and Technology**, v.6, p.357-396, 1984.

- SAS - Statistical Analysis System.** System for Windows, versão 9.1.3. Cary, (N.C., USA): SAS Institute, 2003.
- SCILINGO, A.A.; ORTIZ, S.E.M.; MARTINEZ, E.S.; AÑÓN, M.C. Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. **Food Research International**, v.35, n.9, p855-862, 2002.
- SCHÄGER, H.; JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins on the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v.166, n.2, p.368-379, 1987.
- SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity and related phenolic compounds of *Xanthium strumarium* extracts. *Phytochemistry*, submitted, 2007.
- SEGURA-NIETO, M.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, N.; RUBIO-VELÁZQUEZ, H.; OLGUIN-MARTINEZ, L.E.; RODRÍGUEZ-NESTER, C.E.; HERRERA-ESTRELLA, L. Characterization of amaranth (*Amaranth Hypocondriacus* L.) seed proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.40, n.9, p.1553-1558, 1992.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos**. 1 ed. São Paulo: Varela, 1996. p.229.
- SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T. Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.21, n.1-2, p.7-19, 1999.
- SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, Oxford, v.101, n.3, p.1012-1018, 2007.
- SILVA-SANCHEZ, C.; GONZÁLES-CASTANEDA, J.; LEON-RODRIGUEZ, A.; BARBA DE LA ROSA, A.P. Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two mexican varieties. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.59, n.4, p.169-174, 2004.
- SINGH, R.P.; MURTHY, K.N.C.; JAYAPRAKASHA, G.K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.50, n.1, p.81-86, 2002.
- SINHA, R; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, Oxford, v.101, n.4, p.1484-1491, 2006.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Filadélfia, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRÃNDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SUETSUNA, K.; UKEDA, H.; OCHI, H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.11, n.3, p.128-130, 2000.

TEJEDA-SARTORIUS, O.; ESCALANTE-ESTRADA, A.; SOTO-HERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, M.T.; VIBRANS, H.; RAMÍREZ-GUZMÁN, M.E. Inhibidores de la germinación en el residuo seco del tallo del amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*). **Revista de la Sociedad Química de México**, Mexico, vol.48, n.2, p.118-123, 2004.

TEUTONICO, R.A.; KNORR, D. Amaranth: composition, properties, and applications of a rediscovered food crop. **Food Technology**, v.39, n.4, p.49-60, 1985.

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

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, n.6-7, p.669-675, 2006.

TONG, L.M.; SASAKI, S.; MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.48, n.5, p.1473-1478, 2000.

TOSI, E.A.; RÉ, E.; LUCERO, H.; MASCIARELLI, R. Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain by differential milling. **Food Chemistry**, Oxford, v.73, n.4, p.441-443, 2001.

TSAI, P.J.; SHE, C.H. Significance of phenol-protein interactions in modifying the antioxidant capacity of peas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.54, n.22, p.8491-8494, 2006.

TSALIKI, E.; LAGOURI, V.; DOXASTAKIS, G. Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives (*Lupinus albus* ssp. *Graecus*). **Food Chemistry**, Oxford, v.65, n.1, p.71-75, 1999.

VERMEIRSSSEN, V.; CAMP, J.V.; DEVOS, L.; VERSTRAETE, W. Release of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity during *in vitro*

gastrointestinal digestion: from Batch experiment to semicontinuous model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.51, n.19, p. 5680-5687, 2003.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.42, n.6, p. 1285-1290, 1994.

WANG, L.L.; XIONG, Y.L. Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolysed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.53, n.23, p.9186-9192, 2005.

WANG, J.S.; ZHAO, M.M.; ZHAO, Q.Z.; JIANG, Y.M. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. **Food Chemistry**, Oxford, v.101, n.4, p.1658-1663, 2006.

WU, H.C.; CHEN, H.M.; SHIAU, C.Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v.36, n.9-10, p.949-957, 2003.

YÁNEZ, E.; ZACARIAS, I.; GRANGER, D.; VÁSQUEZ, M.; ÉSTEVEZ, A.M. Caracterización química y nutricional del amaranto (*Amaranthus cruentus*). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.44, n.1, p.57-62, 1994.

YIM, M.H.; LEE, J.H. Functional properties of fractionated soy protein isolates by proteases from Meju. **Food Science and Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 253-257, 2000.

YOSHIE-STARK, Y.; BEZ, J.; WADA, Y.; WÄSCHE, A. Functional properties, lipoxygenase activity, and health aspects of *Lupinus albus* protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.52, n.25, p.7681-7689, 2004.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenols in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.51, n.2, p.502-509, 2003.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, v. 41, n.6, p. 1296-1302, 2006.