



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**



**BIOATIVIDADE DO GRÃO DE AMARANTO: AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA
ATIVIDADE LIGANTE DE ÁCIDOS BILIARES E INIBIDORA DA ENZIMA
CONVERSORA DE ANGIOTENSINA**

ANDRÉA TIENGO

Nutricionista

Prof^ª. Dr^ª. FLÁVIA MARIA NETTO

Orientadora

**CAMPINAS-SP
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Tiengo, Andréa

Bioatividade do grão de amaranto: avaliação *in vitro* da atividade ligante de ácidos biliares e inibidora da enzima conversora de angiotensina / Andréa Tiengo -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Flávia Maria Netto

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Amaranto. 2. Hidrolisados protéicos. 3. Digestão enzimática. 4. Enzima conversora de angiotensina. 5. Atividade ligante de ácidos biliares. I. Netto, Flávia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Bioactivity of the amaranth grain: *in vitro* assessment of the binding bile acids and inhibitory activity of the angiotensin converting enzyme.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Amaranth, Protein hydrolysates, enzymatic digestion, Angiotensin-converting enzyme, binding bile acids

Área de concentração: Nutrição Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Flávia Maria Netto

Semíramis Martins Álvares Domene

Elizabete Lourenço da Costa

Célio Kenji Miyasaka

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

Andréa Tiengo

**BIOATIVIDADE DO GRÃO DE AMARANTO: AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA
ATIVIDADE LIGANTE DE ÁCIDOS BILIARES E INIBIDORA DA ENZIMA
CONVERSORA DE ANGIOTENSINA**

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

Prof.^a. Dr.^a. FLÁVIA MARIA NETTO
Orientadora

CAMPINAS-SP
2007

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Flávia Maria Netto

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(orientador)

Prof^a. Dra. Semíramis Martins Álvares Domene

Pontifícia Universidade Católica de Campinas – PUC Campinas
(membro)

Prof^a. Dra. Elizabete Lourenço da Costa

Universidade Católica de Santos - Unisantos
(membro)

Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(membro)

Você pode ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não se esqueça de que sua vida é a maior empresa do mundo E você pode evitar que ela vá a falência.

Há muitas pessoas que precisam, admiram e torcem por você.

Gostaria que você sempre se lembrasse de que ser feliz não é ter um céu sem tempestade, caminhos sem acidentes, trabalhos sem fadigas, relacionamentos sem desilusões.

Ser feliz é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros.

Não é apenas comemorar o sucesso, mas aprender lições nos fracassos.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Jamais desista de si mesmo.

Jamais desista das pessoas que você ama.

Jamais desista de ser feliz, pois a vida é um obstáculo imperdível, ainda que se apresentem dezenas de fatores a demonstrarem o contrário.

"Pedras no caminho? Guarde todas, um dia construirá um castelo..."

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

“ Vossas mãos... Ah! Vossas mãos...

Vossas mãos grandes, vossas mãos fortes, vossas mãos firmes sustentando minhas mãos, tão pequenas, tão frágeis, ensinando os meus primeiros passos. Vossas mãos apertando as minhas, numa cumplicidade infinita. Enquanto eu sonhava, vossas mãos trabalhavam. E quando eu ia além dos sonhos, eles estavam ali, me aplaudindo. E se os ventos não me eram favoráveis, elas também estavam ali, estendidas, firmes, fortes. Hoje, vossas mãos já não me parecem tão grandes, meus dedos já não se perdem entrelaçados aos vossos. Perdem-se os anos. E volto a ser a mesma criança de algum tempo atrás. Vossas mãos... Vossas mãos... São as mãos que hoje beijo, a vós que amo, oferecendo essa vitória.”

Ao Victor

Ao Victor, pelo incentivo constante e por não me deixar desistir, pelo apoio incondicional e auxílios fundamentais nos meus cálculos de soluções. Obrigado por estar presente nos momentos mais importantes da minha vida.

Aos meus irmãos

Aos meus irmãos, Dri, Lê e Dé, por toda dedicação, carinho e amor. Obrigado por aguentarem meu mau humor, meus choros quase que diários e pelas quase “enchentes” decorrentes deles.

Minha eterna gratidão

AGRADECIMENTOS

À Deus : “ *Você se fez presente em todos os momentos, firmes ou trêmulos. E passo a passo, pude sentir Sua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir... A Sua presença é qualquer coisa como a luz e a vida, e eu sinto que em meu gesto existe Seu gesto e em minha voz, a Sua voz.*” (Vinícius de Moraes)

À Profa. Dra. Flávia Maria Netto, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela contribuição com seu conhecimento e pelas caixinhas de lenços;

Ao Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán pela gentileza em ceder o aparelho de eletroforese capilar para as análises *in vitro* da atividade inibidora da ECA, pelas análises de composição aminoacídica, pelo espectrofotômetro e utensílios do Nepa;

Aos professores presentes na banca: Profa. Dra. Semíramis Martins Álvares Domene, Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka e Profa. Dra. Elizabete Lourenço da Costa, pelas valiosas sugestões para a composição final deste trabalho;

À querida Li, pela amizade, carinho e paciência. Pessoa fundamental durante minha estadia no laboratório, sabe da minha admiração incondicional por você. Serei grata à você eternamente;

À querida Bete, pelas várias horas de conversa, carinho, incentivo e colaboração intensa;

À Liz, minha irmazinha peruana. Lembrarei eternamente dos nossos vários momentos de descontração, de choros, de dificuldades, de união, momentos sérios de trocas de conhecimentos e dos nossos intermináveis momentos de alegria.

À Mariza pelas dificuldades enfrentadas, pelos vários dias e noites de companheirismo e auxílio total e incondicional nas minhas análises de atividade inibidora da ECA;

Às amigas do laboratório de Bioquímica Nutricional: Soninha, Lucia, Dudinha, Janai (“*proteins girls*”), Mariana, Carol, Eliriane, Michele, Virgínia, Sarah pelos momentos compartilhados durante estes dois anos e meio de companheirismo e descontração;

Ao Laércio, meu querido companheiro dos longos feriados de análise;

À Telma, minha eterna companheira de “fibra”, sozinha essa nossa querida análise não teria saído;

À Soely, pelas conversas, paciência e imensos conselhos para a interminável análise de fibras;

Ao Chico, pelo auxílio constante nas minhas análises de caracterização por cromatografia, muito obrigada;

Aos amigos do Depan: Elis, Maria Inês (obrigada pela ajuda sempre que solicitada e pelo carinho), Iara, Ana Cláudia, Pablo, Elisa, Fabi, Carla, Jane, Márcio (nosso companheiro de descontração nas análises de fibras), Cibelem (pela valiosa ajuda nas análises estatísticas), Fátima, Cidinha, Sônia, Suzana, Édma (Nepa), ...

Ao Éder pelas análises de composição aminoacídica e auxílios sempre que solicitado;

À FAPESP pelo financiamento concedido para a realização deste trabalho;

À FAEPEX pelo auxílio fornecido contribuindo para a continuidade desta pesquisa;

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos;

À Novozymes pela doação da enzima Alcalase utilizada nas hidrólises enzimáticas;

À empresa Tovani Benzaquen pela gentileza no fornecimento das enzimas utilizadas na análise de fibras;

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única. Mas não vai só, leva um pouco de nós e deixa um pouco de si. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente que duas almas não se encontram por acaso”

SUMÁRIO

Índice de Figuras	xix
Índice de Tabelas	xxi
Resumo	xxiii
Abstract	xxv
1. Introdução	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. Revisão Bibliográfica	4
3.1. Amaranto	4
3.2. Atividades bioquímicas com potencial fisiológico	9
3.2.1. Atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina	10
3.2.2. Atividade ligante de ácidos biliares	20
4. Materiais e Métodos	30
4.1. Material	30
4.2. Métodos	31
4.2.1. Obtenção e caracterização das farinhas, concentrado e hidrolisado protéico de amaranto	31
4.2.1.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	34
4.2.2. Digestão <i>in vitro</i> das proteínas de amaranto	34
4.2.2.1. Grau de Hidrólise	36
4.2.2.2. Composição aminoacídica	36
4.2.2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE Tricina)	37
4.2.2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência – fase reversa (CLAE-FR)	38
4.2.2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência – exclusão molecular (CLAE- EM)	38
4.2.3. Determinação da atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina	39
4.2.4. Determinação da atividade ligante de ácidos biliares	40
4.2.5. Análise estatística	43
5. Resultados e Discussão	44
5.1. Obtenção e caracterização das farinhas, concentrado e hidrolisado de amaranto	44
5.1.1. Hidrolisados protéicos de amaranto	47
5.1.2. Caracterização eletroforética das proteínas (SDS-PAGE)	49
5.1.3. Composição aminoacídica	51
5.2. Digestão <i>in vitro</i> das proteínas de amaranto	54
5.3. Atividade inibidora da ECA <i>in vitro</i>	62
5.4. Atividade ligante de ácidos biliares	68
6. Conclusão	76
7. Referências Bibliográficas	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Semente de <i>Amaranthus cruentus</i> em corte transversal e longitudinal	6
Figura 2. Mecanismo de controle da pressão arterial pelo sistema renina-angiotensina	15
Figura 3. Formação do ácido hipúrico pela ECA a partir do substrato Hipuril-histidil-leucina	17
Figura 4. Fluxograma da obtenção do concentrado protéico de amaranto (FDA – farinha desengordurada de amaranto, CPA – concentrado protéico de amaranto, RA – resíduo alcalino da extração	32
Figura 5. Fluxograma da digestão <i>in vitro</i> das proteínas de amaranto	35
Figura 6. Fluxograma da atividade ligante de ácidos biliares	42
Figura 7. Curva de hidrólise do HPAs _t e HPAt _t em <i>pH-stat</i> com titulação de NaOH	48
Figura 8. Eletroforese SDS-PAGE da FDA, CPAs _t , CPAt _t , RA e hidrolisados protéicos. A) Coluna 1 – padrões; coluna 2 – CPAt _t ; coluna 3 – CPAs _t ; coluna 4 – FDA; coluna 5 - RA. B) Coluna 1- padrões; coluna 2 – HPAs _t ; coluna 3 – HPAt _t	50
Figura 9. Eletroforese SDS-PAGE Tricina dos CPA, hidrolisados e digeridos protéicos de amaranto. Coluna 1 – padrões; coluna 2 – CPAs _t ; coluna 3 – HPAs _t ; coluna 4 – DCPAs _t ; coluna 5 – DHPAs _t ; coluna 6 – HPAt _t ; coluna 7 – DCPAt _t ; coluna 8 – DHPAt _t	56
Figura 10. Perfil cromatográfico (CLAE-FR) do CPAs _t (A), CPAt _t (B), HPAs _t (C), HPAt _t (D), DCPAs _t (E), DCPAt _t (F), DHPAs _t (G), DHPAt _t (H)	58
Figura 11. Cromatografia de exclusão molecular (CLAE-EM) do CPAs _t (A), CPAt _t (B), HPAs _t (C), HPAt _t (D), DCPAs _t (E), DCPAt _t (F), DHPAs _t (G), DHPAt _t (H)	60
Figura 12. Eletroforegrama da reação entre a ECA e HHL sem inibição (A) e com inibição parcial induzida pela adição do HPAs _t nas concentrações de 0,05 mg de proteína/mL (B), 0,5 mg de proteína/mL (C) e 1,0 mg de proteína/mL (D)	62
Figura 13. Regressão do logaritmo da área do ácido hipúrico em função da concentração do hidrolisado HPAs _t	63
Figura 14. Valores de IC ₅₀ obtidos para o concentrado protéico de amaranto sem e com tratamento térmico prévio submetido à hidrólise com Alcalase (HPAs _t e HPAt _t), digestão <i>in vitro</i> (DCPAs _t e DCPAt _t) e hidrolisado com alcalase após digestão <i>in vitro</i> (DHPAs _t e DHPAt _t)	64
Figura 15. Curva padrão dos ácidos biliares (µmol/L): ácido deoxicólico (A), ácido cólico (B), ácido glicocólico (C) e ácido taurocólico (D)	69
Figura 16. Ligação dos ácidos glicocólico (A), deoxicólico (B), cólico (C) e taurocólico (D) pela colestiramina (Col), RA, CPA, HPA e FDA	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Valores propostos para classificação da pressão arterial	13
Tabela 2. Composição centesimal da farinha integral de amaranto (FIA), farinha desengordurada de amaranto (FDA), concentrado protéico (CPA) e resíduo alcalino (RA)	46
Tabela 3. Composição aminoacídica da farinha desengordurada e concentrado protéico de <i>A. cruentus</i> (g de aa/100 g proteína)	52
Tabela 4. Grau de hidrólise (GH) por TNBS dos CPA, HPAs _t e HPAs _{tt} antes e após a digestão com as enzimas gastrintestinais	55

RESUMO

O amaranto vem se destacando como uma excelente fonte alternativa ou complementar de proteínas alimentares devido à sua composição balanceada em aminoácidos essenciais. A cultura do amaranto (*Amaranthus cruentus* BR Alegria) vem sendo introduzida no Brasil por sua ótima qualidade nutricional, alto teor de proteínas e melhor valor biológico que a de cereais, e funcional, além de características agrônômicas de adaptabilidade. Apesar de o amaranto ter sido bem caracterizado quimicamente e apresentar componentes relacionados a diferentes atividades bioquímicas com potencial fisiológico, pouco se conhece sobre seu potencial funcional. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina (ECA) e a capacidade ligante de ácidos biliares (AB) da farinha desengordurada de amaranto e seus produtos. Farinha integral foi obtida pela moagem do grão de *Amaranthus cruentus* (variedade BR Alegria) e tratada com hexano para obtenção da farinha desengordura (FDA), utilizada para a produção do concentrado protéico de amaranto (CPA). Para obtenção de hidrolisados protéicos, CPA, sem e com tratamento térmico prévio (90°C/ 30 minutos), foi hidrolisado com a enzima Alcalase, até atingir 12% de grau de hidrólise (GH). As farinhas e seus produtos derivados foram caracterizados quanto à composição e perfis eletroforético e cromatográfico de suas proteínas. A digestão *in vitro* das proteínas também foi avaliada e o material digerido utilizado para avaliação da atividade inibidora da ECA. A farinha integral de amaranto e seus derivados apresentaram composição semelhante à encontrada na literatura. O tratamento térmico prévio do CPA não alterou o padrão de atividade das enzimas utilizadas, pois o perfil eletroforético e cromatográfico (fase reversa e exclusão molecular) mostraram-se semelhantes. Todos os hidrolisados protéicos e digeridos apresentaram capacidade de inibir a ECA *in vitro*. No entanto, os digeridos do CPA sem e com tratamento térmico prévio (DCPAst e DCPAtt respectivamente) apresentaram menor atividade inibidora da ECA (IC₅₀ de 0,439 mg proteína/mL e 0,475 mg proteína/mL respectivamente) que os hidrolisados com Alcalase tanto antes (HPAst e HPAtt) como após a digestão *in vitro* (DHPAst e DHPAtt) que apresentaram IC₅₀ 0,118 a 0,176 mg de proteína/mL. Estes resultados sugerem que, *in vivo*, a ingestão da proteína de amaranto intacta pode apresentar menor atividade inibidora da ECA quando comparada à ingestão da proteína previamente

hidrolisada com Alcalase. A digestão *in vitro* não alterou a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados, sugerindo que os peptídeos inibidores da ECA liberados pela ação da Alcalase foram resistentes à hidrólise gastrintestinal. A capacidade ligante de ácidos biliares dos produtos de amaranto (FDA, CPA, HPAsT e resíduo alcalino – RA - obtido da extração do CPA) e da colestiramina (utilizada como controle positivo), foi diferente em função do ácido biliar estudado (ácidos cólico, taurocólico, glicocólico e deoxicólico). A colestiramina apresentou a maior atividade ligante para todos os AB testados, diferindo-se de todas as amostras ($p < 0,05$). O RA, mais rico em fibras (8,6%), apresentou a menor atividade ligante para os AB testados, com exceção do ácido glicocólico, que os demais produtos. A FDA apresentou atividade ligante intermediária para todos os AB, porém semelhante à do CPA com o ácido deoxicólico e do HPAsT com o ácido taurocólico, que apresentaram as maiores atividades. A FDA e CPA apresentaram capacidade ligante de ácidos biliares secundários tóxicos à mucosa intestinal. A partir dos resultados obtidos não foi possível afirmar se foram as proteínas, as fibras ou eventualmente outro componente não avaliado, o principal responsável por esta atividade. Com a comprovação das atividades inibidora da ECA e ligante de ácidos biliares *in vitro*, sugere-se a realização de estudos *in vivo*, sendo o experimento *in vivo* um método mais confiável para avaliar a atividade biológica das proteínas de amaranto e demais componentes.

Palavras-chave: Amaranto, Hidrolisados protéicos, digestão enzimática, Enzima conversora de angiotensina, atividade ligante de ácidos biliares

ABSTRACT

Amaranth has been highlighted as an excellent alternative or complementary source of food protein due to its balanced amino acid composition. The culture of amaranth has been introduced into Brazil on account of its optimum nutritional (high protein content and better biological quality than that of cereal protein) and functional quality, apart from its agricultural characteristics and adaptability. Although amaranth has been well characterised chemically and present components related to different biochemical activities with physiological potential, little is known about its functional potential. The objective of the present work was to evaluate the inhibitory activity of the angiotensin converting enzyme (ACE) and the capacity to bind with the bile acids (BA) of defatted amaranth flour and its products. Whole flour was obtained by grinding the *Amaranthus cruentus* grain (BR Alegria variety), and treating with hexane to obtain the defatted flour (ADF), used to produce the amaranth protein concentrate (APC). To obtain the protein hydrolysates, APC, with and without prior heat treatment (90°C/ 30 minutes), was hydrolysed using the enzyme Alcalase to a 12% degree of hydrolysis (DH). The flours and their derived products were characterised with respect to the electrophoretic and chromatographic compositions and profiles of their proteins. The *in vitro* digestibility of the proteins was also evaluated and the digested material used to determine the ACE inhibitory activity. The whole amaranth flour and its derivatives presented a composition similar to that found in the literature, and the prior heat treatment of the APC did not alter the activity pattern of the enzymes used, since the electrophoretic and chromatographic profiles (reverse phase and molecular exclusion) were shown to be similar. All the protein hydrolysates, before and after digestion, showed *in vitro* ACE inhibitory capacity. However, the digested APC, with or without prior heat treatment (DAPCnt and DAPCht, respectively) presented less ACE inhibitory activity (IC₅₀ of 0,439 mg protein/mL and 0,475 mg protein/mL, respectively) than the Alcalase hydrolysates both before (APHnt and APHtt) and after *in vitro* digestion (DAPHnt and DAPHtt), which presented IC₅₀ values of from 0,118 to 0,176 mg protein/mL. These results suggest that, *in vivo*, the ingestion of intact amaranth protein could present less ACE inhibitory activity than when ingesting protein previously hydrolysed with Alcalase. *In vitro* digestion did not change the ACE inhibitory activity of

the hydrolysates, suggesting that the ACE inhibitory peptides liberated by the action of Alcalase were resistant to gastro-intestinal hydrolysis. The bile acid binding capacity of the amaranth products (ADF, APC, APHnt and the alkaline residue – AR – obtained from the extraction of APC) and of cholestyramine (used as the positive control), varied as a function of the bile acid studied (cholic, taurocholic, glycocholic and deoxycholic acids). The cholestyramine showed greater binding activity with all the BAs tested, differing from all the samples ($p < 0,05$). The fibre-rich (8,6%) AR presented the least binding activity with all the BAs tested, as compared to the other products, with the exception of with glycocholic acid. The ADF presented intermediate binding activity with all the BAs, which was nevertheless similar to that of APC with glycocholic acid and of APHnt with taurocholic acid, which presented the highest activities. The ADF and APC presented binding capacity with the secondary bile acids toxic to the intestinal mucous membrane. From the results obtained, it was not possible to affirm if it was the proteins, fibres or even some other non-evaluated component, that was responsible for this activity. Having proven the ACE inhibitory and bile acid binding activities *in vitro*, it is important to also carry out *in vivo* studies, since the *in vivo* experiment is a more reliable method to evaluate the biological activity of the amaranth proteins and their other components.

Keywords: Amaranth, Protein hydrolysates, enzymatic digestion, Angiotensin-converting enzyme, binding bile acids capacity

1. INTRODUÇÃO

Numerosos trabalhos de investigação científica têm sido realizados com o objetivo de esclarecer os benefícios à saúde dos mais diversos tipos de nutrientes e alimentos funcionais. Isso fortalece a potencialidade da nutrição preventiva que atrai cada vez mais os consumidores preocupados em melhorar seu estado de saúde através da alimentação (BELLO, 1995).

O amaranto vem se destacando como uma excelente fonte alternativa ou complementar de proteínas alimentares devido à sua composição balanceada em aminoácidos essenciais, sendo rico em aminoácidos sulfurados (CASTELLANI, MARTINEZ e AÑÓN, 2000) e em lisina, que é o aminoácido limitante em outros cereais (BECKER et al, 1981; BREENE, 1991; KIM, KIM e SHIN, 2006a; MARTIROSYAN, MIROSHNICHENKO e KULAKOVA, 2007).

O amaranto apresenta também altas concentrações de tocoferóis, tocotrienóis, esqualenos, fibras e compostos fenólicos que podem estar relacionados às atividades antioxidante, hipocolesterolemiantes e anticarcinogênicas (LEHMANN, 1996). O teor de lipídeos nesses grãos varia de 6 a 10% dos quais 75% são insaturados, sendo rico em ácido linoléico (50%), essencial para a nutrição humana (TEUTONICO e KNORR, 1985; MARTIROSYAN, MIROSHNICHENKO e KULAKOVA, 2007).

Apesar do amaranto ter sido bem caracterizado quimicamente e apresentar componentes relacionados a diferentes atividades bioquímicas com potencial fisiológico, pouco se conhece sobre seu potencial funcional. Até o momento, foram publicados estudos sobre sua utilização como adjuvante terapêutico em dietas para diabéticos (KIM et al, 2006b) e indivíduos susceptíveis a hipercolesterolemia (PLATE e ARÊAS, 2002; ESCUDERO et al, 2004), pacientes portadores de doença celíaca por não causar reações alérgicas na mucosa intestinal (GUERRA-MATIAS e ARÊAS, 2005), além de sua capacidade de atuar

como antioxidante (DANZ e LUPTON, 1992; GRAJETA, 1999; PLATE e ARÊAS, 2002; CZERWINSKI et al, 2004; KIM et al, 2006b; CHITINDINGU et al, 2007).

A atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina relacionada à fração protéica, ainda não foi estudada para o amaranto, embora este apresente características moleculares semelhantes às da soja (MARTINEZ, CASTELLANI e AÑÓN, 1997), em cujos hidrolisados protéicos esta atividade já foi comprovada (WU e DING, 2001).

Dessa forma, pesquisas são necessárias para avaliar a atividade ligante de ácidos biliares, bem como estudar a atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina, até hoje inexplorada, já que o amaranto apresenta em sua composição componentes relacionados a estas atividades.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar, *in vitro*, as atividades ligante de ácidos biliares e inibidora da enzima conversora de angiotensina da farinha desengordurada de amaranto e de alguns de seus produtos.

2.2. Específicos

- Obter e caracterizar a farinha integral de amaranto e seus produtos derivados: farinha desengordurada de amaranto, concentrado protéico, hidrolisado protéico e resíduo alcalino obtido a partir do processo de obtenção do concentrado protéico de amaranto
- Avaliar o efeito do tratamento térmico nas características físico-químicas das proteínas de amaranto
- Avaliar o efeito dos hidrolisados protéicos de amaranto na inibição da ECA *in vitro*
- Avaliar a capacidade ligante de ácidos biliares da farinha desengordurada de amaranto e produtos

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Amarantho

O amarantho é um grão que tem sido cultivado e incluído na dieta dos Incas por séculos. Os Maias foram provavelmente os primeiros a utilizarem o amarantho como cultura produtiva, e os Incas e os Astecas adotaram esta cultura posteriormente. Atualmente, o cultivo de amarantho reapareceu não somente no México e América Central, mas também em territórios andinos da América do Sul assim como em alguns países asiáticos, europeus e africanos, encontrando-se mais de 60 espécies do gênero *Amaranthus* no mundo (BREENE, 1991; ESCUDERO et al, 2004).

Embora o Brasil possua terras e clima adequados para o plantio desta cultura, o amarantho ainda não tem sido produzido ou consumido no país. Trabalhos brasileiros de pesquisa e desenvolvimento resultaram no lançamento de uma variedade de valor agrônomo adaptada ao solo do Cerrado brasileiro (MARCÍLIO et al, 2003). Na Embrapa Cerrados há um projeto para introdução do amarantho como cultivo secundário em regiões de plantio de soja (MENDONÇA, 2006).

Devido às suas características e propriedades semelhantes às dos cereais, é considerado como um pseudocereal. Três espécies do gênero *Amaranthus* são utilizadas para alimentação humana: *A. caudatus*, *A. cruentus* e *A. hypochondriacus* (BREENE, 1991; SEGURA-NIETO et al, 1992). O amarantho é uma das poucas plantas cultivadas cujas folhas são utilizadas como vegetais e os grãos como cereais (CHÁVEZ-JÁUREGUI, SILVA e ARÊAS, 2000; GUERRA-MATIAS e ARÊAS, 2005), sendo utilizado tanto na nutrição humana quanto na animal (MARTIROSYAN, MIROSHNICHENKO e KULAKOVA, 2007).

As folhas e os grãos apresentam alta qualidade nutricional, sendo as folhas ricas em carotenóides, vitamina C, ferro e proteínas, e os grãos, ricos em energia e proteínas de boa qualidade nutricional. (BERGANZA et al, 2003).

As sementes de amaranto são pequenas e lenticulares com diâmetro e peso médios de 1 a 1,5 mm e 0,6 a 1,2 mg respectivamente (SEGURA-NIETO et al, 1992). Possuem em média 13 a 18% de proteína (SEGURA-NIETO et al, 1992; FIDANTSI e DOXASTAKIS, 2001; ESCUDERO et al, 2004), 50 a 60% de amido (BREENE, 1991; TOSI et al, 2001; ESCUDERO et al, 2004), 5 a 9% de lipídeos (BREENE, 1991; TOSI et al, 2001; MARTIROSYAN, MIROSHNICHENKO e KULAKOVA, 2007), 7% de fibra dietética e altas concentrações de cálcio, fósforo, ferro, potássio, zinco, vitamina E, vitamina A, ácido ascórbico e vitaminas do complexo B (TOSI et al, 2001).

Uma das características mais importantes do grão de amaranto é seu alto teor de proteínas de estocagem e melhor balanço de aminoácidos essenciais do que cereais e leguminosas, sendo semelhante ao da caseína (SEGURA-NIETO et al, 1992; SILVA-SANCHEZ et al, 2004). O teor de proteínas do amaranto é em média superior, aos encontrados em cereais como trigo (13,5–14,5%), milho (10,6-13,8%), cevada (10-14,9%) e aveia (12,4-12,9%) (GORINSTEIN et al, 2001).

Utilizando técnicas de fracionamento anatômico e de moagem controlada do *A. cruentus*, Betschart *et al* (1981) verificaram que após sucessivos fracionamentos houve uma concentração dos nutrientes na casca e germe da semente (Figura 1) quando comparados à semente integral. A semente integral era composta por 18,5% de proteína, 7,4% de lipídeos, 3,3% de fibra e 3,2% de cinzas. Entretanto, a casca e o germe após os fracionamentos apresentaram a seguinte composição: 42,0% de proteína, 19,2% de lipídeos, 7,7% de fibra e 7,0% de cinzas. O perisperma possuía basicamente amido na forma de amilopectina com 7,7% de proteína, 2,3% de lipídeos, 0,9% de fibra e 1,2% de cinzas.

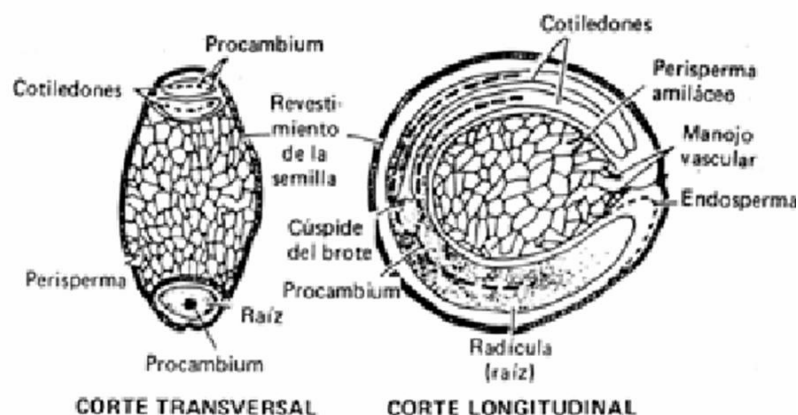


Figura 1. Semente de *Amaranthus cruentus* em corte transversal e longitudinal

Fonte: Betschart et al, 1981

As proteínas do amaranto são relativamente ricas em lisina, aminoácido limitante em cereais, triptofano e aminoácidos sulfurados (SEGURA-NIETO et al, 1992; ESCUDERO et al, 2004), porém são limitantes em leucina e isoleucina (SEGURA-NIETO et al, 1992). Escudero *et al* (2004) estudando grãos de *A. cruentus* verificaram um alto conteúdo de lisina tanto na farinha quanto no concentrado protéico de amaranto. O concentrado protéico não apresentou nenhum aminoácido limitante, sendo os aminoácidos limitantes na farinha a treonina, leucina e a valina. 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 do amaranto o torna um bom complemento para as leguminosas que têm estes aminoácidos como limitantes (BRESSANI, 1989 *apud* MENDONÇA, 2006).

Entre as principais frações protéicas do grão de amaranto estão as albuminas, globulinas e glutelinas (MARTINEZ, CASTELLANI e AÑÓN, 1997; SCILINGO et al, 2002). Há controvérsias acerca de qual a principal fração protéica da semente, podendo esta variar de acordo com os métodos de extração empregados. Segundo Silva-Sanchez *et al* (2004), a albumina é a principal fração protéica nos grãos de amaranto, cerca de 50,0%,

seguida pelas frações glutelina e globulina com 31,0% e 16,0% respectivamente, e as prolaminas, com 0,9 a 2,0%. Resultados próximos ao de Silva-Sanchez *et al* (2004) foram relatados por Avanza e Añón (2007), sendo a albumina representada por 49,0-65,0%, as globulinas por 22,0-42,0% e as glutelinas por 14,0-18,0%. Fidantsi e Doxastakis (2001) reportaram a glutelina como a principal fração protéica (44,4%) seguida pelas albuminas (20,7%), globulinas (19,2%) e prolaminas (2,2%).

Bressani e Garcia-Vela (1990), avaliando as três espécies mais difundidas do amaranto (*A. caudatus*, *A. hypochondriacus* e *A. cruentus*), verificaram que a globulina é a principal fração protéica, representando 44,2% do total, seguida da glutelina (21,8%), albumina (8,9%) e prolamina (8,4%). No entanto se a ordem de extração for invertida, sendo a água o primeiro solvente, ao invés da solução de cloreto de sódio, a fração albumina passa a ser em média 20,0% das proteínas, as glutelinas (30,9%) enquanto que a globulina passa a ser 19,0% e as prolaminas (0,9%). Em outro trabalho, Correa, Jokl e Carlsson (1986a) encontraram a seguinte distribuição: 65,0% de albumina, 17,0% de globulina, 11,0% de prolamina e 7,0% de glutelina utilizando uma técnica de fracionamento mais complexa.

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). A globulina 11S (amarantina) apresenta características moleculares semelhantes às globulinas de leguminosas como a soja (MARTINEZ, CASTELLANI e AÑÓN, 1997). A fração gliadina do trigo, uma prolamina, é a responsável pelas reações alérgicas relacionadas à doença celíaca. Este componente não é encontrado no amaranto, o que o faz apropriado para dietas que devem ser isentas de glúten (GORINSTEIN et al, 2001). As proteínas de amaranto podem ser incluídas na alimentação humana como farinha, concentrados e/ou isolados protéicos por apresentarem propriedades estruturais relacionadas às proteínas e propriedades nutricionais adequadas (AVANZA e AÑÓN, 2007).

O amaranto, além das proteínas de alto valor biológico, apresenta também altas concentrações de tocoferóis, tocotrienóis, esqualenos, fibras e compostos fenólicos que podem estar relacionados às atividades antioxidante, hipocolesterolemiantes e anticarcinogênicas (LEHMANN, PUTNAM e QURESHI, 1994; LEHMANN, 1996).

O teor de óleo do amaranto, entre 1,9 a 8,7%, varia conforme espécie e genótipo. É um teor elevado se comparado aos cereais, mas bastante inferior ao das leguminosas (24,0-48,0%) (HE e CORKE, 2003). Os ácidos graxos presentes em maior quantidade no amaranto são linoléico (47,0%), oléico (26,0%) e palmítico (19,0%). O ácido graxo essencial linoléico está presente na proporção de 1,4% dos ácidos graxos totais (BERGER et al, 2003).

Lehmann, Putnam e Qureshi (1994) reportaram que grãos de amaranto (*A. cruentus* L. e *A. hypochondriacus* L.) contêm β e γ -tocotrienóis em concentrações superiores às encontradas em cereais. A atividade antioxidante dos tocoferóis e tocotrienóis é decorrente principalmente da sua habilidade em doar hidrogênios fenólicos para radicais livres. Estes compostos são reconhecidos por serem efetivos na inibição da oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos, aumentando a vida de prateleira dos alimentos, bem como garantindo seu valor nutricional (KAMAL-EDIN e APPELQVIST, 1996).

O esqualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosaeeno) é um lipídeo não saponificável que atua como precursor biossintético de todos os esteróides de plantas e animais. Apresenta importantes efeitos benéficos à saúde, como redução do risco de vários tipos de câncer e redução dos níveis de colesterol sérico. A maioria dos óleos vegetais contém quantidades muito pequenas de esqualeno. O óleo de amaranto apresenta quantidades maiores (2,4 a 8,0%) que outros óleos vegetais comuns como o óleo de oliva (0,45 a 0,54%), germe de trigo e farelo de arroz (0,1 a 0,7%) (HE e CORKE, 2003).

Berger *et al* (2003) relataram que 9,3% da fração lipídica do amaranto é composta por insaponificáveis, sendo que 6,8% correspondem ao esqualeno. Além disso, 2,7% da

gordura são compostas por fitosteróis. As quantidades de tocoferóis e tocotrienóis foram consideradas mínimas.

Entre os alimentos integrais, os cereais apresentam alto teor de fibras insolúveis e baixo de fibras solúveis, enquanto as frutas apresentam maior teor de fibras solúveis. As leguminosas e os cereais (aveia e cevada) apresentam quantidades semelhantes de fibras solúveis e insolúveis (HUGHES, 1991). 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).

Tosi *et al* (2001), estudando as fibras dietéticas do grão de *A. cruentus*, encontraram teor de fibra total de 14,2% (8,1% fibras insolúveis e 6,1% fibras solúveis), que é modificado após diferentes moagens do grão. Escudero *et al* (2004) reportaram um teor de 9,8% de fibra alimentar total para farinha de *A. cruentus*, sendo 4,3% fibras solúveis e 5,5% fibras insolúveis. Já Marcílio *et al* (2003) encontraram 3,6% e 3,1% de fibra alimentar nas farinhas integral e refinada, respectivamente, obtidas do *A. cruentus* brasileiro produzido na Embrapa-Cerrados. Correa, Jokl e Carlsson (1986b) estudaram espécies diferentes de amaranto provenientes de Porto Rico, Califórnia e Brasil, encontrando nas espécies brasileiras o maior teor de fibras alimentares (2,6 a 2,9%).

3.2. Atividades bioquímicas com potencial fisiológico

Em princípio, todo alimento desempenha o papel de nutrir o organismo, fornecer energia e contribuir para a prevenção de doenças carenciais pelo fato de fornecer elementos necessários para o crescimento, desenvolvimento e manutenção das atividades vitais. No entanto, está cada vez mais acentuada a procura por alimentos, que de modo específico, ofereçam benefícios à saúde dos consumidores (BELLO, 1995).

Sgarbieri e Pacheco (1999) definiram como alimentos funcionais fisiológicos aqueles produtos que desempenham funções que vão além das funções nutricionais

conhecidas, por conter substâncias que atuam no organismo modulando funções bioquímicas e/ou fisiológicas. Por isso, tem crescido o interesse por parte das indústrias em incorporar às dietas ingredientes que contenham substâncias capazes de oferecer benefícios à saúde (BELLO, 1995).

Existem numerosos trabalhos de investigação científica com o objetivo de esclarecer os benefícios à saúde dos mais diversos nutrientes e alimentos. Isso fortalece a teoria da potencialidade da nutrição preventiva que atrai cada vez mais os consumidores preocupados em melhorar seu estado de saúde através da alimentação (BELLO, 1995). Algumas propriedades como a atividade ligante de ácidos biliares e inibidora da enzima conversora da angiotensina têm sido intensamente estudadas em diversas fontes alimentares.

3.2.1. Atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina

Além de suprir aminoácidos e energia, que são essenciais para o crescimento e manutenção do organismo, as proteínas alimentares representam importante fonte de peptídeos biologicamente ativos, que podem desempenhar funções diversas, como moduladores de vários processos corporais (MEISEL, 1997; LI et al., 2004).

Estudos recentes mostram um grande número de hidrolisados ou peptídeos derivados de várias fontes protéicas, com eficiência comprovada *in vitro* e/ou *in vivo*, entre elas: proteínas do leite (SEPPO et al, 2002), do pescado (FUJITA, YOKOYAMA e YOSHIKAWA, 2000) e da soja (WU e DING, 2002). Proteínas de origem animal (especialmente proteínas do leite), vegetal e bacteriana, possuem atividades opióide, antitrombótica, antihipertensiva, imunomoduladora, antibacteriana e carreadoras de minerais (SMACCHI e GOBETI, 2000; VERMEIRSSSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004).

Esses peptídeos estão inativos quando fazem parte da cadeia protéica, porém, tornam-se ativos quando liberados pela proteólise enzimática *in vivo* ou *in vitro*, por exemplo, durante a digestão gastrintestinal ou processamento enzimático industrial (SMACCHI e GOBETI, 2000; WU e DING, 2002; LI et al, 2004).

É crescente o interesse no desenvolvimento de alimentos contendo peptídeos funcionais, por parte de indústrias farmacêuticas e de alimentos, em virtude do valor que podem alcançar. Desde 1998, Meisel já indicava que os caseinofosfopeptídeos e os peptídeos antihipertensivos seriam os favoritos para o desenvolvimento de alimentos funcionais (MEISEL, 1998 *apud* COSTA, 2004).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é o problema crônico de saúde mais comum e sério por levar ao risco de complicações cardiovasculares, incluindo doença coronariana, doença arterial periférica, ataque cardíaco e falência renal (WU e DING, 2001; KAPEL et al, 2006; LO, FARNWOTH e LI-CHAN, 2006). Compromete órgãos importantes do organismo sendo considerada um grande problema de saúde pública (WU e DING, 2001; KAPEL et al, 2006; CASTRO, MONCAU e MARCOPITO, 2007).

O tratamento da hipertensão é efetivo na redução deste risco (WU e DING, 2001). O conhecimento acerca dos benefícios da redução da pressão arterial (PA), através de medidas que envolvam modificações no estilo de vida e no uso de medicamentos, tem crescido muito a partir das informações advindas de ensaios clínicos controlados (POZZAN et al, 2003). Cerca de 90% dos quadros de hipertensão são conhecidos como hipertensão essencial cujas causas não são atribuídas a fatores conhecidos ou doenças (WU e DING, 2001).

A HAS é a mais importante dentre as causas controláveis de mortalidade cardiovascular precoce em todo o mundo, especialmente dos acidentes vasculares periféricos (LESSA et al, 2006). Com prevalência elevada e conhecida há várias décadas

nos países industrializados, ultimamente vem se tornando um grande problema em alguns países em desenvolvimento (VERMEIRSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004; LESSA et al, 2006).

É atualmente um problema mundial de proporções epidêmicas, estando presente em 22,0 a 68,0% de toda a população adulta mundial (FUCHS, CASTRO e FUCHS, 2004). No período de 1960-2000, nos Estados Unidos, houve queda da prevalência da hipertensão de 42,0% para 24,0%, porém entre 1999-2000 a prevalência voltou a elevar-se cerca de 8,3%, o que equivale a um aumento preocupante de 30,0% no número absoluto de hipertensos na população americana (LESSA et al, 2006).

No Brasil, na última década, foram realizados diversos inquéritos em amostras representativas da população, que indicaram variações na prevalência de hipertensão arterial entre 22,0 e 44,0% da população (FUCHS, CASTRO e FUCHS, 2004). Em um estudo transversal de base populacional realizado em Pelotas – RS, encontrou-se prevalência de HAS de 19,8% (pressão arterial sistólica maior ou igual a 160 mmHg e/ou pressão arterial diastólica maior ou igual a 95 mmHg; ou uso de anti-hipertensivos). Na Ilha do Governador – RJ, com o mesmo critério de diagnóstico, a prevalência foi de 24,9% e em Porto Alegre – RS, a prevalência de HAS foi de 29,8%. Em outras cidades brasileiras, a prevalência ultrapassa os 30% (SPARRENBERGER, MOREIRA e CANEPPELE, 2004).

O grande reflexo da HAS no país aparece: a) nas estatísticas de mortalidade, com a doença cerebrovascular ocupando a primeira causa de morte; b) nas estatísticas de hospitalização por doenças cardiovasculares pagas pelo Sistema Único de Saúde no país e c) nas elevadas taxas de hospitalização por urgências pela própria HAS ou suas complicações, além dos demais custos sociais (LESSA et al, 2006).

A partir de importantes evidências epidemiológicas, o *Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment on High Blood Pressure* (JCN-VII) propôs nova classificação para a pressão arterial com algumas diferenças em relação às diretrizes brasileiras de hipertensão (2002) e o Guidelines da European Society of Cardiology (Tabela 1). A meta, com o tratamento da HAS, é atingir uma pressão arterial < 140/90 mmHg. Metas menores (< 130/80 mmHg) são recomendadas para os diabéticos e em presença de doença renal (POZZAN et al, 2003).

Tabela 1. Valores propostos para a classificação da pressão arterial

Diretrizes Brasileiras (2002)			<i>Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment on High Blood Pressure (2003)</i>		
Classificação	PAS (mmHg) ¹	PAD (mmHg) ²	Classificação	PAS ¹ (mmHg)	PAD (mmHg) ²
Ótima	< 120	< 80	Normal	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85	Pré-hipertenso	120 – 139	80-89
Normal limítrofe	130 -139	85-89	HA Estágio 1	140 -149	90-99
HA Estágio 1	140 -159	90-99	HA Estágio 2	≥ 160	≥ 100
HA Estágio 2	160 -179	100-109			
HA Estágio 3	≥ 180	≥ 110			

¹ Pressão arterial sistólica

² Pressão arterial diastólica

Fonte: Pozzan et al, 2003

Apesar dos esforços para diagnosticar e tratar a hipertensão, de 35,0 a 83,0% dos portadores de hipertensão desconhecem sua condição e de 75,0 a 92,0% daqueles em tratamento não mantêm a hipertensão controlada (FUCHS, CASTRO e FUCHS, 2004; CASTRO, MONCAU e MARCOPITO, 2007).

A pressão arterial (PA) é regulada por vários mecanismos inter-relacionados. Entre eles, são encontrados o sistema nervoso, especificamente com a função adrenérgica e catecolaminas, o sistema renina-angiotensina com a função excretora dos rins, incluindo o

transporte do sódio e água e outras funções mediadas por mecanismos hormonais e de equilíbrio hidroeletrolítico (GUYTON e HALL, 2001).

O sistema renina-angiotensina é um importante regulador da pressão sanguínea, tendo a enzima conversora de angiotensina (ECA) um importante papel neste mecanismo regulador, além de atuar na regulação do balanço sal/água (WU e DING, 2001). A renina é uma enzima sintetizada e armazenada sob a forma inativa nas células justaglomerulares dos rins. Quando a PA cai, ocorre a liberação da renina para a corrente sanguínea, resultando em quebra de seu substrato natural, o angiotensinogênio, e a liberação da angiotensina I (decapeptídeo). Após a formação desse peptídeo, dois de seus aminoácidos são removidos para formar a angiotensina II. Essa reação é catalisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), presente no endotélio dos vasos pulmonares. A angiotensina II é um hormônio vasoconstritor que contribui para o aumento da resistência periférica e também atua sobre as glândulas supra-renais estimulando a secreção de aldosterona que aumenta a reabsorção de sal e água pelos túbulos renais e excreção de potássio (GUYTON e HALL, 2001). O mecanismo de controle da pressão arterial pelo sistema renina-angiotensina está esquematizado na Figura 2.

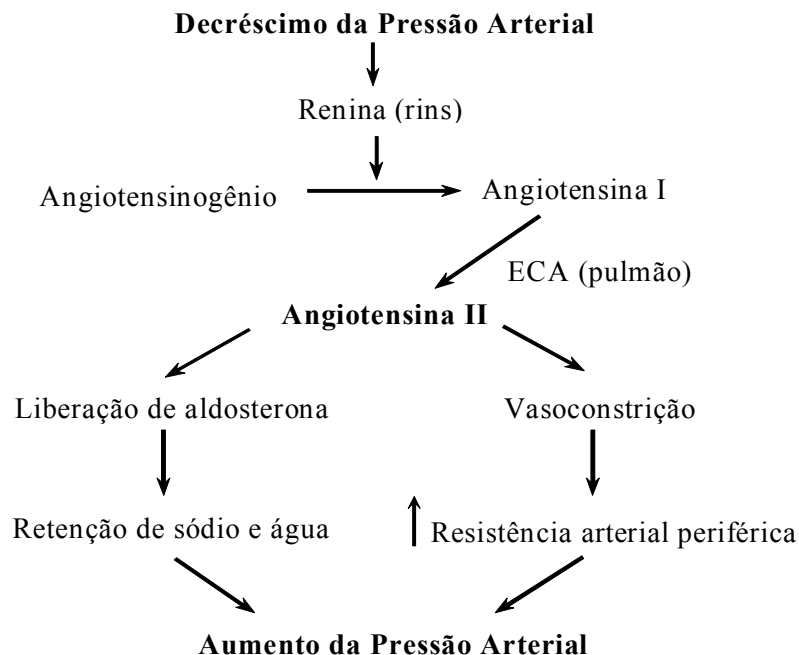


Figura 2. Mecanismo de controle da pressão arterial pelo sistema renina-angiotensina

Fonte: Guyton e Hall, 2001

A ECA é uma peptidase glicoprotéica pertencente à classe das zinco proteases, que necessita de zinco e cloro para sua ativação. Catalisa a clivagem do dipeptídeo histidileucina a partir do substrato angiotensina I (decapeptídeo), em um potente vasoconstritor, a angiotensina II (octapeptídeo) que causa a constrição de vasos sanguíneos e favorece a regulação da pressão sanguínea (MULLALY, MEISEL e FITZGERALD, 1997; TAKANO, 1998; PIHLANTO-LEPPÄLÄ et al, 2000; BYUN e KIM, 2001; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2001; VAN DER VEN et al, 2002; LEENA et al 2003; VERMEIRSSSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004; WALSH et al, 2004), além de contribuir para inativação da bradicinina a qual tem ação depressora (MULLALY, MEISEL e FITZGERALD, 1997; PIHLANTO-LEPPÄLÄ et al, 2000; BYUN e KIM, 2001; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2001; LI et al, 2004; VERMEIRSSSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004; LO, FARNWOTH e LI-CHAN, 2006).

Muitas drogas sintéticas têm sido desenvolvidas com intuito de inibir a atividade da ECA e promover a redução da pressão sanguínea em pacientes hipertensos (VAN ELSWIJK et al., 2003). Os inibidores da ECA comercialmente disponíveis mais conhecidos são o captopril, enalapril, lisinopril e o ramipril. Entretanto, a utilização de drogas sintéticas pode acarretar efeitos colaterais como tosse, distúrbios dermatológicos, rash cutâneo e angioedema (MARCZAK et al, 2003; VERMEIRSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004; LI et al, 2006).

Compostos inibidores da ECA são largamente distribuídos na natureza e têm sido encontrados em diversas plantas medicinais e alimentos (VAN ELSWIJK et al, 2003). Estes são menos potentes que os inibidores sintéticos, porém apresentam a vantagem de não causarem efeitos colaterais (MARCZAK et al, 2003; VERMEIRSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004), além de proporcionarem menor custo nos cuidados com a saúde (VERMEIRSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004). Alguns peptídeos com atividade inibidora da ECA têm sido isolados de diferentes fontes alimentares. Foram primeiramente descritos por Oshima, Shimabukuro e Nagasawa (1979) que os isolaram a partir de um hidrolisado de gelatina com colagenase. Desde então, o interesse nesta área levou pesquisadores a buscarem peptídeos anti-hipertensivos a partir de diversas proteínas alimentares: hidrolisados de peixe (FUJITA et al., 1995), soja (WU e DING, 2002; GIBBS et al, 2004), gelatina (BYUN e KIM, 2001; KIM et al, 2001), grão de bico (YUST et al, 2003), canola (MARCZAK et al, 2003), alho (SUERSUNA, 1998), espinafre (YANG et al, 2003; YANG et al, 2004) e principalmente proteínas do leite, como caseína (MAENO, YAMAMOTO e TAKANO, 1996) e proteínas do soro (NURMINEN et al, 2000; HERNÁNDEZ-LEDESMA, 2002).

Em geral, os peptídeos utilizados para determinar a atividade da ECA apresentam seqüência semelhante à porção final do substrato natural desta enzima, a angiotensina I, e tem sua porção N-terminal bloqueada (CONROY e LAI, 1978 *apud* COSTA, 2004). O substrato sintético mais usado é o hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL). As técnicas que empregam este componente consistem em sua clivagem pela ECA com a liberação do ácido hipúrico e do dipeptídeo histidil-leucina (his-leu), como mostra a Figura 3. Assim, a

atividade da enzima pode ser determinada pela formação do dipeptídeo ou do ácido hipúrico.

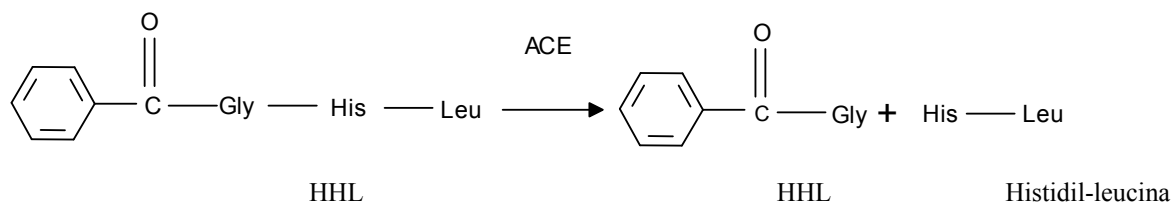


Figura 3. Formação do ácido hipúrico pela ECA a partir do substrato Hipuril-histidil-leucina

Peptídeos com atividade inibidora da ECA contém triptofano, fenilalanina, tirosina ou prolina na sua cadeia C-terminal e aminoácidos alifáticos na N-terminal (LI et al, 2004; LI et al, 2005). A ECA é conhecida por apresentar pequena afinidade por substratos ou inibidores competitivos com aminoácidos dicarboxílicos na cadeia C-terminal (ex. Glu) (LI et al, 2004). Parece preferir substratos ou inibidores competitivos contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos ou de cadeia ramificada) nas três últimas posições C-terminais (VERMEIRSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004). De acordo com Mullally, Meisel e Fitzgerald (1997), a liberação de peptídeos com atividade biológica não depende apenas da fonte protéica, a enzima utilizada é também um fator determinante, assim como alterações na estrutura nativa sofridas pela proteína (MULLALY, MEISEL e FITZGERALD, 1997 *apud* COSTA, GONTIJO e NETTO, 2007).

Algumas proteases como a Alcalase e a Neutrase têm sido utilizadas na obtenção de peptídeos com capacidade inibidora da ECA. A Alcalase é uma protease alcalina, de baixa especificidade, capaz de liberar peptídeos com aminoácidos hidrofóbicos na cadeia C-terminal. É uma enzima de uso industrial, com vantagens em relação ao custo para sua produção quando comparada a outras enzimas como pepsina, tripsina, quimotripsina, papaína e termolisina, que também têm sido utilizadas para preparação de peptídeos inibidores da ECA a partir de proteínas alimentares (LI et al, 2005).

Costa *et al* (2005) pesquisaram o efeito do concentrado protéico do soro de leite hidrolisado com a enzima Alcalase na atividade inibitória da ECA, na regulação da pressão arterial e na função renal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). O hidrolisado produzido apresentou moderada atividade inibitória da ECA *in vitro* (IC₅₀ 0,68 mg/mL) e promoveu redução significativa de 28,09 mmHg da pressão arterial dos ratos espontaneamente hipertensos (SHR), após seis horas da injeção intraperitoneal. Este hidrolisado também induziu redução na filtração glomerular dos animais, possivelmente devido ao efeito vasodilatador e desencadeou a atuação de mecanismos auto-reguladores de conservação de íons e fluidos corporais, evidenciados pelo aumento na reabsorção do sódio (COSTA *et al*, 2005).

Yust *et al* (2003) hidrolisaram a principal proteína de estocagem do grão de bico, a legumina, com a enzima Alcalase e obtiveram valor IC₅₀ 0,18 mg proteína/mL. Li *et al* (2005) hidrolisaram isolados protéicos de feijão com Neutrase e Alcalase em diferentes tempos de hidrólise e verificaram que os hidrolisados obtidos por ação da Alcalase após 2 horas de hidrólise apresentaram maior atividade inibidora da ECA, valor IC₅₀ 0,64 mg proteína/mL quando comparados aos hidrolisados obtidos com Neutrase.

Yoshie-Stark *et al* (2004) relataram atividade inibidora da ECA em farinha de tremço desengordurada e isolados protéicos obtidos em condições ácidas e neutras após a digestão *in vitro* com pepsina e pancreatina com valores de IC₅₀ 0,29 mg/mL, 0,21 mg/mL e 0,33 mg/mL respectivamente, sendo que o tremço foi melhor inibidor da ECA que o isolado protéico de soja após digestão *in vitro*.

Em outro estudo, Yoshie-Stark *et al* (2006) relataram a atividade inibidora da ECA de concentrados protéicos de duas variedades de sementes de canola. Os resultados mostraram que a ECA não foi inibida pelas proteínas não hidrolisadas enquanto os hidrolisados com pepsina mostraram as maiores atividades inibidoras da ECA, sendo que o hidrolisado de uma das variedades de canola apresentou atividade inibidora da ECA maior que a do captopril, utilizado como referência.

Para desempenhar o efeito antihipertensivo, o peptídeo precisa ser resistente à hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal, ser absorvido e atingir a ECA que está localizada em diferentes tecidos, principalmente no plasma e no pulmão (MEISEL, 1998). A digestão das proteínas inicia-se no estômago pela ação da pepsina em pH ácido. No intestino delgado, os polipeptídeos são clivados pelas proteases pancreáticas (tripsina, quimotripsina, elastase e carboxipeptidases A e B) em um pH mais alcalino, dando origem a uma mistura de oligopeptídeos e aminoácidos livres (VERMEIRSSSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004; ROUFIK, GAUTHIER e TURGEON, 2006). Os aminoácidos livres são absorvidos para dentro dos enterócitos, através da membrana intestinal. Já os oligopeptídeos são hidrolisados pela ação de peptidases localizadas nas bordas em escova da membrana intestinal (VERMEIRSSSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004).

Para exercer sua atividade funcional, os peptídeos devem atingir a corrente sanguínea na sua forma ativa após a administração oral (VERMEIRSSSEN et al, 2003; ROUFIK, GAUTHIER e TURGEON, 2006). Segundo Vermeirssen, Van Camp e Verstraete (2004), inúmeras barreiras no corpo humano, tais como a absorção intestinal e a degradação pelas peptidases séricas podem ativar ou inativar peptídeos, interferindo na biodisponibilidade dos peptídeos bioativos. Peptídeos contendo prolina e hidroxiprolina são geralmente resistentes à degradação pelas enzimas digestivas. Tripeptídeos contendo na porção C-terminal prolina-prolina são reportados como sendo resistentes às peptidases prolina específicas (VERMEIRSSSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004). A metodologia de digestão *in vitro* tem sido utilizada para avaliação da resistência de peptídeos bioativos à ação das enzimas gastrintestinais (VERMEIRSSSEN et al, 2003; VERMEIRSSSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004).

Matsui, Li e Osajima (1999) verificaram atividade inibitória da ECA de hidrolisados protéicos do gérmen de trigo e do peptídeo isoleucina-valina-tirosina isolado a partir deste hidrolisado, digeridos com pepsina, tripsina, quimotripsina separadamente e em combinação. A atividade inibitória da ECA do hidrolisado do gérmen de trigo aumentou para 27,0% após a digestão com as enzimas combinadas, indicando que alguns peptídeos podem ser ativados por ação destas enzimas, em especial a tripsina. O valor IC_{50} do

peptídeo isoleucina-valina-tirosina não foi alterado durante a digestão *in vitro*, indicando ser resistente à digestão gastrointestinal *in vitro* (MATSUI, LI e OSAJIMA, 1999 *apud* VERMEIRSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004).

Wu e Ding (2002) avaliaram a atividade inibidora da ECA e a resistência às enzimas gastrintestinais de hidrolisados protéicos da soja e frações obtidas por ultrafiltração. A fração de menor peso molecular (< 5 kDa) apresentou maior atividade inibidora da ECA (IC₅₀ 0,065 mg proteína/mL) quando comparada ao hidrolisado protéico (IC₅₀ 0,34 mg proteína/mL). Esta fração foi submetida à digestão pelas enzimas gastrintestinais e não sofreu alteração da sua atividade após a digestão *in vitro*.

Miguel *et al* (2006), ao simularem a digestão gastrointestinal de peptídeos com atividade inibidora da ECA derivados da ovoalbumina, observaram susceptibilidade dos peptídeos às enzimas gastrintestinais, com redução da atividade inibidora da ECA após digestão. Costa, Gontijo e Netto (2007) relataram que a hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal pode resultar tanto na degradação de peptídeos com atividade inibidora da ECA quanto na formação de novos peptídeos com atividade antihipertensiva.

3.2.2. Atividade ligante de ácidos biliares

As doenças cardiovasculares são hoje as maiores causas de mortalidade no mundo. Diversos estudos já foram realizados demonstrando que existem vários fatores diretamente relacionados à elevada incidência de eventos cardiovasculares, principalmente o tabagismo, a hipertensão arterial, a dieta incorreta, a dislipidemia e o diabetes mellitus (MOREIRA *et al*, 2006; MARTIROSYAN, MIROSHNICHENKO e KULAKOVA, 2007). Dentre os diversos fatores de risco para as doenças cardiovasculares, a dislipidemia vem surgindo como um dos mais importantes (BAUNWALD, 1997 *apud* MOREIRA *et al*, 2006).

Nos EUA, as doenças cardiovasculares (DCV) responderam por 38,5% de todas as mortes em 2001. Os dados brasileiros revelaram que as DCV excederam outras causas de óbito, e em 1998, foram responsáveis por 27,0% das mortes (FRANCA e ALVES, 2006).

A dislipidemia é um quadro patológico caracterizado pelos níveis elevados de colesterol sérico total (CT) e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c), redução dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) e aumento de triacilgliceróis (TG) (FRANCA e ALVES, 2006; MOREIRA et al, 2006). A HDL-c por não possuir a apolipoproteína B100 não é reconhecida pelos tecidos, sendo responsável pelo transporte reverso de colesterol, que leva principalmente o colesterol dos tecidos para o fígado, e dessa forma ajuda a proteger o indivíduo contra o desenvolvimento da aterosclerose (DE BIASE et al, 2007).

O colesterol é um importante constituinte de tecidos vivos em virtude de sua participação como componente das membranas biológicas e como precursor de colesterciferol, hormônios esteróides e ácidos biliares (MACARULLA et al, 2001). Grande parte do colesterol circulante é sintetizada no próprio organismo a partir de ácidos graxos, sendo que aproximadamente 1/3 é proveniente da dieta (STIPANUK, 2000 *apud* MENDONÇA, 2006).

O controle da concentração sérica do colesterol ocorre principalmente através da regulação da captação das LDLs, que são proteínas transportadoras do colesterol endógeno. O aumento da quantidade de LDL-c, bem como o aumento na quantidade de colesterol que carregam, representa igualmente um quadro de risco para a gênese da aterosclerose (DIETSCHY, 1997 *apud* MENDONÇA, 2006). Nos últimos anos, várias evidências experimentais têm mostrado que a modificação oxidativa da LDL e de outras lipoproteínas é uma etapa crucial na patogênese da aterosclerose (ESTERBAUER, 1992 *apud* MENDONÇA, 2006).

As mais recentes recomendações do *National Cholesterol Education Program* (NCEP-2002) sobre as modificações da dieta tornaram-se ainda mais exigentes que as anteriormente adotadas (NCEP 1987), sendo adotada a ingestão máxima de 7% das calorias na forma de ácidos graxos saturados (anteriormente era de 10%) e de menos de 200 mg de colesterol (anteriormente era de 300 mg). Além disso, passa a recomendar o consumo de fibra alimentar solúvel (10-25 g/dia) e de fitoesteróis (2 mg/dia) como agentes redutores de LDL-c, principal alvo da terapia redutora de riscos cardiovasculares (NCEP, 2002 *apud* MENDONÇA, 2006).

Exercícios, ingestão reduzida de ácidos graxos saturados, maior ingestão de fibra dietética (β -glucanas de farelo de aveia ou componentes de fibras solúveis) e ingestão restrita de alimentos com alto conteúdo de colesterol são recomendados para a redução dos níveis de colesterol sanguíneo (YOSHIE-STARK e WÄSCHE, 2004).

As fibras dietéticas representam um grande grupo de substâncias que não são hidrolisadas pelas enzimas do trato gastrointestinal humano. Possuem diversos efeitos preventivos e nutricionais no trato intestinal, dependendo da sua estrutura e peso molecular, assim como solubilidade e propriedades físico-químicas. As principais fontes de fibras na nutrição humana são cereais, frutas e vegetais (DONGWSKI, 2007).

Fibras solúveis, como as β -glucanas, pectina e goma guar, são fermentadas pela microflora no intestino grosso, e o proprionato, um dos produtos de fermentação, pode inibir a síntese de colesterol no fígado (CHOI et al, 1998) e auxiliar na proteção da mucosa colônica (DRZIKOVA et al, 2001). As fibras solúveis podem também afetar o metabolismo lipídico no fígado e tecidos periféricos por modificações na secreção de hormônios gastrintestinais, insulina e glucagon (CHOI et al, 1998).

As fibras insolúveis como a celulose e a fibra do farelo de trigo, por outro lado, não são redutoras do colesterol sérico, mas atuam como diluidores *in vivo* de substâncias potencialmente carcinogênicas (DANZ e LUPTON, 1992; ESCUDERO et al, 2004). Danz

e Lupton (1992) observaram a atividade do amaranto nos níveis lipídicos e fisiologia do cólon de ratos e sugeriram que há uma combinação dos efeitos positivos das fibras insolúveis no cólon com a propriedade hipocolesteremiante das fibras solúveis, ambas as fibras presentes no amaranto.

A ligação dos ácidos biliares pelas fibras dietéticas, principalmente as solúveis, e o conseqüente aumento da sua excreção fecal, têm sido considerados como um possível mecanismo da redução do colesterol plasmático. Os ácidos biliares são ácidos esteróides sintetizados no fígado a partir do colesterol necessários para a digestão dos lipídeos no intestino delgado. Após conjugação com glicina ou taurina, eles são secretados no duodeno, ativamente reabsorvidos no íleo terminal e então transportados para o fígado via circulação enterohepática por diferentes mecanismos (KAHLON e SHAO, 2004; KAHLON, SMITH e SHAO, 2005; DONGWSKI, 2007; KAHLON, CHAPMAN e SMITH, 2007a).

Além destas funções vitais, alguns ácidos biliares, denominados ácidos biliares secundários (deoxicólico e litocólico), estão envolvidos no aumento do risco para câncer colorretal (KAHLON, CHAPMAN e SMITH, 2007a; KAHLON, CHAPMAN e SMITH, 2007b). Um dos possíveis mecanismos dos ácidos biliares fecais na gênese deste tipo de câncer seria por acidificação do cólon favorecendo maior solubilidade destes ácidos secundários que são tóxicos à mucosa intestinal (LITTLE et al, 2002).

Diversas fibras dietéticas são capazes de interagir com ácidos biliares no intestino delgado resultando em menor reabsorção, favorecendo maior excreção. O *pool* de ácidos biliares do organismo é limitado, quando não ocorre reabsorção, há o estímulo à conversão do colesterol plasmático e hepático em ácidos biliares adicionais (KAHLON e WOODRUFF, 2002; KAHLON e SHAO, 2004; KAHLON, SMITH e SHAO, 2005; DONGWSKI, 2007; KAHLON e SMITH, 2007a; KAHLON, CHAPMAN e SMITH, 2007a; KAHLON, CHAPMAN e SMITH, 2007b). Este é provavelmente um dos principais mecanismos hipocolesterolêmicos que ocorrem principalmente em humanos e animais hipercolesterolêmicos (DONGWSKI, 2007).

Em experimentos realizados por Grajeta (1997), ratos alimentados com dietas contendo farinhas de amaranto integral e desengordurada apresentaram significativa redução da concentração de colesterol no sangue e no fígado. Segundo o autor, o efeito hipocolesteremiante foi devido à fração solúvel das fibras dietéticas presente nas farinhas, em decorrência da sua maior concentração quando comparado ao teor de tocotrienóis presentes no óleo de amaranto (GRAJETA, 1997 *apud* GRAJETA, 1999).

No amaranto, além das fibras, existem outros componentes que podem estar relacionados a este efeito hipocolesteremiante, porém com mecanismos de ação diferentes das fibras dietéticas. Acredita-se que tocoferóis, tocotrienóis e esqualenos reduzem o colesterol sérico por inibição da 3-hidroximetilglutaril coenzima A (HMG CoA) redutase que é uma enzima chave na regulação da biossíntese do colesterol (DANZ e LUPTON, 1992). Qureshi, Lehmann e Peterson (1996) também sugeriram a presença de um potente inibidor da HMG CoA redutase no amaranto, além de 8 isômeros da vitamina E.

Lehmann, Putnam e Qureshi (1994) identificaram em grãos de amaranto altas concentrações de β e γ tocotrienóis e α -tocoferol, compostos que além de estarem envolvidos na regulação do metabolismo de colesterol, apresentam atividade anticarcinogênica e antioxidante *in vitro*. Lehmann (1996) relataram que a hipocolesterolemia estaria associada a algum componente solúvel na fração lipídica do amaranto, sugerindo serem os tocotrienóis e o esqualeno.

Chatuverdi, Sarojini e Devi (1993) atribuíram o efeito hipocolesteremiante do amaranto ao esqualeno, precursor do colesterol (CHATUVERDI, SAROJINI e DEVI, 1993 *apud* PLATE e ARÊAS, 2002). Shin *et al* (2003) reportaram que o óleo de amaranto e o esqualeno isolado a partir do óleo de amaranto exibiram um efeito redutor de colesterol em ratos hipercolesterolêmicos, sendo o mecanismo sugerido excreção de colesterol e ácidos biliares nas fezes (SHIN *et al*, 2003 *apud* KIM, KIM e SHIN, 2006a).

Berger *et al* (2003), estudando o efeito dos flocos e dos óleos bruto, refinado e insaponificável de amaranto em hamsters, relataram que houve diminuição do colesterol total em 10% quando alimentados com os flocos de amaranto e não houve diferença significativa no teor de LDL-c em todos os tratamentos em relação ao controle. Neste trabalho, Berger *et al* (2003) não confirmaram a hipótese que os flocos de amaranto, incluindo suas proteínas, amido, óleo e componentes físico-químicos sejam hipocolesterolemiantes.

A ação das proteínas alimentares no metabolismo de colesterol em humanos e inúmeros modelos animais é bem conhecida (SIRTORI *et al*, 1995). Proteínas de origem animal como a caseína, são mais colesterolêmicas e aterogênicas que proteínas vegetais, como o isolado protéico de soja. A caseína pode exercer seu efeito hipercolesterolêmico por mecanismos que incluem aumento da absorção de colesterol e redução do seu *turnover* (SARWAR e RATNAYAKE, 2000).

Diferenças na composição aminoacídica e/ou estrutura molecular de proteínas alimentares podem ser parcialmente responsáveis pelo efeito significativo das proteínas dietéticas no metabolismo de colesterol e no metabolismo de ácidos graxos essenciais em ratos (SARWAR e RATNAYAKE, 2000). Sirtori *et al* (1995) sugeriram que as globulinas de soja, especialmente a 7S podem exercer efeito redutor do colesterol em humanos e animais. Potter (1995) propôs que componentes não protéicos da soja como saponinas, fibras, ácido fítico e isoflavonas, podem afetar diretamente ou indiretamente o metabolismo de colesterol (POTTER, 1995 *apud* SARWAR e RATNAYAKE, 2000).

Carroll e Kurowska (1995) e Sugano, Ishiwaki e Nakashime (1984) atribuíram o efeito redutor sobre o colesterol à composição aminoacídica das proteínas alimentares. Giroux, Kurowska e Carroll (1999) sugeriram que os aminoácidos lisina, leucina, glicina, isoleucina, fenilalanina, triptofano e treonina são os responsáveis por um efeito hipercolesterolêmico moderado, enquanto a combinação de lisina+metionina é relacionada a um efeito hipercolesterolêmico elevado. Esses resultados ajudam a explicar porque as

proteínas animais são mais hipercolesterolêmicas que as proteínas vegetais. As proteínas animais apresentam teores de lisina e metionina mais elevados, enquanto as proteínas vegetais apresentam teores mais elevados de arginina, que se acredita ter um efeito hipocolesterolêmico.

Sugano, Ishiwaki e Nakashime (1984) verificaram a partir de dietas livres de colesterol contendo diferentes proteínas alimentares (leite, peixe, ovo, soja, arroz e amendoim) o efeito hipocolesterolêmico das proteínas vegetais quando comparadas às proteínas animais. Houve uma correlação negativa entre o nível de colesterol plasmático e a razão arginina/lisina das proteínas dietéticas, sugerindo ser este o mecanismo na determinação dos níveis de colesterol plasmático.

Sarwar e Ratnayake (2000) verificaram o efeito da suplementação de aminoácidos na caseína e gelatina (considerando as diferenças nos perfis aminoacídicos entre as duas fontes) nos parâmetros dos lipídeos séricos (colesterol total, HDL-c e composição de ácidos graxos). As concentrações de colesterol total e HDL-c foram significativamente maiores nos ratos alimentados com dieta de caseína não suplementada quando comparado aos ratos alimentados com dieta de gelatina não suplementada. A suplementação da caseína com glicina ou glicina+arginina (aminoácidos presentes em grande quantidade na gelatina) reduziu significativamente as concentrações plasmáticas de colesterol total. Porém, a suplementação da gelatina com ácido glutâmico, metionina, fenilalanina ou tirosina ou uma mistura destes quatro aminoácidos não tiveram nenhum efeito no colesterol total plasmático.

A ligação de ácidos biliares por proteínas também tem sido relatada na literatura, sendo que a proteína da soja tem mostrado poder redutor do colesterol total e LDL-c em animais de laboratório e humanos hipercolesterolêmicos. Os mecanismos propostos de ação incluem a redução da absorção de colesterol ou ácidos biliares e modificações no metabolismo hepático de colesterol e lipoproteínas (KAHLON e WOODRUFF, 2002; HIGAKI et al, 2006).

Maior excreção de ácidos biliares e redução do conteúdo de colesterol hepático foram observadas em hamsters alimentados com proteínas de soja do que com caseína (KAHLON e WOODRUFF, 2002). Alguns peptídeos obtidos a partir da digestão *in vitro* da proteína de soja têm atividade ligante de ácidos biliares e estimula a excreção fecal de esteróides (HIGAKI et al, 2006).

Nagata, Ishiwaki e Sugano (1982) mostraram que a proteína de soja aumentou a excreção fecal de colesterol como consequência da redução de sua absorção intestinal. Outros estudos têm sugerido que a proteína de soja aumenta a saturação de colesterol na bile pelo aumento da secreção biliar de colesterol (NAGATA, ISHIWAKI e SUGANO, 1982 *apud* MACARULLA et al, 2001).

Sugano *et al* (1988) avaliaram o efeito redutor de colesterol em modelo animal e em humanos voluntários das frações de baixo (FBP) e alto peso molecular (FAP) de hidrolisados protéicos de soja obtidos *in vitro* com proteases microbianas. Os autores verificaram que a FAP resultou na maior excreção de esteróides e consequentemente maior efeito redutor do colesterol sérico quando comparado às proteínas do isolado protéico de soja nativo (SUGANO et al, 1988 *apud* HIGAKI et al, 2006).

A ligação de ácidos biliares *in vitro* é utilizada como medida do potencial hipocolesteremiante de um produto por ser este o mecanismo de ação das fibras dietéticas e proteínas. É uma metodologia mais barata e mais rápida do que a realização de experimentos *in vivo* (CAMIRE, ZHAO e VIOLETTE, 1993).

Kahlon e Woodruff (2002) relataram a ligação de ácidos biliares *in vitro* com proteínas de soja, feijão variedade pinto, feijão preto e glúten de trigo. As proteínas dos feijões apresentaram maior capacidade de se ligar aos ácidos biliares (23,0-30,0%) que as da soja (17,0%) e o glúten de trigo (12,0%).

Yoshie-Stark e Wäsche (2004) relataram que a farinha desengordurada de tremoço e seus digeridos protéicos apresentaram maior capacidade de ligação de ácidos biliares que a farinha de soja desengordurada e seus digeridos. O isolado protéico solúvel em ácido de tremoço mostrou capacidade de ligar ácidos biliares superior à colestiramina, sugerindo que este isolado pode ter uma aplicação potencial como agente redutor de colesterol em pacientes hipercolesterolêmicos.

Kahlon, Smith e Shao (2005) verificaram a capacidade ligante de ácidos biliares por diversas variedades de feijões: *Phaseolus vulgaris*, *Vigna mungo*, *Cicer arietinum* e *Phaseolus aconitifolius*. Os pesquisadores utilizaram a colestiramina (resina aniônica ligadora de ácidos biliares) como controle positivo e a celulose (fibra não ligadora de ácidos biliares) como controle negativo. Todas as amostras apresentaram capacidade ligante de ácidos biliares, porém inferior à apresentada pela colestiramina. A capacidade de ligação das amostras variou de 2,5 a 6,7 %. O “bengal gram” apresentou a maior capacidade ligante de ácidos biliares diferindo-se estatisticamente das demais amostras. A celulose ligou apenas 1,5% da mistura de ácidos biliares, capacidade inferior à encontrada para as amostras analisadas.

Em outro estudo, Kahlon e Shao (2004) observaram a ligação de ácidos biliares da soja, feijão preto, grão de bico e feijão lima. A soja apresentou baixa capacidade ligante de ácidos biliares (1,9%), sendo semelhante à encontrada para a celulose (1,5%). A maior capacidade ligante de ácidos biliares foi verificada pelo grão de bico (10,0%) quando comparado às outras amostras.

Kahlon e Smith (2007b) relataram a ligação de ácidos biliares por diversas frutas, *blueberries*, maçãs, ameixa seca, ameixa, cerejas, morangos e *cranberries*. As *blueberries* foram as que apresentaram maior capacidade ligante de ácidos biliares (7,0%) e as maçãs a menor capacidade ligante (1,0%) quando comparados às outras amostras (KAHLON e SMITH, 2007b *apud* KAHLON e SMITH, 2007a). A atividade ligante de ácidos biliares destas frutas pode estar relacionada ao seu conteúdo de fitonutrientes (flavonóides,

catequinas, polifenóis, etc...), frações hidrofóbicas não digeridas e/ou metabólitos aniônicos ou catiônicos produzidos durante o processo digestivo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material

Para a realização deste trabalho, utilizou-se grãos de amaranto (*Amaranthus cruentus* variedade BR Alegria) obtidos de produtores do município de Ituporanga, estado de Santa Catarina. As enzimas utilizadas para digestão *in vitro* do CPA e seus hidrolisados foram: pepsina da mucosa de estômago de suíno (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA, cód. P-7012, lote: 120K7654) e pancreatina suína (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA, cód. P-1625, lote: 41K1271). A Alcalase 2.4L utilizada para a hidrólise foi gentilmente fornecida pela empresa Novozymes (Araucária – PR, Brasil).

Para a determinação da atividade inibidora da ECA, foram utilizados: enzima conversora da angiotensina (ECA) de pulmão de coelho (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, EUA, cód. A6778, lote 084K1430) e substrato sintético da ECA, hipuril-histidil-leucina (HHL) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA, cód. H1635, lote 062K1092).

Para a atividade ligante de ácidos biliares foram utilizados: ácido cólico (cód. C1129, lote 055K0016), ácido deoxicólico (cód. D2510, lote 065K0042), ácido glicocólico (cód. G2878, lote 124K5327), ácido taurocólico (cód. T4009, lote 026K5313), colestiramina resina (cód. C4650, lote 074K0094) adquiridos da Sigma Chemical Co (St.Louis, MO, EUA) e o Kit colorimétrico para análise de ácidos biliares Diazyme DZ092-A (Califórnia, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico.

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção e caracterização das farinhas, concentrado e hidrolisado protéico de amaranto

A farinha integral de amaranto (FIA) foi obtida por moagem do grão em moinho de facas (modelo MA630, Marconi, Piracicaba-SP, Brasil), com controle de temperatura ($16 \pm 3^\circ\text{C}$). A farinha com granulometria $\leq 250 \mu\text{m}$ foi desengordurada com hexano (1:3 p/v) por 24 h a temperatura ambiente e centrifugada ($1500 \times g/20 \text{ min}/4^\circ\text{C}$) para remoção do solvente, permanecendo a temperatura ambiente até sua completa evaporação. 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).

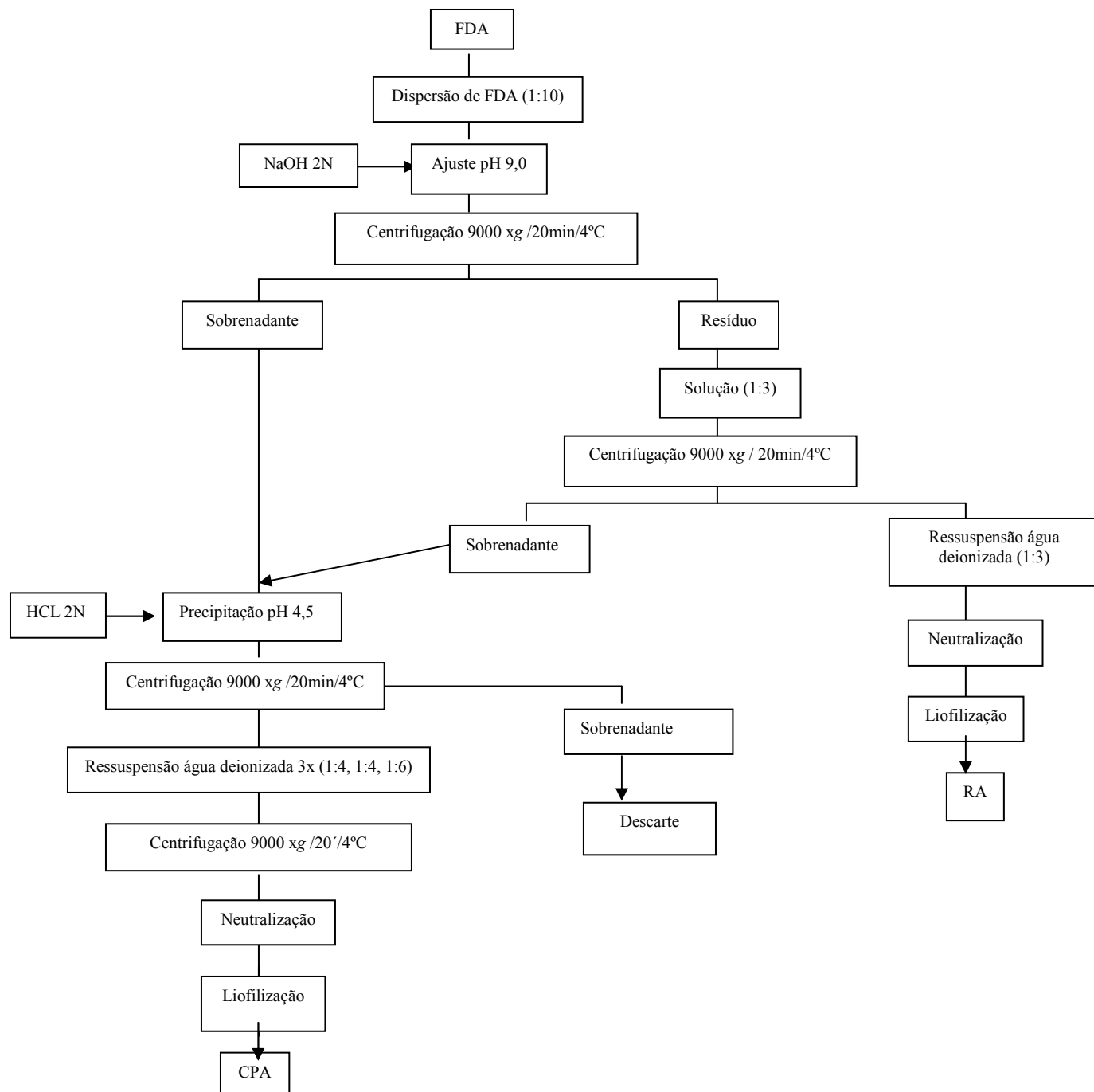


Figura 4. Fluxograma da obtenção do concentrado protéico de amaranto (FDA - farinha desengordurada de amaranto, CPA – concentrado protéico de amaranto, RA – resíduo alcalino).

Umidade, cinzas e nitrogênio total da farinha e produtos foram determinados de acordo com a AOAC (1995) e o teor de proteína foi calculado multiplicando-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) e as fibras dietéticas determinadas pelo método enzimico-gravimétrico (AOAC, 1995). As determinações foram realizadas em triplicata.

As condições de reação para obtenção dos hidrolisados protéicos de amaranto (HPA) com a enzima Alcalase foram: relação E:S (1:50, p/p), pH 8,0 e 60°C para as suspensões de CPA, com 10% de amostra (p/v). A hidrólise foi realizada sem e com tratamento térmico prévio da dispersão de CPA, 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 grau de hidrólise (GH), a reação foi interrompida por aquecimento a 90°C por 10 min, centrifugada (1500 x g/10 min/21°C) e o sobrenadante, contendo a proteína hidrolisada, foi congelado e liofilizado.

O método pH-*stat* foi utilizado para determinação do GH por ter elevado valor prático no acompanhamento do processo para a realização de hidrólise controlada sem necessidade de retirada de alíquotas durante a reação. A desvantagem desse método é que a titulação de NaOH para controle do pH, promove um aumento no teor do resíduo mineral da amostra pela adição de sódio (MUTILANGI, PANYAM e KILARA, 1995 *apud* COSTA, 2004). Após a obtenção dos hidrolisados, foi determinado o grau de hidrólise pelo método do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para todos os produtos, a fim de possibilitar a comparação entre os hidrolisados e os digeridos (concentrados e hidrolisados protéicos obtidos após digestão *in vitro*) obtidos por métodos diferentes.

4.2.1.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil de peso molecular da FDA, CPAst, CPAAtt, RA e hidrolisados protéicos (HPAst e HPAtt) foi determinado por eletroforese utilizando gel de poliacrilamida em sistema SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Nesse sistema, utilizam-se dois géis com concentrações diferentes de acrilamida, sendo: gel de separação (12% T e 4% C) e gel de empilhamento (4% T e 2,67% C). A FDA, CPA, RA e hidrolisados protéicos foram diluídos em tampão redutor (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%), aquecidos a 90°C por 30 minutos. Foram aplicadas alíquotas de 10 μ L da solução da FDA, CPAst, CPAAtt, RA e hidrolisados protéicos contendo 0,4% de proteína. O padrão utilizado foi o de alto peso molecular (14 a 97 kDa, Biorad, cód. 161-0304). 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).

4.2.2. Digestão *in vitro* das proteínas de amaranto

A resistência do concentrado protéico e de seus hidrolisados a ação das proteases gástricas foi avaliada de acordo com procedimento descrito por Vermeirssen *et al* (2003). Dispersões aquosas de CPAst e CPAAtt e hidrolisados com Alcalase (10% de amostra p/v) sem e com tratamento térmico prévio do CPA, foram ajustadas a pH 2,5 com HCl 2 N, para a digestão com a pepsina (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 (E:S 1:50 p/p), a 37°C durante 4 horas (Figura 5). 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.

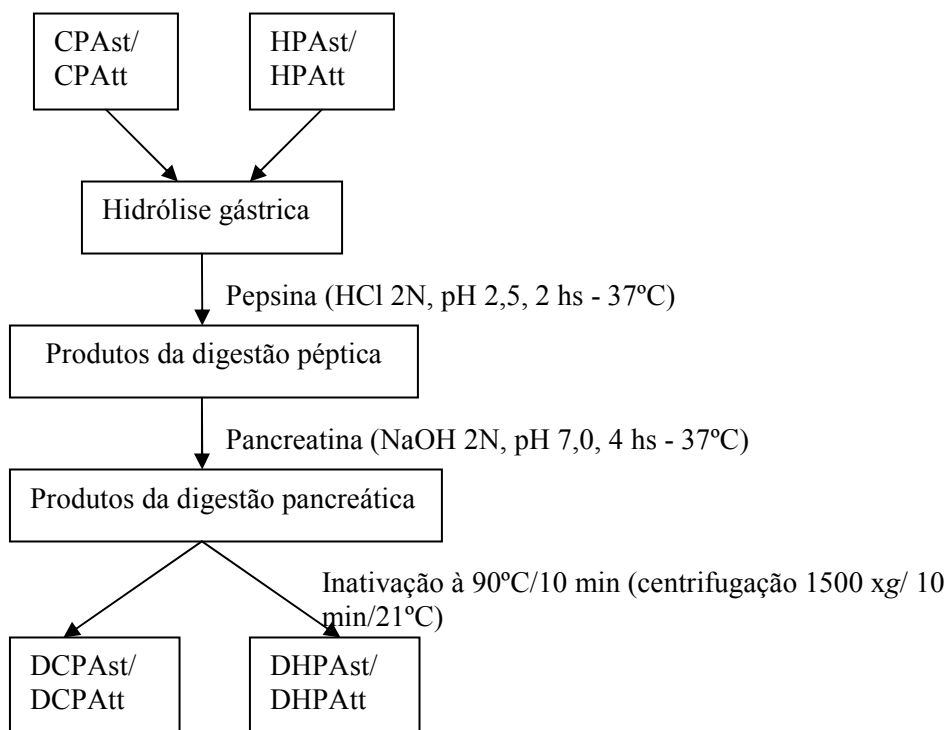


Figura 5. Fluxograma da digestão *in vitro* das proteínas de amaranto

Os hidrolisados protéicos e digeridos foram codificados da seguinte forma: hidrolisado de CPA, sem tratamento térmico prévio, com Alcalase (HPAst); digerido do CPA sem tratamento térmico prévio (DCPAst); digerido do HPAst (DHPAst); hidrolisado de CPA, com tratamento térmico prévio, com Alcalase (HPAtt); digerido do CPA com tratamento térmico prévio (DCPAtt); digerido do HPAtt (DHPAtt).

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).

4.2.2.1. Grau de hidrólise

O GH dos hidrolisados protéicos e dos digeridos foi determinado pelo método do TNBS (ADLER-NISSEN, 1979). Este método fundamenta-se na reação colorimétrica do ácido trinitrobenzenosulfônico com os grupos α -amino terminais das proteínas e peptídeos formados durante a reação de hidrólise.

O GH foi calculado utilizando a seguinte expressão:

$$GH = \frac{mMolLeu}{h_{tot}} \times 100$$

onde:

$mMolLeu$ = grupamentos amínicos livres, calculados a partir da curva padrão de leucina

h_{tot} = 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 h_{tot} 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.

4.2.2.2. Composição aminoacídica

A composição aminoacídica, exceto o triptofano, foi determinada segundo metodologia descrita por White, Hart e Kry (1986). A FDA, o CPA e os hidrolisados com Alcalase sem e com tratamento térmico (HPAst e HPAtt) foram hidrolisados por 24 horas com ácido clorídrico 6N e posteriormente separados por CLAE-FR com reação pré-coluna com fenilisotiocianato e detectados a 254 nm. Utilizou-se uma coluna Luna C18 (25 cm x

4,6 mm, 5 µm), série 357152-28, cromatógrafo Thermo Separation Products e detector Spectra System UV 2000. O escore químico (EQ) foi calculado através do quociente da concentração de cada um dos aminoácidos essenciais da proteína teste pela concentração do mesmo aminoácido da proteína usada como referência (padrão FAO/85) de acordo com a equação abaixo:

$$EQ = \frac{\text{g de aa} / 100 \text{ g de proteína teste}}{\text{g de aa} / 100 \text{ g de proteína padrão}}$$

4.2.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE Tricina)

O perfil de peso molecular dos hidrolisados protéicos e digeridos foi determinado por eletroforese utilizando gel de poliacrilamida em sistema SDS-PAGE-Tricina (SCHAGER e JAGOW, 1987). Nesse sistema, utilizam-se três géis com diferentes concentrações de acrilamida, sendo: 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). Os hidrolisados protéicos e digeridos foram diluídos em tampão redutor (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS 10%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%), aquecidos a 40°C por 30 minutos. Foram aplicadas alíquotas de 20 µL da solução de cada hidrolisado contendo 0,4% de proteína. O padrão utilizado foi o de baixo peso molecular, entre 6,5 e 26,6 kDa (Pharmacia, cód. 80-1129-83). 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%.

4.2.2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência – fase reversa (CLAE-FR)

Os perfis cromatográficos das amostras (CPA, hidrolisados protéicos e digeridos) foram determinados por CLAE-FR, segundo Smyth e FitzGerald (1998) com algumas modificações. Utilizou-se uma coluna Varian C18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm), série 072269-9, equilibrada com 100% do solvente A (ácido trifluoroacético 0,1% - TFA em água, v/v). As amostras foram eluídas com gradiente linear: 80% do solvente A e 20% do solvente B (acetonitrila/TFA 0,1%, 60:40, v/v) até 15 minutos, e posteriormente 100% do solvente B em 50 minutos. Aos 60 minutos a coluna foi reequilibrada às condições iniciais.

As corridas foram conduzidas a 35°C em cromatógrafo Varian (bomba modelo 9012 - série 04824 e detector UV modelo 9050 - série 02570, Califórnia – EUA), com fluxo de 1 mL/min e a absorvância monitorada a 214nm. O volume de injeção foi 20 µL e a concentração foi 0,5% de proteína. Todas as amostras foram previamente filtradas em membranas de acetato de celulose 0,22 µm (hidrolisados protéicos e digeridos) e 0,45 µm (CPA). Para fins de análise, os cromatogramas dos hidrolisados e digeridos protéicos foram divididos em duas regiões: (I) baixa hidrofobicidade: peptídeos que eluíram até 15 minutos com um gradiente da solução B até 20% e (II) alta hidrofobicidade, com gradiente da solução B até 100%.

4.2.2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência – exclusão molecular (CLAE-EM)

O peso molecular aparente das proteínas nas amostras foi determinado por CLAE-EM, segundo Kalapathy, Hettiarachchym e Rhee (1997) com algumas adaptações. Utilizou-se um cromatógrafo Varian (bomba modelo 9012 – série 04824 e detector UV modelo 9050 – série 02570, Califórnia-EUA), e uma coluna BioSep-SEC-S 2000 Phenomenex (300 x 7,8 mm) série 333734-50. As amostras foram eluídas com tampão fosfato de sódio 0,05M (NaCl 0,15M, pH 6,8) a 30°C, com fluxo de 0,4 mL/min e a absorvância monitorada a 280nm. O volume de injeção foi de 20 µL e a concentração foi 0,5% de proteína (p/v). As

amostras foram previamente filtradas em membranas de acetato de celulose 0,22 μm (hidrolisados protéicos e digeridos) e 0,45 μm (CPA).

Os pesos moleculares aparentes correspondentes aos picos eluídos foram estimados a partir de uma curva de calibração construída com pesos moleculares padrões da Bio-Rad: tiroglobulina bovina (670 kDa), gama globulina bovina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobulina (17 kDa) e vitamina B-12 (1,35 kDa). Os resultados obtidos pela análise por CLAE-EM são baseados na solubilidade (%) dos hidrolisados protéicos e digeridos em tampão fosfato 0,05M, pH 6.8 utilizado como veículo de diluição e fase móvel.

4.2.3 Determinação da atividade inibidora da ECA

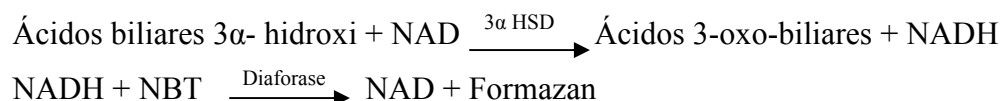
A atividade inibitória da ECA dos hidrolisados protéicos e digeridos foi determinada por eletroforese capilar de acordo com o método de Shihabi (1999) com modificações (COSTA, NETTO e SILVA, 2003), sendo as análises realizadas em duplicata. A atividade foi expressa como valor IC_{50} , que corresponde à quantidade de inibidor necessária para inibir 50% da atividade enzimática. A determinação do valor IC_{50} foi feita pela incubação do volume de 50 μL dos hidrolisados protéicos e digeridos em várias concentrações, com 100 μL da ECA e 100 μL do HHL. Após 30 min, a enzima foi inativada pela adição de 100 μL de acetonitrila.

Após filtração dos produtos em membrana de acetato de celulose 0,22 μm , o ácido hipúrico (AH), o produto da reação, foi separado e quantificado por eletroforese capilar em aparelho HP-3DCE (Agilent, Waldbronn, Germany), equipado com capilar de sílica fundida (40 cm X 50 μm de d.i.). Como fase móvel, utilizou-se tampão borato de sódio 50 mM, pH 9,3 e fluxo de corrente do cátodo para o ânodo. A tensão de corrida foi mantida a 10 kV. Os analitos foram detectados a 228 nm com detector de arranjo de diodos (DAD) e as áreas dos picos foram integradas pelo software HP-3DCE.

Entre as análises, o capilar foi lavado com solução de hidróxido de sódio 1N e água, e em seguida recondicionado com tampão de corrida. O valor IC₅₀ de cada hidrolisado foi determinado por análise de regressão do inverso da área do ácido hipúrico liberado na reação (área integrada no eletroforegrama), em função da concentração do hidrolisado protéico e/ou digerido incubado na reação (mg de proteína/mL).

4.2.4. Determinação da atividade ligante de ácidos biliares

A atividade ligante de ácidos biliares da farinha desengordurada de amaranto, resíduo alcalino, concentrado protéico e hidrolisado protéico de amaranto sem tratamento térmico prévio do CPA, foi determinada segundo a metodologia descrita por Camire e Dougherty (2003) e Mashige *et al* (1981) com modificações. O princípio do método se baseia em reações enzimáticas demonstradas abaixo:



Os ácidos biliares são conjugados primeiramente a ácidos 3-oxo-biliares em uma reação catalisada pela enzima 3 α -hidroxisteroide-desidrogenase (3 α -HSD). Nesta reação de oxidação, uma quantidade equimolar de NAD é reduzida a NADH. Na continuação, o NADH é oxidado a NAD produzindo-se a redução simultânea do NBT a formazan pela ação catalítica da diaforase. O formazan apresenta um máximo de absorvância a 540 nm. A intensidade da cor produzida é diretamente proporcional à concentração dos ácidos biliares na amostra.

Para cada ácido biliar (cólico, taurocólico, deoxicólico e glicocólico) foi feita diariamente uma curva padrão utilizando-se o Kit Diazyme (DZ092A) nas concentrações de 0 a 200 μ M. Utilizou-se inicialmente uma solução-mãe de 200 μ M de cada ácido biliar diluídos em uma solução de 0,9% NaCl e posteriormente foram realizadas as diluições

necessárias para obtenção das concentrações de 50, 100 e 150 μM . As análises foram realizadas em triplicata.

Para a reação colorimétrica adicionou-se 30 μL de cada padrão e 225 μL do reagente contendo NAD, NBT e Diaforase que foram incubados por 4 min a 37°C, adicionou-se 45 μL da 3 α HSD e incubou-se por 5 min a 37°C. Para paralisar a reação adicionou-se 40 μL de ácido fosfórico 1,33 M e a leitura a 540 nm foi realizada imediatamente em espectrofotômetro Beckam DU-70.

Para avaliação da propriedade ligante das amostras, seguiu-se o protocolo sugerido por Camire e Dougherty (2003) conforme demonstrado na Figura 6. As análises foram realizadas em duplicata.

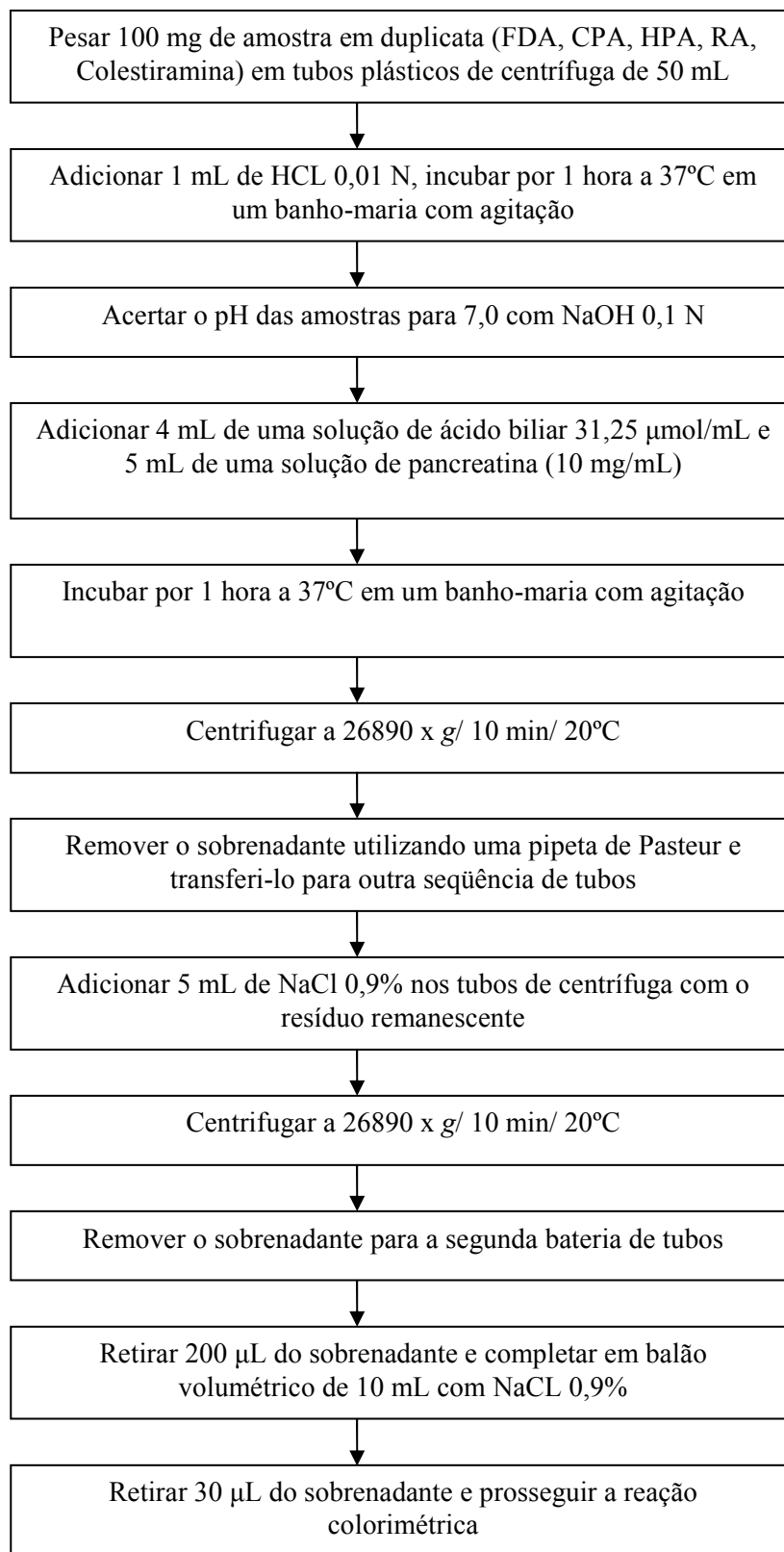


Figura 6. Fluxograma da atividade ligante de ácidos biliares

Para as amostras, assim como para as diluições da curva padrão foram feitas leituras do reagente branco, contendo a amostra e os reagentes colorimétricos, porém com paralisação da reação antes da incubação a 37°C por adição do ácido fosfórico 1,33M. A atividade foi expressa como porcentagem de ligação de ácidos biliares, subtraindo-se a absorvância obtida da leitura do branco das amostras e curva padrão.

4.2.5. Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas foram apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados obtidos pela análise da atividade inibidora da ECA e atividade ligante de ácidos biliares foram submetidos à análise de variância ANOVA e teste de Tukey para confronto entre as médias. O software Statistica for Windows (1995) (Tulsa, OK) foi utilizado no intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção e caracterização das farinhas, concentrado e hidrolisados protéico de amaranto

O teor de proteínas, lipídeos, cinzas, umidade e fibras das farinhas integral (FIA) e desengordurada (FDA), concentrado protéico (CPA) e resíduo alcalino da extração (RA) estão apresentados na Tabela 2. A composição centesimal do CPA apresentada refere-se a uma única extração. Nas demais extrações realizadas, determinou-se apenas o teor de proteínas para avaliar a variabilidade do processo de obtenção do CPA, com teor médio de proteínas $61,7\% \pm 4,27$.

O teor de proteínas da FIA foi 13,2% e o da FDA 14,8%, valor abaixo do reportado por Marcílio *et al* (2003) para a mesma variedade, 16,2% de proteína na farinha integral, mas utilizando fator de conversão 6,25. Para outras variedades de *A. cruentus*, Escudero *et al* (2004) reportaram 16,6% de proteína enquanto Becker *et al* (1981) encontraram de 15,3 a 18,2% de proteína, ambos utilizando fator de conversão 5,85. O teor de proteína nas farinhas pode variar em função do tipo de moagem e classificação da farinha, pois há maior concentração dos nutrientes na casca e germe da semente quando comparados ao grão (BETSCHART *et al*, 1981). O grão é composto por 18,5% de proteína, 7,4% de lipídeos, 3,3% de fibra e 3,2% de cinzas, enquanto a casca 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).

O teor de proteínas do CPA, 58,3%, é maior do que o obtido por Escudero *et al* (2004), 52,6%, utilizando a farinha integral para a obtenção do CPA e condições pH 11 na fase de extração. Scilingo *et al* (2002), utilizando metodologia semelhante à do presente estudo, diferindo apenas no pH de precipitação isoelétrica (pH 5,0), obtiveram CPA com teor de proteínas 40,0% superior ao do obtido no presente trabalho. Salcedo-Chávez *et al*

(2002), também utilizando *A. cruentus* e condições semelhantes de processo, diferindo na velocidade de centrifugação e maior tempo na etapa de precipitação isoelétrica, obtiveram concentrado protéico com maior teor de proteínas, 83,4% (N x 5,85).

Teores de proteínas em concentrados e isolados protéicos podem variar com as condições de obtenção. Valores mais elevados de pH na etapa de extração, em geral, resultam no aumento da porcentagem final de proteína no concentrado protéico. No entanto, o pH de extração muito alto pode provocar algumas reações químicas como: hidrólise da ligação peptídica, destruição de alguns aminoácidos, cross-linking e racemização de resíduos de aminoácidos de L-aminoácidos para D-aminoácidos, que não são absorvidos pelos humanos (HAYASHI e KAMEDA, 1980).

Embora o teor protéico do RA seja baixo, 7,0%, é a fração mais abundante, compreendendo cerca de 50,0% em peso da farinha utilizada para a obtenção do CPA, desta forma cerca de 23,3% da proteína total estão presentes nesta fração. Reis e Netto (2006) reportaram perda de 50,0% de proteína em relação à quantidade protéica inicial na farinha. A presença de proteína neste resíduo pode resultar da interação natural das fibras, lipídeos e amido com a proteína, o que dificulta sua remoção (REIS e NETTO, 2006).

Tabela 2. Composição centesimal da farinha integral de amaranto (FIA), farinha desengordurada de amaranto (FDA), concentrado protéico (CPA) e resíduo alcalino (RA)

Composição (%)	FIA	FDA	CPA	RA
Proteínas	13,2±0,3	14,8±0,2	58,3±0,2	7,0±0,5
Lipídeos	7,4±0,2	3,9±0,1	9,7±0,2	1,8±0,1
Cinzas	5,5±0,2	5,0±0,2	3,3±0,0	3,8±0,1
Umidade	12,5±0,0	13±0,1	3,9±0,2	6,2±0,1
FAT *	ND	6,1±0,1	2,1±0,2	8,6±0,3
FAI**	ND	5,0±0,0	1,8±0,0	7,7±0,1
FAS ***	ND	1,1±0,2	0,3±0,1	0,9±0,2

* FAT – Fibra alimentar total

** FAI – Fibra alimentar insolúvel

*** FAS – Fibra alimentar solúvel

ND – não determinado

O teor de lipídeos da FIA, 7,4%, é semelhante ao reportado por Marcílio *et al* (2003), para *A. cruentus* variedade japônica (Embrapa – Brasil). Escudero *et al* (2004) reportaram 8,8% de lipídeos para a farinha integral de *A. cruentus* proveniente da Argentina. O tratamento com hexano levou ao desengorduramento parcial da farinha, com redução de 52,7% do teor inicial.

O teor de lipídeos no CPA apresentou-se elevado, 9,7%, indicando que os lipídeos presentes na FDA foram arrastados no processo de obtenção do concentrado. Mendonça (2006), também obteve isolado protéico com teor de lipídeos maior do que o da farinha, 7,7% e 2,0% respectivamente. Escudero *et al* (2004) obtiveram CPA com 5,9% de lipídeos utilizando farinha integral como matéria prima. Estes autores, no entanto, utilizaram éter de petróleo para a extração e determinação do teor de lipídeos, enquanto no presente trabalho foi utilizado clorofórmio e metanol, o que pode ter influenciado no tipo e quantidade de lipídeos extraídos.

Observou-se um discreto aumento no teor de umidade da FDA (13,4%) quando comparada a FIA (12,5%), sendo este resultado semelhante ao relatado por outros autores,

entre 10,3 e 13,7% (MARCÍLIO et al, 2003; ESCUDERO et al, 2004). O teor de cinzas da FIA (5,5%) e FDA (5,0%) foram superiores aos encontrados na literatura, 1,7 a 3,8% (BECKER et al, 1981; MARCÍLIO et al, 2003; ESCUDERO et al, 2004). Para o CPA, os valores de umidade e cinzas (3,9% e 3,3% respectivamente) foram semelhantes ao encontrado por Escudero *et al*, 2004, (3,1% e 3,7% respectivamente), embora a forma de obtenção do CPA tenha sido diferente pela utilização de maior pH de solubilização por Escudero *et al* (2004).

Observou-se maior concentração da fibra alimentar total (FAT) e insolúvel (FAI) no RA que na FDA e CPA. A fibra alimentar solúvel (FAS) foi a de menor concentração em todas as amostras (0,3 a 1,1%). O CPA apresentou o menor teor de FAS, pela maior solubilidade destas fibras em água, que foram perdidas durante o processo de obtenção do concentrado, ficando parte da FAS retida no RA. Escudero *et al* (2004) reportaram teor semelhante de FAI na farinha ao encontrado neste trabalho (5,5% e 5,0% respectivamente), entretanto o valor de FAI e FAS no CPA reportado por estes autores (20,9% e 12,9% respectivamente) foi significativamente maior ao teor encontrado no presente trabalho (1,8% e 0,3% respectivamente). Outros pesquisadores como Tosi *et al* (2001), estudando as fibras dietéticas do grão de *A. cruentus* encontraram teor de fibra total de 14,2% (8,1% fibras insolúveis e 6,1% fibras solúveis), sendo esse teor modificado após diferentes moagens do grão. Becker *et al* (1981), para diferentes variedades de *A. cruentus*, relataram teor de FAT de 3,2% a 5,8%, resultados próximos aos relatados neste trabalho.

5.1.1. Hidrolisados protéicos de amaranto

Segundo Henn & Netto (1998) e Costa, Gontijo e Netto (2007), proteínas com diferentes graus de desnaturação, mesmo com igual GH e produzidos com iguais condições de hidrólise, podem liberar diferentes peptídeos. Os hidrolisados protéicos foram obtidos a partir do CPA sem tratamento térmico (CPAst) e com tratamento térmico prévio (CPAtt), utilizando-se a enzima Alcalase. Esperava-se, então, que com o tratamento realizado (90°C/30 min), as proteínas estivessem parcialmente desnaturadas, favorecendo o acesso da

Alcalase aos sítios de sua especificidade, fato este não observado após o tratamento térmico.

Os CPA com e sem tratamento térmico prévio apresentaram curvas de hidrólise semelhantes, bem como o GH atingido após 100 min de hidrólise, 16,5% e 16,6% respectivamente (Figura 7). Estes resultados sugerem que a reação de hidrólise com Alcalase não teve seu padrão alterado em função do tratamento térmico prévio. Segundo Scilingo *et al* (2002), desnaturação parcial das proteínas de amaranto ocorre após 10 minutos a 90°C. O padrão de hidrólise das proteínas do amaranto com outras enzimas, curcubita e papaína, também não foi alterado em função do tratamento térmico (SCILINGO *et al*, 2002). Costa, Gontijo e Netto (2007), ao contrário, verificaram que a desnaturação parcial das proteínas de soro de leite facilitou a atividade da Alcalase, possivelmente em decorrência da alteração na estrutura protéica, que favorece a exposição de grupos hidrofóbicos expondo sítios da especificidade desta enzima.

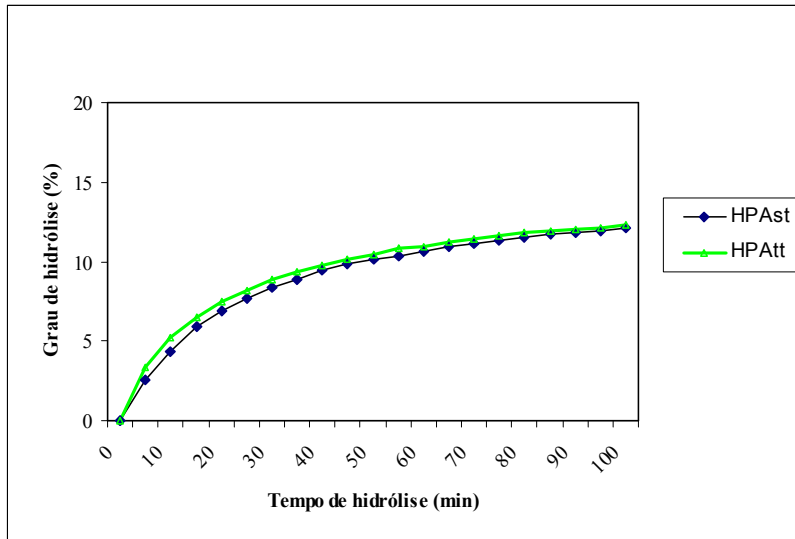


Figura 7. Curva de hidrólise do HPAst e HPAtt em *pH-stat* com titulação de NaOH

Para a obtenção dos hidrolisados utilizados no estudo, HPAst e HPAtt, a reação de hidrólise foi interrompida quando se atingiu 12% de GH. Os teores de proteínas destes hidrolisados foram 65,7 e 58,1%, respectivamente. O menor teor de proteínas do HPAtt

pode ser explicado pela menor solubilidade de parte das proteínas após o tratamento térmico prévio e pela sua precipitação na etapa de centrifugação após hidrólise.

5.1.2. Caracterização eletroforética das proteínas (SDS-PAGE)

Os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE) da FDA, CPAst, CPAtt, RA e dos hidrolisados (HPAst e HPAtt) estão apresentados na Figura 8. Não foram observadas diferenças significativas entre os perfis eletroforéticos do CPAst e CPAtt. FDA e CPA apresentaram perfis semelhantes (Figura 8A), com presença de bandas bem definidas com pesos moleculares acima de 20 kDa. As bandas localizadas na região de 20 e 43 kDa correspondem às globulinas 7S e 11S. Marcone (1999), estudando os perfis eletroforéticos em condições redutoras das globulinas 7S e 11S purificadas obtidas de grãos de *A.hypochondriacus*, encontraram bandas bem definidas entre 30 e 43 kDa para as globulinas 7S e entre 20 e 43 kDa para as globulinas 11S. Martinez, Castellani e Añón (1997) reportaram bandas com pesos moleculares entre 20 - 21,7 kDa, 31 – 33,1 kDa e 71 – 78 kDa para a globulina 11S do amaranto, que se mostrou semelhante à globulina 7S da soja.

Gamel *et al* (2005) reportaram pesos moleculares para as glutelinas e prolaminas que são as frações protéicas em menor proporção nas proteínas de amaranto. Para as glutelinas reportaram pesos moleculares entre 48-67 kDa e 35-38 kDa, sendo as frações observadas na Figura 8A entre 43-67 kDa no CPAst, CPAtt e FDA sugestivas de glutelinas, apresentando-se mais concentradas nos CPA.

No perfil do CPAst e CPAtt nota-se a presença de bandas mais bem definidas de pesos moleculares entre 30 e 43 kDa e 20 e 30 kDa quando comparado à FDA. Entretanto, a FDA apresentou bandas bem definidas de pesos moleculares <14 kDa não observadas no CPA, porém presentes no RA. Segundo Fidantsi e Doxastakis (2001), isolados protéicos obtidos por precipitação isoelétrica contém principalmente globulinas e menor concentração

de albuminas. Martinez e Añón (1996) relataram que por precipitação em pH 6 e 7 obtêm-se maior concentração de albuminas 2 e em pH menor que 5, globulinas e albumina 1.

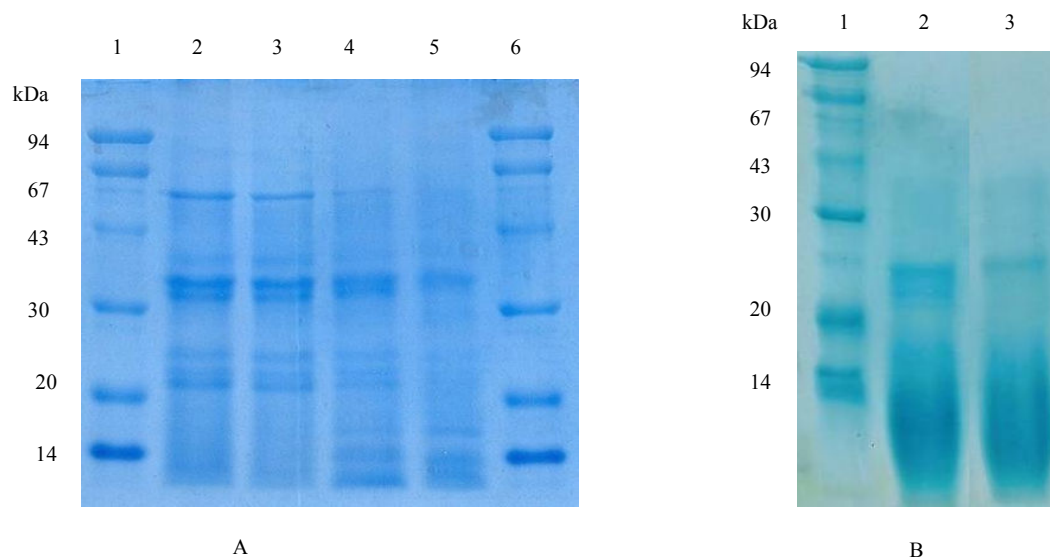


Figura 8. Eletroforese SDS-PAGE da FDA, CPAst, CPAtt, RA e hidrolisados protéicos. A) Coluna 1 – padrões; coluna 2 – CPAtt; coluna 3 – CPAst; coluna 4 – FDA; coluna 5 – RA; coluna 6 - padrões. B) Coluna 1- padrões; coluna 2 – HPAst; coluna 3 – HPAtt

Os hidrolisados HPAst e HPAtt apresentaram perfis eletroforéticos semelhantes (Figura 8B). As bandas de pesos moleculares entre 30 e 67 kDa foram totalmente hidrolisadas, sugerindo que as glutelinas são mais susceptíveis à ação da Alcalase que as globulinas. Entre 20 e 30 kDa nota-se algumas bandas no HPAst, sendo estas mais tênues no HPAtt, sugerindo que o tratamento térmico pode ter facilitado a ação da Alcalase nestas frações. Scilingo *et al* (2002), estudando o perfil eletroforético de isolados protéicos de amaranto sem e com tratamento térmico prévio hidrolisados com curcubita e papaína, não observaram diferenças significativas entre os tratamentos. As frações com PM entre 45 e 67 kDa foram totalmente hidrolisadas por ambas enzimas, entretanto a de 30 kDa não sofreu ação da curcubita, mas foi hidrolisada pela papaína.

5.1.3. Composição aminoacídica

O perfil de aminoácidos das proteínas de amaranto na farinha desengordurada, concentrado protéico e hidrolisados protéicos com Alcalase sem e com tratamento térmico prévio, bem como o escore químico estão apresentados na Tabela 3. Em relação à FDA, o CPA apresentou maior proporção relativa de alguns aminoácidos, principalmente ácido aspártico (31,5%), glicina (67,3%), arginina (24,7%) e leucina (40,4%) e menor de histidina (16,0%). Entretanto os hidrolisados protéicos (HPAst e HPAtt) apresentaram menor proporção relativa de todos os aminoácidos quando comparados ao CPA nativo, principalmente, serina (47,7 e 50,8% respectivamente), glicina (59,8 e 63,4%), lisina (50,9 e 56,4%) e histidina (54,8 e 59,5% respectivamente). A partir dos dados apresentados pode-se inferir que o tratamento térmico prévio, contribuiu para a redução no teor de todos os aminoácidos entre 3,8 a 14,8%, quando comparado ao HPAst, sendo a metionina+cisteína, arginina, ácido glutâmico e lisina, os aminoácidos que apresentaram maior perda decorrente do tratamento térmico prévio (14,8; 13,6; 12,5 e 11,1% respectivamente).

Tabela 3. Composição aminoacídica da farinha desengordurada, concentrado protéico e hidrolisados protéicos de *A. cruentus* (g de aminoácido/100 g proteína)

Aminoácido	FDA	EQ*	CPA	EQ	HPAst	EQ	HPAtt	EQ	Padrão FAO (1985)
Ac. Aspártico	7,3		9,6		5,7		5,2		
Treonina	3,0	0,9	4,1	1,2	2,5	0,8	2,3	0,7	3,4
Serina	6,1		6,5		3,4		3,2		
Ac. Glutâmico	16,0		17,6		10,4		9,1		
Glicina	4,9		8,2		3,3		3,0		
Alanina	3,8		4,5		2,6		2,5		
Valina	4,0	1,1	5,1	1,5	3,1	0,9	2,8	0,8	3,5
Metionina + Cisteína	2,8	1,1	3,2	1,3	2,7	1,1	2,3	0,9	2,5
Isoleucina	3,8	1,3	5,0	1,8	2,9	1,0	2,6	0,9	2,8
Leucina	5,2	0,8	7,3	1,1	4,5	0,7	4,1	0,6	6,6
Fenilalanina + Tirosina	6,8	1,1	9,6	1,5	5,8	0,9	5,4	0,8	6,3
Lisina	5,0	0,9	5,5	0,9	2,7	0,5	2,4	0,4	5,8
Histidina	5,0	2,7	4,2	2,2	1,9	1,0	1,7	0,9	1,9
Arginina	8,5		10,6		6,6		5,7		
Prolina	3,3		4,8		3,0		2,7		
Triptofano	ND		ND		ND		ND		1,1

* EQ – escore químico

Escudero *et al* (2004) reportaram para a farinha integral de amaranto maior teor de leucina (10,4%), lisina (38,2%) e metionina+cisteína (22,3%), que as obtidas no presente trabalho para a farinha desengordurada. A composição aminoacídica pode variar com o processo de obtenção da farinha. Marcílio *et al* (2003) relataram diferenças significativas entre a composição aminoacídica da farinha integral e da refinada do *A. cruentus* proveniente da Embrapa – Cerrados. Após o processo de refinamento, os autores relataram redução no teor de aminoácidos entre 39,6 a 67,2 %, sendo a histidina e ácido glutâmico os aminoácidos que apresentaram maior perda decorrente do processo de refinamento (67,2 e 50,0% respectivamente).

Gorinstein *et al* (2001) reportaram para farinha de *A. hypochondriacus* maiores teores de valina (37,0%), metionina+cisteína (17,6%), isoleucina (37,3%), leucina (51,0%)

e fenilalanina+tirosina (24,8%), quando comparado ao encontrado para a FDA no presente trabalho.

Para o concentrado protéico, Escudero *et al* (2004) reportaram maior teor de leucina (12,5%), lisina (22,9%) e serina (7,4%), sendo os teores dos demais aminoácidos inferiores ao deste trabalho. Diferenças no processo de obtenção do CPA podem levar à extração de diferentes frações protéicas e conseqüentemente diferenças no perfil aminoacídico. As albuminas são ricas em aminoácidos sulfurados, as globulinas em lisina e valina, enquanto as prolaminas são ricas em leucina, treonina e lisina e as glutelinas ricas em isoleucina, tirosina e fenilalanina (SEGURA-NIETO *et al*, 1992). Pela análise do perfil eletroforético, pôde-se observar maior proporção relativa de globulinas e glutelinas no CPA, o que pode justificar o maior teor de lisina, valina, isoleucina, tirosina e fenilalanina quando comparado à FDA.

O escore químico, calculado utilizando como referência as recomendações para aminoácidos essenciais da FAO (1985), indicou que, para a FDA, a treonina, leucina e lisina foram os aminoácidos limitantes (0,9; 0,8 e 0,9 respectivamente), enquanto que para o CPA, somente a lisina foi limitante (0,9). Escudero *et al* (2004) encontraram resultados semelhantes ao obtido para a FDA, mas tendo a valina e não a lisina como aminoácido limitante enquanto para o concentrado protéico nenhum aminoácido apareceu como limitante. Para o HPAsT além da lisina (0,5), já limitante no CPA nativo, a treonina (0,8), valina (0,9), leucina (0,7) e fenilalanina+tirosina (0,9) também apareceram como aminoácidos limitantes. Entretanto para o HPAsT todos os aminoácidos essenciais foram limitantes, sendo a lisina e a leucina os que apresentaram menor escore químico (0,4 e 0,6 respectivamente).

Tanto a FDA quanto o CPA e HPAsT são ricos em aminoácidos sulfurados (2,8; 3,2 e 2,7 g/100 g de proteína, respectivamente) quando comparados a cereais como aveia (2,0 g/100 g de proteína) e trigo (2,5 g/100 g de proteína), apresentando teores semelhantes ao arroz (3,4 g/100 g de proteína) e milho (3,1 g/100 g de proteína) (SGARBIERI, 1996).

Gorinstein *et al* (2001), reportaram menor teor de sulfurados na soja que no amaranto (0,7 e 3,4% respectivamente). Entretanto, Becker *et al* (1981), Breene (1991), Kim, Kim e Shin (2006a) e Martirosyan, Miroshnickenko e Kulakova (2007) relataram que as proteínas de amaranto são ricas em lisina (aminoácido limitante em cereais). Embora os teores de lisina no amaranto sejam superiores aos encontrados pela grande maioria dos cereais (arroz – 3,2 g/100 g de proteína, trigo – 2,7 g/100 g de proteína, aveia – 3,6 g/100 g de proteína, milho – 2,3 g/100 g de proteína), no presente trabalho este aminoácido foi considerado como limitante para todos os produtos avaliados (FDA, CPA, HPast e HPAtt). A presença destes aminoácidos seria de interesse visto que uma característica desejável nos alimentos de origem vegetal é a de possuir altos teores de lisina e metionina (MARCÍLIO *et al*, 2003).

5.2. Digestão *in vitro* das proteínas de amaranto

A digestão *in vitro* tem sido utilizada para avaliação da resistência de peptídeos, especialmente os que apresentam atividade antihipertensiva, à ação das enzimas gastrintestinais (VERMEIRSEN *et al*, 2003; VERMEIRSEN, VAN CAMP e VERSTRAETE, 2004). Segundo Vermeirssen, Van Camp e Verstraete (2004), barreiras no corpo humano, tais como a absorção intestinal e a degradação pelas peptidases séricas podem ativar ou inativar peptídeos bioativos, em especial aqueles com atividade antihipertensiva. Isto é de importância fisiológica porque após a administração oral, estes peptídeos devem atingir a corrente sanguínea na sua forma ativa para exercer sua atividade funcional (VERMEIRSEN *et al*, 2003; ROUFIK, GAUTHIER e TURGEON, 2006). Tendo-se em vista que o objetivo do presente trabalho foi estudar as atividades inibidora da ECA e ligante de ácidos biliares das farinhas, concentrados e hidrolisados protéicos do amaranto, estudou-se, nesta etapa do trabalho, o comportamento dos diversos produtos frente à digestão *in vitro*.

Na Tabela 4 estão apresentados o teor de proteína e GH dos CPast, CPAtt, HPast e HPAtt antes e após a digestão com as enzimas gastrintestinais. Os hidrolisados protéicos e

digeridos foram obtidos a partir de concentrados protéicos produzidos em três extrações diferentes no decorrer do trabalho, com teor de proteínas $61,6 \pm 5,35$.

Tabela 4. Grau de Hidrólise (GH) por TNBS dos CPA, HPAst e HPAtt antes e após a digestão com as enzimas gastrintestinais

Amostras	Teor de proteína (%)		GH por TNBS (%)	
	antes da digestão com pep*+panc**	após a digestão com pep*+panc**	antes da digestão com pep*+panc**	após a digestão com pep*+panc**
CPAst	$67,6 \pm 0,5$	$48,9 \pm 0,2$	-----	$26,2 \pm 0,7$
CPAtt	$60,3 \pm 0,7$	$49,9 \pm 0,2$	-----	$27,7 \pm 0,5$
HPAst	$65,7 \pm 0,4$	$55,8 \pm 1,0$	$16,6 \pm 1,2$	$28,2 \pm 0,3$
HPAtt	$58,1 \pm 0,9$	$52,1 \pm 0,5$	$16,5 \pm 0,1$	$27,4 \pm 0,0$

* pep – pepsina

** panc – pancreatina

Os teores de proteína tanto do CPA como dos hidrolisados determinados após a digestão com as enzimas gastrintestinais foram inferiores aos obtidos antes da digestão *in vitro*. Esta redução no teor de proteína das amostras deve-se à diluição causada pela adição de HCl e NaOH para ajuste do pH no processo de digestão *in vitro*. Pacheco, Amaya-Farfan e Sgarbieri (2002) também reportaram diminuição do teor protéico após hidrólise enzimática. De maneira geral, a digestão com as enzimas gastrintestinais foi efetiva, resultando em aumento do GH, indicando que houve hidrólise e peptídeos menores e/ou aminoácidos livres foram liberados. Os digeridos do CPA e de seus hidrolisados apresentaram GH semelhantes.

Os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE-Tricina) do CPA, hidrolisados protéicos e digeridos estão apresentados na Figura 9. O perfil do CPAst (coluna 2) é caracterizado pela presença de bandas bem definidas com pesos moleculares > 17 kDa, enquanto nos hidrolisados HPAst (coluna 3) e HPAtt (coluna 6) as bandas de PM $> 26,6$ kDa

desapareceram, indicando a completa hidrólise destas frações, ocorrendo a formação de duas bandas definidas com pesos moleculares entre 17 e 26,6 kDa. O HPAtt apresentou bandas com pesos moleculares na faixa de 17 a 26,6 kDa mais tênues que o HPAsT, sugerindo que o tratamento térmico prévio facilitou a hidrólise destas frações protéicas pela Alcalase. Ambos os hidrolisados com Alcalase, HPAsT e HPAtt, apresentaram peptídeos com peso molecular na faixa de 6,5 kDa (colunas 3 e 6).

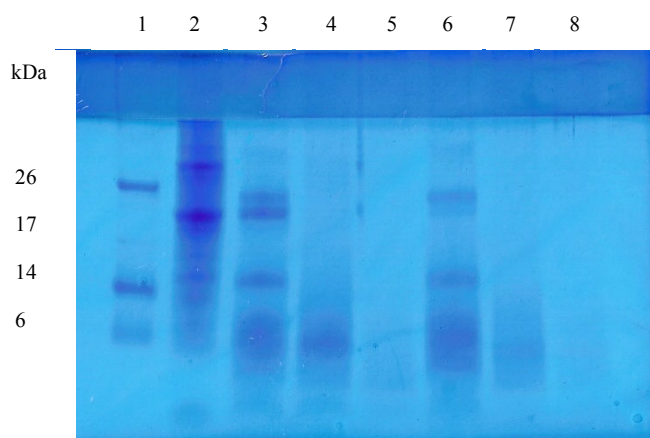


Figura 9. Eletroforese SDS-PAGE Tricina dos CPA, hidrolisados e digeridos protéicos de amarantho. Coluna 1 – padrões; coluna 2 – CPAsT; coluna 3 – HPAsT; coluna 4 – DCPAsT; coluna 5 – DHPAsT; coluna 6 – HPAtt; coluna 7 – DCPAtt; coluna 8 – DHPAtt.

As frações dos concentrados e dos hidrolisados com Alcalase de PM > 14,2 kDa foram totalmente digeridas pela pepsina e pancreatina. Os digeridos dos concentrados (DCPAsT e DCPAtt, colunas 4 e 7 respectivamente) apresentaram peptídeos com PM < 6,5 kDa, não havendo indicações de diferenças devido ao tratamento térmico prévio. Os digeridos dos hidrolisados (DHPAsT e DHPAtt, colunas 5 e 8 respectivamente), apresentaram uma banda tênue e dispersa na região de PM < 6,5 kDa. Os digeridos das proteínas intactas ou previamente hidrolisadas com Alcalase, embora com o mesmo GH, apresentaram perfis eletroforéticos diferentes, indicando a formação de peptídeos com características diversas.

Megias *et al* (2004) observaram, pelo perfil eletroforético, que as proteínas de girassol com PM > 16,9 kDa foram completamente hidrolisadas por ação da pepsina,

enquanto as frações de PM na faixa de 7,6 a 10,7 kDa foram resistentes à ação da pepsina. Entretanto, após a digestão com a pancreatina houve desaparecimento destas bandas anteriormente resistentes obtendo-se perfil com bandas de baixo peso molecular, semelhante ao observado no presente trabalho para as proteínas de amarantho.

Os cromatogramas dos concentrados, hidrolisados protéicos e os seus digeridos, obtidos por cromatografia de exclusão molecular, estão apresentados na Figura 10. No cromatograma do CPAst (Figura 10A), observa-se a presença de picos com peso molecular aparente entre 158 e 670 kDa, e grande concentração de picos entre 1,35 e 17 kDa enquanto que no cromatograma do CPAtt (Figura 10B) não foram observados picos de alto peso molecular. Estas frações, devido ao tratamento térmico prévio, formaram agregados insolúveis no tampão utilizado, não sendo mais detectadas. No CPAst, assim como foi observado para o CPAtt, há grande prevalência de picos de 1,35 a 17 kDa.

Nos cromatogramas dos hidrolisados e digeridos (Figura 10C-H) foi observado aumento dos picos de peso molecular $< 1,35$ kDa em relação ao observado para os CPA e o desaparecimento dos picos de alto peso molecular, indicando a eficiência da hidrólise e digestão realizadas. Os perfis dos DCPAst e DCPAtt (Figuras 10E-F) e dos hidrolisados após a digestão *in vitro*, DHPAst e DHPAtt (Figuras 10G-H), foram semelhantes com picos de peso molecular $< 1,35$ kDa mais bem resolvidos quando comparados aos hidrolisados antes da digestão, observando-se a presença de um pequeno pico no DHPAst e DHPAtt com aproximadamente 1,35 kDa.

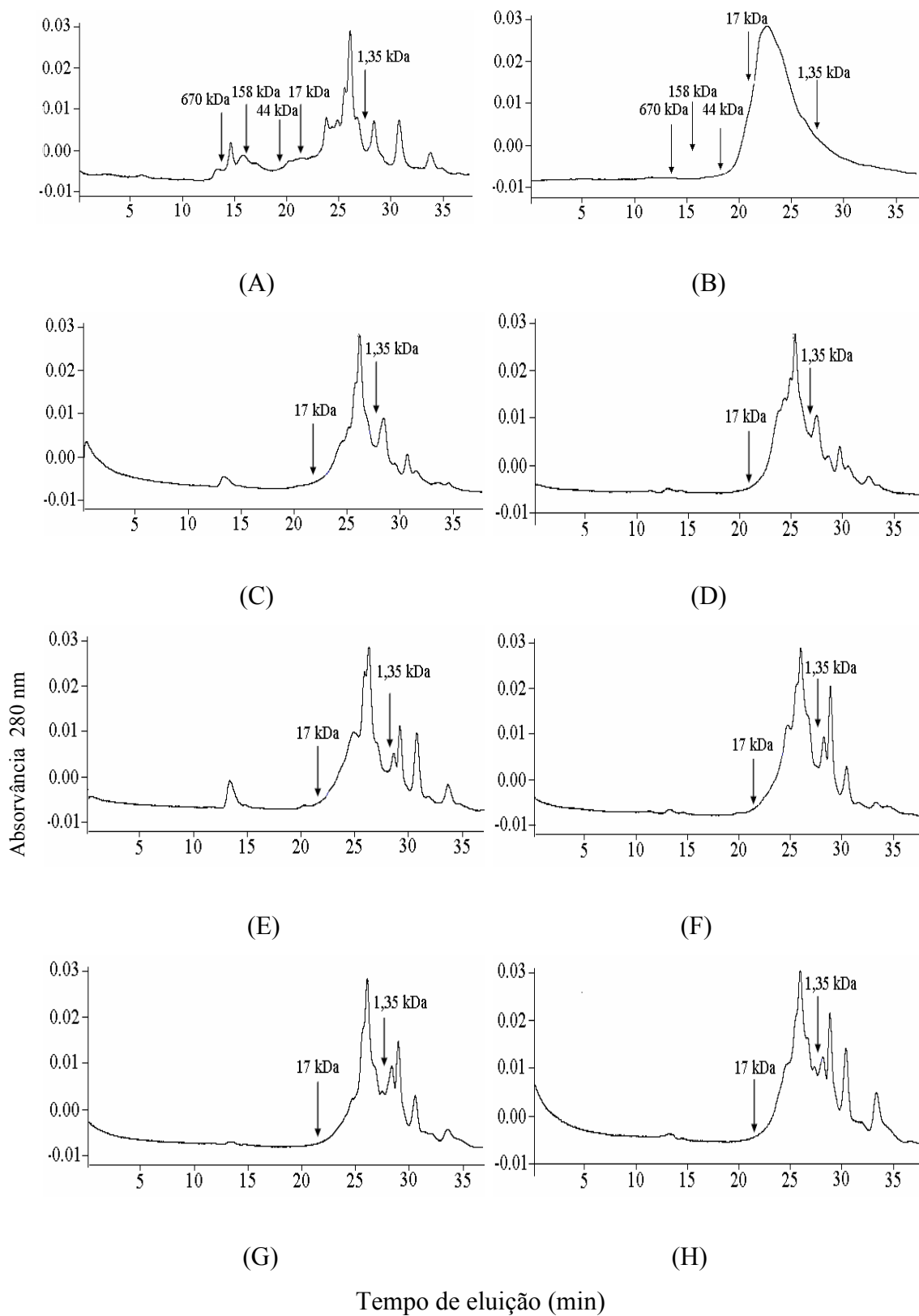


Figura 10. Cromatografia de exclusão molecular (CLAE-EM) do CPast (A), CPAtt (B), HPast (C), HPAtt (D), DCPast (E), DCPAtt (F), DHPast (G), DHPAtt (H).

Os perfis cromatográficos mostrados são apenas do material solúvel no tampão fosfato (0,05M, pH 6,8) utilizado como eluente. A solubilidade (%) dos diversos produtos estudados neste tampão foi diferente: $26,1 \pm 0,7$ para o CPAst, $35,5 \pm 0,6$ para o CPAtt, $75,8 \pm 0,8$ para o HPAst, $75,3 \pm 0,9$ para o HPAtt, $79,1 \pm 0,6$ para o DCPAst, $81,0 \pm 0,9$ para o DCPAtt, $79,1 \pm 0,5$ para o DHPAst e $80,0 \pm 0,8$ para o DHPAtt. A baixa solubilidade do CPAst indica que houve formação de agregados insolúveis, o que alterou o seu perfil cromatográfico, que é apenas da fração solúvel no eluente.

Os perfis obtidos por cromatografia de fase reversa (CLAE-FR) do CPAst, CPAtt, hidrolisados protéicos e digeridos estão apresentados na Figura 11. O CPAst (Figura 11A) apresentou picos na região I e um pico de maior intensidade, eluído aos 40 minutos, na região II, mais hidrofóbica. Já o CPAtt (Figura 11B), apresentou perfil diferente do CPAst na região I (mais hidrofílica), com menor número de picos, e na região II apresentou um pico de maior intensidade, eluído aos 35 minutos. Os hidrolisados e os digeridos (Figuras 11C-H) apresentaram inúmeros picos com tempo de eluição entre 15 e 30 minutos (região II), característicos da hidrólise enzimática.

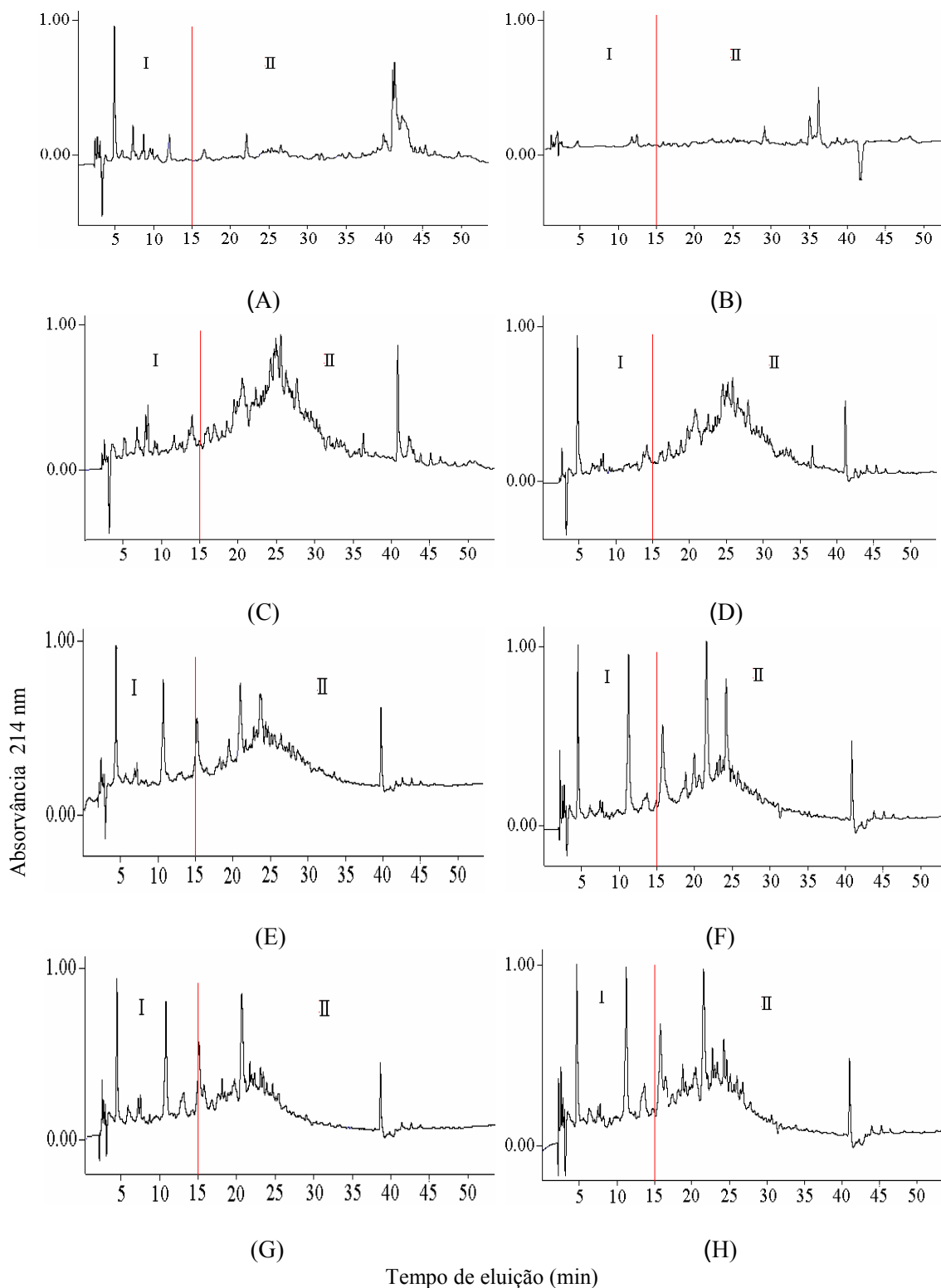


Figura 11. Perfil cromatográfico (CLAE-FR) do CPAst (A), CPAtt (B), HPAst (C), HPAtt (D), DCPAst (E), DCPAtt (F), DHPAst (G), DHPAtt (H).

Todos os digeridos (Figura 11C-H) apresentaram picos mais bem resolvidos na região II que os observados para os hidrolisados com Alcalase e novos picos eluídos aos 5 e 10 minutos, estes últimos produzidos por ação das enzimas gastrintestinais (pepsina e pancreatina). Os perfis dos digeridos dos concentrados sem e com tratamento térmico, mostraram poucas diferenças, corroborando com os resultados anteriores que indicaram que o tratamento térmico teve pouca influência no acesso das enzimas às proteínas, em decorrência de um tratamento térmico não efetivo ou uma desnaturação parcial, insuficiente para alterar a estrutura protéica o que facilitaria o acesso da enzima aos seus sítios de especificidade.

O perfil cromatográfico de fase reversa dos hidrolisados e digeridos mostrou diferenças nas características dos peptídeos liberados pelas diferentes enzimas utilizadas. Os hidrolisados HP Ast e HP Att (Figuras 11C-D) apresentaram maior concentração de picos na região II, mais hidrofóbica, quando comparado tanto aos seus digeridos (DHP Ast e DHP Att) como aos digeridos dos concentrados (DCP Ast e DCP Att). Observa-se nos perfis dos DCP Ast e DCP Att um pico de menor intensidade eluído entre 23 e 25 minutos, quando comparado aos hidrolisados e seus digeridos que apresentaram um pico de maior intensidade eluído ao redor de 20 minutos, o que sugere que a hidrólise prévia com a Alcalase modifica o padrão da digestão das proteínas de amaranto.

A partir dos resultados apresentados, verifica-se que tanto as proteínas intactas como as hidrolisadas com Alcalase sofreram ação das enzimas gastrintestinais. Os digeridos do CPA apresentaram perfis eletroforéticos e cromatográficos (CLAE-EM) diferentes, com presença de peptídeos de baixo peso molecular comparado aos hidrolisados com Alcalase, confirmado pela presença de novos picos na região mais hidrofílica observados na CLAE-FR.

5.3. Atividade inibidora da ECA *in vitro*

A Figura 12 apresenta os eletroforegramas dos produtos da reação entre a ECA e seu substrato sintético HHL sem inibição (Figura 12A), onde se observa a formação do produto da reação, o ácido hipúrico (AH). Na reação que houve a adição de um dos hidrolisados em diversas concentrações, neste caso o HPAsT, verificou-se redução da área do produto da reação (Figuras 12B-D), que foi proporcional à concentração do hidrolisado adicionado à reação. A quantidade de ácido hipúrico detectada reduziu com o aumento da concentração do hidrolisado, indicando a inibição da ECA pelo hidrolisado em estudo.

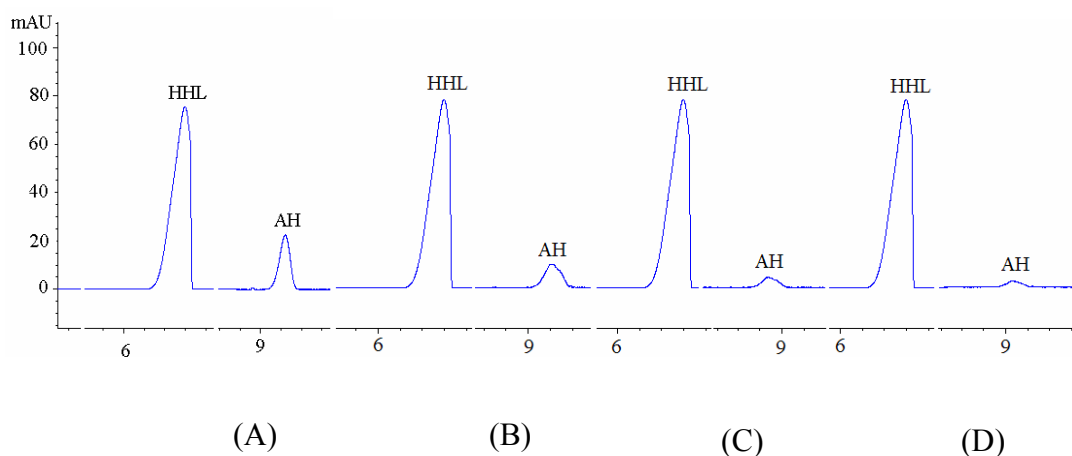


Figura 12. Eletroforegrama da reação entre a ECA e HHL sem inibição (A) e com inibição parcial induzida pela adição do HPAsT nas concentrações de 0,05 mg de proteína/mL (B), 0,5 mg de proteína/mL (C) e 1,0 mg de proteína/mL (D).

O valor IC_{50} foi determinado por análise de regressão do logaritmo da concentração do ácido hipúrico liberado na reação (área integrada no eletroforegrama) em função da concentração do hidrolisado adicionado à reação (Figura 13).

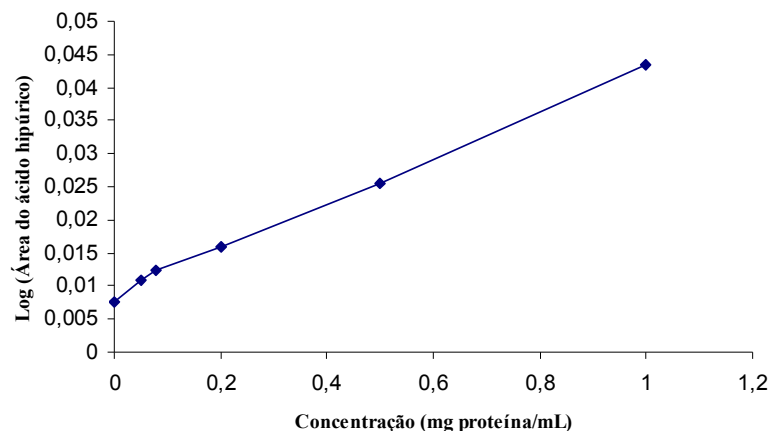


Figura 13. Regressão do logaritmo da área do ácido hipúrico em função da concentração do hidrolisado HPast. Os resultados correspondem à média dos valores obtidos em duplicata.

Os valores de IC_{50} dos hidrolisados protéicos de amaranto e de seus digeridos estão apresentados na Figura 14. Os hidrolisados protéicos e os digeridos apresentaram capacidade de inibir a ECA. A atividade inibidora da ECA do CPA não digerido apresentou valor de IC_{50} de 12 mg de proteína/mL, indicando que as proteínas intactas de amaranto não apresentam atividade.

Os DCPAst e DCPAtt apresentaram menor atividade inibidora da ECA (IC_{50} de 0,439 mg proteína/mL e 0,475 mg proteína/mL respectivamente) que os hidrolisados com Alcalase tanto antes como após a digestão gastrointestinal. Estes resultados podem ser um indicativo que, *in vivo*, a ingestão da proteína de amaranto intacta pode apresentar menor atividade inibidora da ECA quando comparada à ingestão da proteína previamente hidrolisada pela Alcalase.

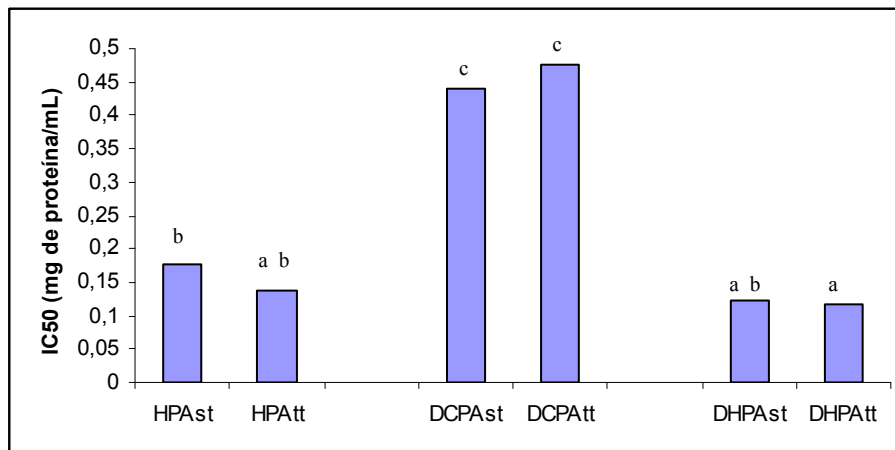


Figura 14. Valores de IC₅₀ obtidos para o concentrado protéico de amaranto sem e com tratamento térmico prévio submetido à hidrólise com Alcalase (HPAst e HPAtt), digestão *in vitro* (DCPAst e DCPAtt) e hidrolisado com alcalase após digestão *in vitro* (DHPAst e DHPAtt). Letras iguais indicam mesmo nível de significância e letras diferentes indicam diferença estatística $p < 0,05$.

Digeridos *in vitro* de proteínas de outras fontes apresentaram maior atividade inibidora da ECA que os da proteína de amaranto. Vermeirssen *et al* (2003) encontraram valores de IC₅₀ 0,076 mg/mL e 0,048 mg/mL para proteínas de ervilha e soro de leite, respectivamente, após digestão *in vitro*. Yang *et al* (2004) relataram atividade antihipertensiva de proteínas de folhas de espinafre digeridas e verificaram capacidade inibidora da ECA, com valores IC₅₀ 0,056 e 0,120 mg/mL para as proteínas digeridas por pepsina e pepsina-pancreatina, respectivamente.

Valores semelhantes aos encontrados para as proteínas de amaranto foram reportados para isolados protéicos de outras fontes. Lo e Li-Chan (2005) reportaram para isolados protéicos de soja digeridos com pepsina e pancreatina IC₅₀ 0,28 mg/ mL, após 3 horas de digestão. Yoshie-Stark *et al* (2004) relataram atividade inibidora da ECA em farinha de tremoço desengordurada e isolados protéicos obtidos em condições ácidas e neutras após a digestão *in vitro* com pepsina e pancreatina, valores de IC₅₀ 0,29 mg/mL, 0,21 mg/mL e 0,33 mg/mL respectivamente, sendo que o tremoço foi melhor inibidor da ECA que o isolado protéico de soja após digestão *in vitro*. Em outro estudo, Yoshie-Stark *et al* (2006) verificaram que o isolado protéico de canola após digestão com pepsina

apresentou valor IC_{50} 0,23 mg/mL, semelhante ao encontrado por Marczak *et al* (2003) para proteínas de canola, também digeridas com pepsina.

Os hidrolisados protéicos de amaranto, HPAst e HPAtt, obtidos sem e com tratamento térmico prévio do CPA, apresentaram IC_{50} semelhantes ($p > 0,05$), 0,176 mg proteína/mL e 0,138 mg proteína/mL, respectivamente. Estes resultados, em conjunto com a caracterização dos hidrolisados por eletroforese e CLAE, sugerem que o tratamento térmico prévio à hidrólise não afetou o padrão de peptídeos liberados.

A atividade inibidora da ECA dos hidrolisados HPAst e HPAtt foi semelhante à de hidrolisados de diferentes fontes obtidas com a mesma enzima. Yust *et al* (2003) reportou IC_{50} de 0,18 mg proteína/mL para hidrolisado de legumina, principal proteína do grão de bico. Pedroche *et al* (2002), também estudando proteínas hidrolisadas de grão-de-bico, relataram que a maior atividade inibidora da ECA foi obtida por ação da Alcalase quando comparado aos hidrolisados obtidos por ação da Flavourzyme. O hidrolisado com maior atividade inibidora foi caracterizado por CLAE-FR e posteriormente isolados quatro peptídeos com atividade inibidora da ECA, com valores IC_{50} 0,108 mg proteína/mL, IC_{50} 0,103 mg proteína/mL, IC_{50} 0,117 mg proteína/mL e IC_{50} 0,105 mg proteína/mL. Os valores IC_{50} relatados para os peptídeos isolados do hidrolisado de grão de bico, foram semelhantes aos obtidos para os hidrolisados de amaranto com Alcalase, sem qualquer tipo de fracionamento.

A escolha da enzima adequada é um passo fundamental para a obtenção de peptídeos com atividade inibidora da ECA. De acordo com Wu e Ding (2002), os inibidores preferenciais da ECA são os peptídeos que contêm aminoácidos dicarboxílicos na posição N-terminal além de resíduos de aminoácidos com cadeia ramificada, como a valina e isoleucina. Segundo Yust *et al* (2003), é desejável que no lado C-terminal dos peptídeos estejam presentes os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, triptofano, tirosina, fenilalanina e prolina. De acordo com Mullally, Meisel e FitzGerald (1997), dados relacionados à estrutura e à atividade sugerem que a carga positiva ou o grupo guanidino na porção C-

terminal também contribua substancialmente para a potência ECA-inibitória de vários peptídeos.

A Alcalase, protease alcalina capaz de liberar peptídeos com aminoácidos hidrofóbicos na cadeia C-terminal, vem sendo utilizada por grande parte dos pesquisadores na obtenção de hidrolisados protéicos com atividade inibidora da ECA (LI et al, 2005). É uma enzima de uso industrial, de baixa especificidade, que cliva preferencialmente os resíduos hidrofóbicos C-terminais e tem a vantagem de apresentar um baixo custo em relação à outras enzimas como pepsina, tripsina, quimotripsina, papaína e termolisina que têm sido utilizadas para preparação de peptídeos inibidores da ECA a partir de proteínas alimentares (LI et al, 2005).

Li *et al* (2005) verificaram que os hidrolisados obtidos por ação da Alcalase apresentaram maior atividade inibidora da ECA, valor IC_{50} 0,64 mg proteína/mL quando comparados aos hidrolisados obtidos com Neutrase. Chiang *et al* (2006) hidrolisaram isolado protéico de soja utilizando cinco enzimas proteolíticas, Alcalase, Flavourzyme, tripsina, quimotripsina e pepsina. Os resultados indicaram que os hidrolisados com Alcalase apresentaram maior atividade inibidora da ECA (0,668 mg de proteína/mL). As frações de $PM \leq 1$ e 10 kDa apresentaram valores de IC_{50} semelhantes, 0,080 e 0,078 mg de proteína/mL respectivamente. A fração de 30 kDa apresentou atividade inibidora semelhante a encontrada no presente trabalho (IC_{50} 0,129 mg de proteína/mL), cujo perfil de proteínas apresentou $PM < 26,6$ kDa.

Os hidrolisados protéicos com Alcalase sem e com tratamento térmico do CPA e seus digeridos, apresentaram as mais altas atividades inibitórias da ECA (IC_{50} de 0,118 a 0,176 mg de proteína/mL). A digestão *in vitro* não alterou a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados, sugerindo que os peptídeos inibidores da ECA liberados pela ação da Alcalase foram resistentes à hidrólise gastrintestinal. Os digeridos do CPA (DCPAst e DCPAtt) e hidrolisados (DHPAst e DHPAtt) mostraram pequenas diferenças nos cromatogramas

(CLAE-FR e CLAE-EM), sugerindo que os produtos após a digestão *in vitro* foram diferentes, o que poderia explicar em parte as diferentes atividades inibitórias.

A resistência à ação das enzimas gastrintestinais apresentada pelos hidrolisados após a digestão *in vitro*, é de grande importância, visto que para a utilização do hidrolisado ou peptídeo como alimento funcional, não é suficiente que este seja um potente inibidor da ECA. Para desempenhar o efeito antihipertensivo, o peptídeo precisa ser resistente à hidrólise pelas enzimas do trato gastrintestinal, ser absorvido e atingir a ECA que está localizada em diferentes tecidos, principalmente no plasma e no pulmão (MEISEL, 1998).

Assim como no presente trabalho, outros autores reportaram que a atividade inibidora da ECA de hidrolisados protéicos obtidos com proteases microbianas permanece inalterada após a digestão *in vitro*. A fração de menor peso molecular (< 5 kDa) de hidrolisado protéico de soja com Alcalase apresentou IC₅₀ 0,065 mg/mL e não sofreu alteração da sua atividade após a digestão *in vitro* (WU e DING, 2002).

Cha e Park (2005) verificaram que a atividade inibidora da ECA de hidrolisados de isolados protéicos de soja com a protease SS103, antes e após digestão *in vitro* com pepsina e pancreatina apresentou IC₅₀ 0,047 mg de proteína/mL e 0,051 mg de proteína/mL, respectivamente, sendo os peptídeos liberados por ação da protease SS103 resistentes à ação das enzimas gastrintestinais. Li *et al* (2006) observaram discreto aumento da atividade inibitória da ECA após a digestão *in vitro* de hidrolisados de feijão obtidos por ação da Alcalase, de 0,64 mg de proteína/mL para 0,56 mg de proteína/mL, 0,48 mg de proteína/mL e 0,51 mg de proteína/mL após digestão *in vitro* com pepsina, pancreatina e pepsina+pancreatina respectivamente.

Miguel *et al* (2006), ao contrário, ao simularem a digestão gastrintestinal de peptídeos com atividade inibidora da ECA derivados da ovoalbumina com pepsina e corolase PP, observaram redução da atividade inibidora da ECA após digestão. Segundo Costa, Gontijo e Netto (2007), a hidrólise pelas enzimas do trato gastrintestinal pode

resultar tanto na degradação de peptídeos com atividade inibidora da ECA quanto na formação de novos peptídeos com atividade antihipertensiva.

Faria (2006), estudando a atividade inibidora da ECA de diferentes hidrolisados comerciais (caseína, soro de leite, glúten de trigo e soja), observaram que a digestão *in vitro* com pepsina e pancreatina praticamente não alterou a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados do glúten de trigo (IC₅₀ 0,61 e 0,64 mg proteína/mL antes e após a digestão respectivamente) e soro de leite WE80BG (IC₅₀ 0,15 e 0,16 mg de proteína/mL antes e após a digestão respectivamente). Em hidrolisados de caseína (Hyprol 8502) e soro de leite (Hyprol 3301) houve uma discreta redução na atividade inibidora da ECA após a digestão *in vitro*, sendo estes hidrolisados os de menor peso molecular, segundo alguns autores os mais ativos. Os peptídeos inibidores da ECA podem ter sido degradados após a simulação da digestão *in vitro*.

As proteínas do amaranto apresentaram potencial para produção de hidrolisados com capacidade de inibir a enzima conversora da angiotensina, particularmente quando previamente hidrolisado com Alcalase, podendo ser indicativo da sua capacidade de inibir a ECA *in vivo*.

5.4. Atividade ligante de ácidos biliares

A ligação de ácidos biliares *in vitro* é utilizada como medida do potencial hipocolesterolemizante de alimentos por ser este o mecanismo de ação das fibras dietéticas e proteínas. É uma metodologia mais barata e mais rápida do que a realização de experimentos *in vivo* (CAMIRE, ZHAO e VIOLETTE, 1993). A análise da atividade ligante da FDA, CPA, RA e HPast foi realizada com quatro ácidos biliares (AB): ácidos cólico, taurocólico, deoxicólico e glicocólico, separadamente. O HPast não foi avaliado pois, de acordo com as análises de caracterização por eletroforese SDS-PAGE e CLAE, os hidrolisados obtidos com tratamento térmico prévio do CPA não diferiram do HPast.

As curvas padrão para todos os AB estudados apresentaram-se bastante semelhantes, conforme apresentado na Figura 15.

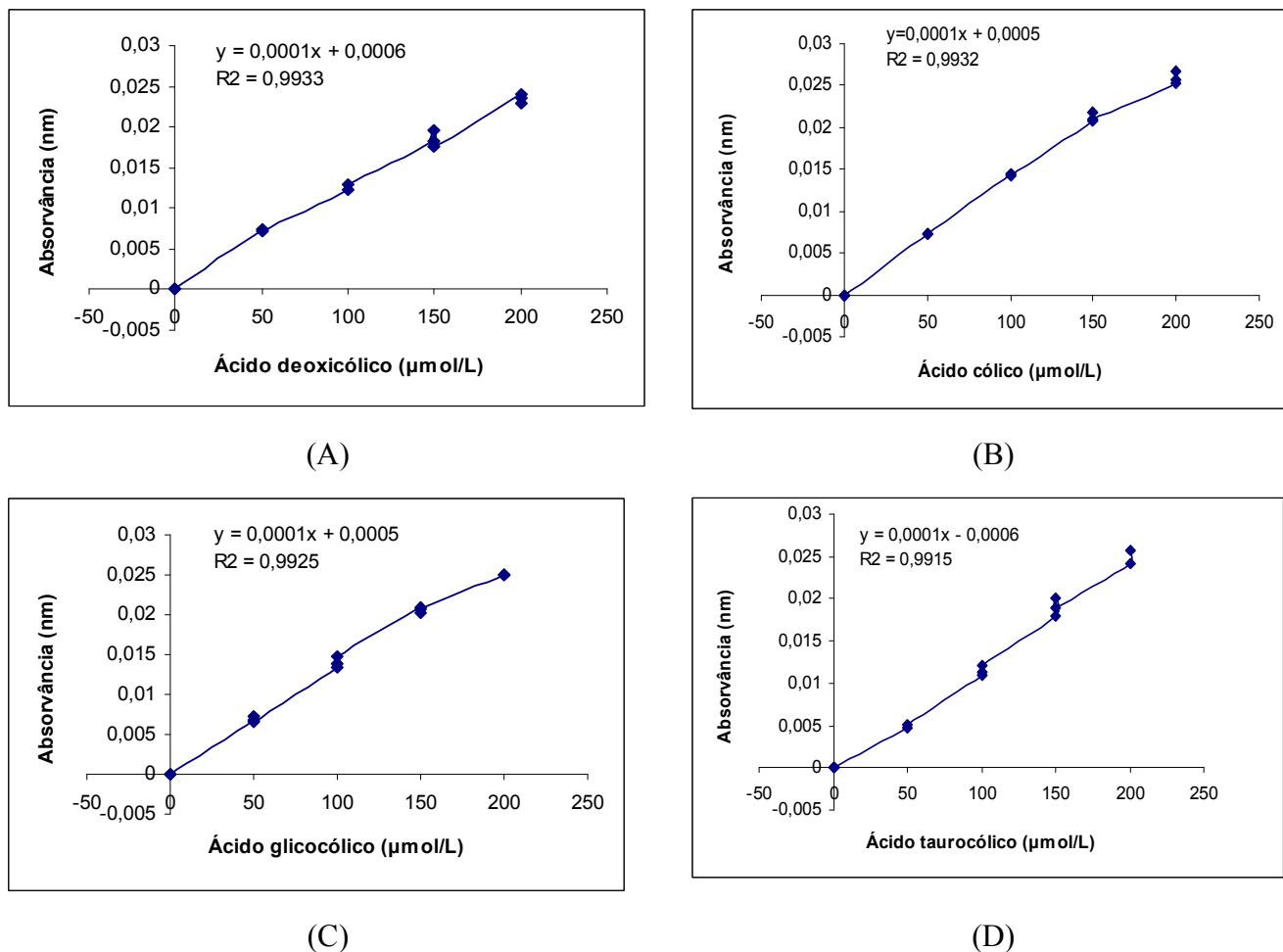
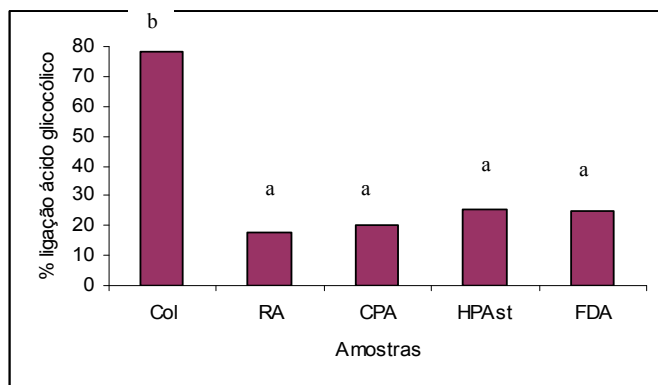


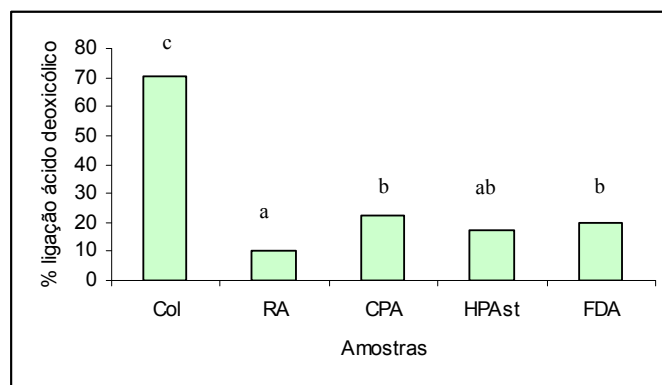
Figura 15. Curva padrão dos ácidos biliares ($\mu\text{mol/L}$): ácido deoxicólico (A), ácido cólico (B), ácido glicocólico (C) e ácido taurocólico (D). Os resultados correspondem à média dos valores obtidos em triplicata.

Os resultados da atividade ligante de AB estão apresentados na Figura 16. A propriedade ligante dos produtos de amarantho e da colestiramina, utilizada como controle positivo, foi diferente em função do ácido biliar estudado, fato também reportado por Yoshie-Stark e Wäsche (2004) para isolados e hidrolisados protéicos de tremoço e de soja.

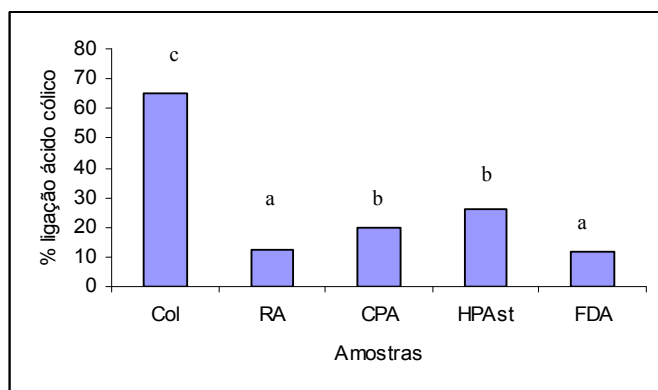
A colestiramina apresentou a maior atividade ligante para todos os AB testados, diferenciando-se de todas as amostras ($p < 0,05$). A maior atividade ligante da colestiramina foi com o ácido glicocólico (78,2%), fato também reportado por Camire e Dougherty (2003). Yoshie-Stark e Wäsche (2004), ao contrário, observaram baixa capacidade ligante dos ácidos glicocólico e taurocólico pela colestiramina (25,0% e 25,7% respectivamente).



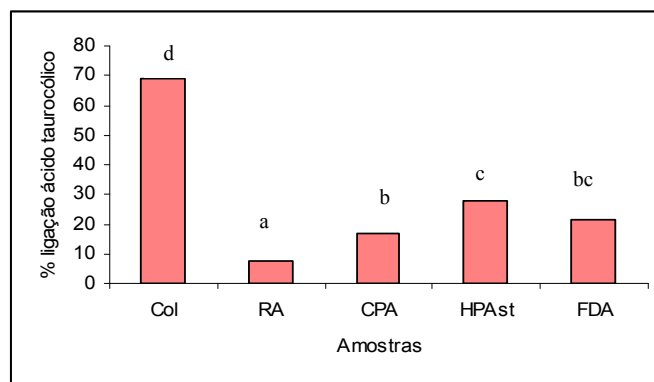
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 16. Ligação dos ácidos glicocólico (A), deoxicólico (B), cólico (C) e taurocólico (D) pela colestiramina (Col), RA, CPA, HPA e FDA. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A ligação dos ácidos biliares pelas fibras dietéticas, principalmente as solúveis, e o conseqüente aumento da sua excreção fecal, têm sido considerados como um possível mecanismo da redução do colesterol plasmático (GRAJETA, 1997 *apud* GRAJETA, 1999;

KAHLON e SHAO, 2004; KAHLON, SMITH e SHAO, 2005; KAHLON, CHAPMAN e SMITH, 2007a; DONGWSKI, 2007). O RA, que é o produto mais rico em fibras (8,6%), no entanto, apresentou menor atividade que os demais produtos, porém sem diferença estatística em relação ao HPAsT para o ácido deoxicólico e à FDA, em relação ao cólico. Em relação ao ácido glicocólico, não houve diferença de atividade entre os diversos produtos estudados ($p>0,05$). Destaca-se, no entanto, que as comparações sofreram com a maior variabilidade dos resultados obtidos com o RA para todos os ácidos, devido, possivelmente, a alguma heterogeneidade da amostra.

A FDA, com o maior teor de fibras solúveis (1,1%), apresentou a maior atividade ligante com os ácidos taurocólico e deoxicólico. Entretanto, a capacidade de ligação do HPAsT e CPA, que têm menor teor de FAS que a FDA, não diferiu significativamente da FDA ($p>0,05$), sugerindo que outros componentes presentes também podem ser responsáveis pela capacidade ligante de ácidos biliares. Estes resultados estão em desacordo com Grajeta 1997 (*apud* GRAJETA, 1999), que atribuiu à fração solúvel das fibras dietéticas presente nas farinhas de amaranto integral e desengordurada a significativa redução da concentração de colesterol no sangue e no fígado de ratos, em decorrência da sua maior concentração quando comparado ao teor de tocotrienóis e tocoferóis presentes no óleo de amaranto.

Camire e Dougherty (2003) estudaram a capacidade ligante de AB das fibras de três tipos de uva passa e farelo de trigo. O farelo de trigo apresentou menor capacidade ligante para todos os AB que as uvas passa, exceto para o deoxicólico, devido, segundo os autores, ao seu maior teor de FAI, pois a ligação dos ácidos biliares ocorre principalmente pelas fibras dietéticas solúveis. A uva passa com maior teor de FAS (1,8%) apresentou a maior capacidade ligante para os ácidos glicocólico e taurocólico. Resultado semelhante a este foi observado para a FDA com maior teor de FAS e maior capacidade ligante para os ácidos deoxicólico e taurocólico.

A ligação de ácidos biliares por proteínas também tem sido relatada na literatura, os mecanismos propostos de ação incluem a redução da absorção de colesterol ou de ácidos biliares. Alguns autores relatam que as proteínas também são capazes de modificar o metabolismo hepático de colesterol e lipoproteínas (KAHLON e WOODRUFF, 2002; HIGAKI et al, 2006).

O HPAsT, dentre os produtos estudados, apresentou o maior teor de proteínas (65,7%), seguido pelo CPA (58,3%), FDA (13,2%) e RA (7,0%). A atividade ligante da FDA foi intermediária para todos os AB testados, porém sem diferença significativa da atividade do CPA com o ácido deoxicólico e do HPAsT com o ácido taurocólico, que apresentaram as maiores atividades. O HPAsT apresentou maior atividade ligante com ácidos taurocólico e cólico, embora semelhantes a FDA e CPA, respectivamente. A partir dos resultados obtidos não pode-se afirmar que a proteína é o principal componente responsável por esta atividade, visto que a FDA embora com menor teor de proteínas comparado ao HPAsT, apresentou capacidade ligante semelhante para o ácido taurocólico.

A capacidade ligante apresentada pelo CPA e HPAsT (17,0-26,4%) foi inferior ao reportado por Yoshie-Stark e Wäsche (2004) para isolado protéico de tremoço extraído em condições ácidas e seus digeridos para todos os AB testados (40,9 – 68,0%), porém semelhante à de isolados e digeridos de proteína da soja para os ácidos deoxicólico e cólico, mas superior para os ácidos glicocólico e taurocólico.

O HPAsT, com exceção para o ácido deoxicólico, apresentou maior atividade ligante que o CPA, embora apenas significativa em relação ao ácido taurocólico. A principal diferença entre estes dois produtos é a hidrólise das proteínas com a Alcalase, sugerindo que a hidrólise prévia à digestão pode liberar peptídeos com maior capacidade ligante de ácidos biliares, especificamente o taurocólico. Como, diferentemente das fibras, as proteínas alimentares não são resistentes à digestão gastrintestinal, a capacidade ligante de AB da FDA, CPA e HPAsT pode estar relacionada também à liberação de peptídeos pela

atividade enzimática da pancreatina. Higaki *et al* (2006) verificaram que peptídeos liberados na digestão *in vitro* da proteína de soja estimularam a excreção fecal de esteróides.

Kahlon e Woodruff (2002) reportaram maior excreção de ácidos biliares e redução do conteúdo de colesterol hepático em hamsters alimentados com proteínas de soja quando comparado aos animais alimentados com caseína. Os resultados encontrados por Kahlon e Woodruff (2002), corroboram com os reportados por Carroll e Kurowska (1995) e Sugano, Ishiwaki e Nakashime (1984) que atribuíram efeito redutor do colesterol à composição aminoacídica das proteínas alimentares. Giroux, Kurowska e Carroll (1999) verificaram que as proteínas de origem animal apresentam teores mais elevados de lisina e metionina, aminoácidos responsáveis por um efeito hipercolesterolêmico elevado, enquanto às proteínas vegetais, que apresentam teores mais elevados de arginina, credita-se efeito hipocolesterolêmico. Tanto a FDA quanto o CPA têm alto teor de arginina, 8,6 e 10,6 g/100 g de proteína, respectivamente (Tabela 3), o que pode explicar, ao menos em parte, sua capacidade ligante com a maioria dos AB testados e possivelmente um efeito hipocolesterolemia *in vivo*.

Alta concentração de ácidos biliares secundários, deoxicólico e litocólico, podem causar inflamação intestinal (YOSHIE-STARK e WÄSCHE, 2004) e acredita-se estarem envolvidos no aumento do risco para câncer colorretal (KAHLON, CHAPMAN e SMITH, 2007a; KAHLON, CHAPMAN e SMITH, 2007b). Seria de grande interesse que o amaranto e os diversos produtos já estudados quanto à capacidade ligante de ácidos biliares, apresentassem maior capacidade ligante para os ácidos biliares secundários, a fim de evitar o acometimento da mucosa intestinal.

Considerando-se o AB secundário estudado, o ácido deoxicólico, observa-se que a FDA e CPA apresentaram as maiores atividade ligantes (19,9 e 22,5% respectivamente) diferindo-se estatisticamente do RA que ligou apenas 10,3% deste ácido. Yoshie-Stark e Wäsche (2004) relataram para o isolado protéico de tremço extraído em condições neutras (isolado protéico insolúvel em ácido) e seus digeridos, assim como o isolado e digeridos de

soja, capacidade ligante de ácido deoxicólico (12,8 – 19,5% e 12,6 e 15% respectivamente) semelhante ao encontrado para a FDA e CPA.

Capacidade ligante de ácidos biliares secundários (ácido deoxicólico) inferiores ao apresentado neste trabalho pelos produtos de amaranto foi reportada por alguns autores. Story e Krichevsky (1976) reportaram para a alfafa (10,4%) valores próximos ao encontrado para o RA, assim como Camire e Dougherty (2003) para a uva passa natural e em calda (5,0-10,0%). Para o farelo de trigo (CAMIRE e DOUGHERTY, 2003) e para a batata (CAMIRE, ZHAO e VIOLETTE, 1993) foram reportados valores próximos ao encontrado para o HPast e FDA, sendo 15,0% para o farelo de trigo e 10,6 – 18,9% para a batata.

Devido à dificuldade em se estabelecer quais os componentes estão realmente envolvidos na atividade ligante de ácidos biliares, diversos trabalhos relatam que a atividade ligante de AB pode estar relacionada ao conteúdo de fitonutrientes (flavonóides, catequinas, polifenóis, etc...), frações hidrofóbicas não digeridas e/ou metabólitos aniônicos ou catiônicos produzidos durante o processo digestivo. Neste contexto, Kahlon, Smith e Shao (2005) verificaram a capacidade ligante de ácidos biliares por farinhas de diversas variedades de feijão *Phaseolus vulgaris*, *Vigna mungo*, *Cicer arietinum* e *P. aconitifolius*, utilizando uma mistura de ácidos biliares. Os pesquisadores utilizaram a colestiramina como controle positivo e a celulose (fibra não ligadora de ácidos biliares) como controle negativo. Todas as variedades de feijão apresentaram capacidade ligante de ácidos biliares, porém inferior à apresentada pela colestiramina. A capacidade de ligação das amostras variou de 2,5 a 6,7 %. *Vigna mungo* apresentou a maior capacidade ligante de ácidos biliares diferindo-se estatisticamente das demais amostras. A celulose ligou apenas 1,5% da mistura de ácidos biliares, capacidade inferior à encontrada para as todas as amostras analisadas. Kahlon e Shao (2004) reportaram para a soja baixa capacidade ligante de ácidos biliares (1,9%), semelhante à encontrada para a celulose (1,5%). A maior capacidade ligante de ácidos biliares foi verificada pelo grão de bico (10,0%) quando comparado à outras leguminosas.

Os resultados apresentados demonstram que os produtos de amaranto apresentaram capacidade ligante de ácidos biliares, incluindo ácidos biliares secundários tóxicos à mucosa intestinal. No entanto, não foi possível, a partir dos resultados obtidos, afirmar se foram as proteínas, as fibras ou eventualmente outro componente não avaliado, ou mesmo a combinação destes componentes, o principal responsável por esta atividade.

6. CONCLUSÃO

O tratamento térmico prévio realizado no concentrado protéico não alterou o padrão de ação das enzimas utilizadas no presente trabalho, como a pepsina e pancreatina utilizadas na avaliação da digestão *in vitro*, evidenciado pelos perfis cromatográficos semelhantes dos digeridos. Entretanto, a hidrólise com a Alcalase, modificou o padrão da digestão das proteínas de amaranto, produzindo digeridos diferentes daquele obtido sem ação da Alcalase, conforme evidenciado por pequenas diferenças nos perfis cromatográficos (CLAE-FR e CLAE-EM).

Os hidrolisados protéicos com Alcalase bem como seus digeridos e os digeridos do CPA apresentaram atividade inibidora da ECA. No entanto, os hidrolisados protéicos com Alcalase antes e após a digestão *in vitro* apresentaram as maiores atividades inibidoras, sugerindo que a Alcalase libera peptídeos com atividade inibidora da ECA, que não é afetada pela digestão com as enzimas gastrintestinais. Os resultados sugerem que, *in vivo*, a ingestão da proteína de amaranto intacta pode apresentar menor atividade inibidora da ECA quando comparada à ingestão da proteína previamente hidrolisada com Alcalase.

Os produtos de amaranto apresentaram capacidade ligante de ácidos biliares, incluindo ácidos biliares secundários tóxicos à mucosa intestinal. No entanto, não foi possível, a partir dos resultados obtidos, afirmar se foram as proteínas, as fibras ou eventualmente outro componente não avaliado, ou mesmo a combinação destes componentes, o responsável por esta atividade.

Com a comprovação das atividades inibidora da ECA e ligante de ácidos biliares *in vitro*, sugere-se a realização de estudos *in vivo*, sendo o experimento *in vivo* um método mais confiável para avaliar a atividade biológica das proteínas de amaranto e demais componentes.

Embora o amaranto ainda seja pouco comercializado em alguns países, no Brasil, a produção de amaranto é promissora. A Embrapa-Cerrados tem trabalhado no desenvolvimento e propagação desta cultura, que pode ser uma alternativa para a agricultura de regiões sujeitas à seca. O presente trabalho fornecerá subsídios que poderão levar à ampliação da utilização do amaranto como ingrediente funcional, incentivando e agregando valor a esta cultura, 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**, v. 27, n.6, p. 1256-1262, 1979.

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

AOAC. Association of official methods analytical chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemistry**. 16 ed. Arlington: AOAC, 1995.

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

BECKER, R.; WHEELER, E.L.; LORENZ, K.; STAFFORD, A.E.; GROSJEAN, O.K.; BETSCHART, A.A.; SAUNDERS, R.M. A compositional study of Amaranth grain. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 4, p. 1175-1180, 1981.

BELLO, J. Los alimentos funcionales o nutraceuticos. I Nueva gama de productos en la industria alimentaria. **Alimentaria**, v. 32, n. 265, p. 25-30,1995.

BERGANZA, B.E.; MORAN, A.W.; RODRIGUEZ, G.M.; COTO, N.M.; SANTAMARIA, M.; BRESSANI, R. Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 58, n. 1, 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 oil in hamsters. **Food Chemistry**, 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.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, v. 37, n. , p. 911-917, 1959.

BRAUNWALD, E. Shattuck Lecture – cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. **New England Journal Medicine**, v. 337, n. p.1360-9, 1997.

BREENE, W.M. Food uses of grain amaranth. **Cereal Food World**, v. 36, n. 5, p. 426-430, 1991.

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

BRESSANI, R.; GARCÍA-VELA, L.A. Proteins fractions in amaranth grain and their chemical characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 1205-1209, 1990.

BYUN, H. G.; KIM, S. K. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 12, p. 1155-1162, 2001.

CAMIRE, M.E.; ZHAO, J.; VIOLETTE, D.A. *In vitro* binding of bile acids by extruded potato pells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 2391-2394, 1993.

CAMIRE, M.E.; DOUGHERTY, M.P. Raisin dietary fiber composition and in vitro bile acid binding. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 834-837, 2003.

CARROLL, K.K.; KUROWSKA, E.M. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 3, p. 594S-597S, 1995.

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

CASTRO, R.A.A.; MONCAU, J.E.C.; MARCOPITO, L.F. Prevalência de hipertensão arterial sistêmica na cidade de Formiga, MG. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 3, p. 334-339, 2007.

CHA, M.; PARK, J.R. Production and characterization of a soy protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysate. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 3, p. 305-310, 2005.

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

CHÁVEZ-JÁUREGUI, R.N.; SILVA, M.E.M.P.; ARÊAS, J.A.G. Extrusion cooking process for amaranth (*Amaranthus caudatus* L.). **Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, p. 1009-1015, 2000.

CHIANG, W.D.; TSOU, M.J.; TSAI, Z.Y.; TSAI, T.C. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 725-732, 2006.

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.

CHOI, Y.S.; CHO, S.H.; KIM, H.J.; LEE H.J. Effects of soluble dietary fibers on lipid metabolism and activities of intestinal disaccharidases in rats. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, v. 44, n. 5, p. 591-600, 1998.

CONROY, J.M.; LAI, C.Y. A rapid and sensitive fluorescence assay for angiotensin-converting enzyme. **Analytical Biochemistry**, v. 87, n. 2, p. 556-561, 1978.

CORREA, D.A.; JOKL, L.; CARLSSON, R. Amino acid composition of some *Amaranthus sp* grain proteins and fractions. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 36, n. 3, p. 466-476, 1986a.

CORREA, D.A.; JOKL, L.; CARLSSON, R. Chemical constituents, *in vitro* protein digestibility and presence of antinutritional substances in Amaranth grains. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 36, n. 2, p. 319-326, 1986b.

COSTA, E.L.; NETTO, F.M.; SILVA, V.S.N. Determinations of angiotensin-converting enzyme activity (ACE) by capillary electrophoresis. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 2, p. 49-49, 2003.

COSTA, E. L. Efeito do processamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados do isolado protéico do soro de leite com atividade anti-hipertensiva. **Tese de Doutorado em Alimentos e Nutrição** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

COSTA, E. L.; ALMEIDA, A. R.; NETTO, F. M.; GONTIJO, J. A. R. Effect of intraperitoneally hydrolysed whey protein on blood pressure and renal sodium handling in awake spontaneously hypertensive rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 12, p. 1817-1824, 2005.

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.

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

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

DE BIASE, S.G.; CARROCHA, S.F.; GIANINI, R.J.; DUARTE, J.L.G. Dieta vegetariana e níveis de colesterol e triglicérides. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 1, p. 35-39, 2007.

DIETSCHY, J.M. Theoretical considerations of what regulates low-density-lipoprotein and high-density-lipoprotein cholesterol. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n.5S, p. 1581S-1589S, 1997.

DONGWSKI, G. Interactions between dietary fibre-rich preparations and glycoconjugated bile acids in vitro. **Food Chemistry**, v.104, n. 1, p. 390-397, 2007.

DRZIKOVA, B.; DONGOWSKI, G.; GEBHARDT, E.; HABEL, A. The composition of dietary fiber-rich extrudates from oat affects bile acid binding and fermentation in vitro. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 181-192, 2001.

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

ESTERBAUER, H. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, n. 4, p. 341-390, 1992.

FARIA, M. Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade anti-hipertensiva de hidrolisados comerciais de diversas fontes protéicas. **Dissertação de Mestrado em Alimentos e Nutrição** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

FIDANTSI, A.; DOXASTAKIS, G. Emulsifying and foaming properties of amaranth seed proteins isolates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 21, n. 1-3, p. 119-124, 2001.

FRANCA, E.; ALVES, J.G.B. Dislipidemia entre crianças e adolescentes de Pernambuco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. 722-727, 2006.

FUCHS, S. C.; CASTRO, M. S.; FUCHS, F. C. Adesão ao tratamento anti-hipertensivo. **Hipertensão**, v.7, n. 3, p. 90-93, 2004.

FUJITA H.; YOKOYAMA; K.; YASUMOTO, R.; YOSHIKAWA, M. Antihypertensive effect od thermolysin degest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 1, n. , p. 304-305, 1995.

FUJITA, H.; YOKOYAMA, K.; YOSHIKAWA, M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 4, p. 564-569, 2000.

GAMEL, T.H.; LINSSEN, 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 Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 2, p. 319-327, 2005.

GIBBS, B. F.; ZOUGMAN, A.; MASSE, R.; MULLIGAN, C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Research International**, v. 37, n. 2, p. 123-131, 2004.

GIROUX, I.; KUROWSKA, E.M.; CARROLL, K.K. Role of dietary lysine, methionine and arginine in the regulation of hypercholesterolemia in rabbits. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, n. 3, p. 166-171, 1999.

GORINSTEIN, S.; DELGADO-LICON, E.; PAWELZIK, E.; PERMADY, H.H.; WEISZ, M.; TRAKHTENBERG, S. Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, amino acid analysis, circular dichroism and differential scanning calorimetry measurements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5595-5601, 2001.

GRAJETA, H. Effect of amaranth and oat bran on rat lipids. **Nahrung**, v. 43, n. 2, p. 114-117, 1999.

GUERRA-MATIAS, A.; ARÊAS, J.A.G. Glycemic and insulinemic responses in women consuming extruded amaranth (*Amaranthus cruentus* L). **Nutrition Research**, v. 25, n. 9, p. 815-822, 2005.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 10ed. Philadelphia: Saunders, 2001. 1064p.

HAYASHI, R.; KAMEDA, I. Decreased proteolysis of alkali-treated protein: consequences of racemization in food processing. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 5, p. 1430-1431, 1980.

HE, H.P.; CORKE, H. Oil and Squalene in *Amaranthus* grain and leaf. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 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**, v. 46, n. 8, p. 3009-3015, 1998.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; RAMOS, M.; AMIGO, L. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 10, p. 805-812, 2002.

HIGAKI, N.; SATO, K.; SUDA, H.; SUZUKA, T.; KOMORI, T.; SAEKI, T.; NAKAMURA, Y.; OHTSUKI, K.; IWAMI, K.; KANAMOTO, R. Evidence for the existence of a soybean resistant protein that captures bile acid and stimulates its fecal excretion. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 12, p. 2844-2852, 2006.

HUGHES, J.S. Potential contribution of dry bean dietary fiber to health. **Food Technology**, v. 45, n. 9, p. 122-126, 1991.

KAHLON, T.S.; WOODRUFF, C.L. In vitro binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten. **Food Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 425-429, 2002.

KAHLON, T.S.; SHAO, Q. In vitro binding of bile acids by soy bean (*Glycine max*), black eye bean (*Vigna unguiculata*), garbanzo (*Cicer arietinum*) and lima bean (*Phaseolus lunatus*). **Food Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 435-440, 2004.

KAHLON, T.S.; SMITH, G.E.; SHAO, Q. In vitro binding of bile acids by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*), black gram (*Vigna mungo*), Bengal gram (*Cicer arietinum*) and moth bean (*Phaseolus aconitifolius*). **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 241-246, 2005.

KAHLON, T.S.; SMITH, G.E. In vitro binding of bile acids by bananas, peaches, pineapple, grapes, pears, apricots and nectarines. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1046-1051, 2007a.

KAHLON, T.S.; SMITH, G.E. In vitro binding of bile acids by blueberries (*Vaccinium* spp), plums (*Prunus* spp.), prunes (*Prunus* spp.), strawberries (*Fragaria x ananassa*), cherries (*Malpighia puniceifolia*), cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and apples (*Malus sylvestris*). **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1182-1187, 2007b.

KAHLON, T.S.; CHAPMAN, M.H.; SMITH, G.E. In vitro binding of bile acids by spinach, kale, brussels, sprouts, broccoli, mustard greens, green bell pepper, cabbage and collards. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1531-1536, 2007a.

KAHLON, T.S.; CHAPMAN, M.H.; SMITH, G.E. In vitro binding of bile acids by okra, beets, asparagus, eggplant, turnips, green beans, carrots and cauliflower. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 676-680, 2007b.

KALAPATHY, U.; HETTIARACHCHYN, N.S.; RHEE, K.C. Effect of drying methods on molecular properties and functionalities of disulfide bond-cleaved soy proteins. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 74, n. 3, p. 195-199, 1997.

KAMAL-EDIN, A.; APPELQVIST, L.A. The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols. **Lipids**, v. 3, n. 7, p. 671-701, 1996.

KAPEL, R.; CHABEAU, A.; LESAGE, J.; RIVIERE, G.; RAVALLEC-PLE, R.; LECOUTURIER, D.; WARTELLE, M.; GUILLOCHON, D.; DHULSTER, P. Production in continuous enzymatic membrane reactor, of an anti-hypertensive hydrolysate from an industrial alfalfa white protein concentrate exhibiting ACE inhibitory and opioid activities. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 120-126, 2006.

KIM, S. K.; BYUN, H. G.; PARK, P. J.; SHAHIDI, F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skim gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p.2992–2997, 2001.

KIM, H.K.; KIM, M.J.; SHIN, D.H. Improvement of lipid profile by amaranth (*Amaranthus esculantus*) supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 50, n. 3, p. 277-281, 2006a.

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**, v. 24, n. , p. 195-199, 2006b.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 15, p. 685-689, 1970.

LEENA, S.; JAUHAINEN, T.; POUSSA, T.; KORPELA, R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure – lowering effect in hypertensive subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 2, p. 326-330, 2003.

LEHMANN, J.W.; PUTNAM, D.H.; QURESHI, A.A. Vitamin E isomers in grain Amaranths (*Amaranthus* spp.). **Lipids**, v. 29, n. 3, p. 177-181, 1994.

LEHMANN, J.W. Case history of grain amaranth as an alternative crop. **Cereal Food World**, v. 41, n. 5, p. 399-411, 1996.

LESSA, I.; MAGALHÃES, L.; ARAÚJO, M.J.; FILHO, N.A.; AQUINO, E.; OLIVEIRA, M.M.C. Hipertensão arterial na população adulta de Salvador (BA) – Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. 747-756, 2006.

LI, G.H.; LE, G.W.; SHI, Y.H.; SHRESTHA, S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. **Nutrition Research**, v. 24, n. 7, p. 469-484, 2004.

LI, G.H.; LE, G.W.; LIU, H.; SHI, Y.H. Mung-bean protein hydrolysates obtained with Alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 4, p. 281-287, 2005.

LI, G.H.; SHI, Y.H.; LIU, H.; LE, G.W. Antihypertensive effect of Alcalase generated mung bean protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. **European Food Research Technology**, v. 222, n. 5-6, p. 733-736, 2006.

LITTLE, J.; OWEN, R.W.; FERNANDEZ, F.; HAWTIN, P.G.; HILL, M.J.; LOGAN, R.F.A.; THOMPSON, M.H.; HARDCASTLE, J.D. Asymptomatic colorectal neoplasia and fecal characteristics. **Disease Colon Rectum**, v. 45, n. , p. 1233-1241, 2002.

LO, W.M.; LI-CHAN, E.C.Y. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from *in vitro* pepsin-pancreatin digestion of soy protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3369-3376, 2005.

LO, W.M.Y.; FARNWOTH, E.R.; LI-CHAN, E.C.Y. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of soy protein in digests in a dynamic model system simulating the upper gastrointestinal tract. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 3, p. 231-237, 2006.

MACARULLA, M.T.; MEDINA, C.; DE DIEGO, M.A.; CHÁVARRI, M.; ZULET, M.A. MARTINEZ, J.A.; NOEL-SUBERVILLE, C.; HIGUERET, P.; PORTILLO, M.P. Effects of the whole seed and a protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolaemic rats. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. 8, p. 607-614, 2001.

MAENO, M.; YAMAMOTO, N.; TAKANO, T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 8, p. 1316-1321, 1996.

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**, v. 23, n. 3, p. 511-516, 2003.

MARCZAK, E.D.; USUI, H.; FUJITA, H.; YANG, Y.; YOKOO, M.; LIPKOWSKI, A.W.; YOSHIKAWA, M. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. **Peptides**, v. 24, n. 6, p. 791-798, 2003.

MARCONI, M.F. Evidence confirming the existence of a 7S globulin-like storage protein in *Amaranthus hypochondriacus* seed. **Food Chemistry**, 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**, 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**, v. 45, n. 10, p. 3832-3839, 1997.

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.

MASHIGE, F.; TANAKA, N.; MAKI, A.; KAMEL, S.; YAMANAKA, M. Direct spectrophotometry of total bile acids in serum. **Clinical Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 1352-1356, 1981.

MATSUI, T.; LI, C.H.; OSAJIMA, Y. Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. **Journal of Peptide Science**, v. 5, n. 7, p. 289-297, 1999.

MEGÍAS, C.; YUST, M.M.; PEDROCHE, J.; LQUARI, H.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1928-1932, 2004.

MEISEL, H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. **Biopolymers**, v. 43, n. 2, p. 119-128, 1997.

MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5/6, p. 363-373, 1998.

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.

MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, M.A.; RAMOS, M.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of ACE- inhibitory peptides derived from ovoalbumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 726-731, 2006.

MOREIRA, R.O.; SANTOS, R.D.; MARTINEZ, L.; SALDANHA, F.C.; PIMENTA, J.L.A.C.; FEIJOO, J.; JAHNKE, N.; MANGILE, O.C.; KUPFER, R. Perfil lipídico de pacientes com alto risco para eventos cardiovasculares a prática clínica diária. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 3, p. 481-489, 2006.

MULLALY, M.M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R.J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities if gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 5, p. 299-303, 1997.

MUTILANGI, W.A.; PANYAM, D.; KILARA, A. Hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey proteins. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 5, p. 1104-1109, 1995.

NAGATA, Y.; ISHIWAKI, N.; SUGANO, M. Studies on the mechanism of antihypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixtures in relation to the casein counterparts in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 112, n. , p. 1614-1625, 1982.

National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III) final report. **Circulation**, v. 106, n. , p. 3143-3421, 2002.

NURMINEN, M. L.; SIPOLA, M.; KAARTO, H.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; PIIOLA, K.; TOSSAVAINEN, O.; KORHONEN, H.; VAPAATALO, H. α -Lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive rats and spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 66, n. 16, p. 1535-1543, 2000.

OSHIMA, G.; SHIMABUKURO, H.; NAGASAWA, K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 66, n. , p. 128-137, 1979.

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.

PEDROCHE, J.; YUST, M.M.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 9, p. 960-965, 2002.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; KOSKINEN, P.; PIIOLA, K.; TUPASELA, T.; KORHONEN, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey proteins digests: concentration and characterization of active peptides. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 1, p. 53-64, 2000.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey protein: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends in food science and technology**, v. 11, n. 9-10, p. 347-356, 2001.

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

POTTER, S.M. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 3, p. 606S-611S, 1995.

POZZAN, R.; BRANDÃO, A. A.; MAGALHÃES, M. E.; FREITAS, E.V.; BRANDÃO, A. P. O controle da pressão arterial como questão central no tratamento da hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 10, n. 4, p. 253-259, 2003.

QURESHI, A.A.; LEHMANN, J.W.; PETERSON, D.M. Amaranth and its oil inhibit cholesterol biosynthesis in 6-week-old female chickens. **The Journal of Nutrition**, v. 126, n. 8, p. 1972-1978, 1996.

REIS, C.; NETTO, F. Influência do método de extração no rendimento, perfil protéico e solubilidade de concentrados protéicos de amaranto. **Boletim do Centro de Pesquisa de Treinamento em Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 289-302, 2006.

ROUFIK, S.; GAUTHIER, S.F.; TURGEON, S.L. In vitro digestibility of bioactive peptides derived from bovine β -lactoglobulin. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 4, p. 294-302, 2006.

SALCEDO-CHÁVEZ, B.; OSUNA-CASTRO, J.; GUEVARA-LARA, F.; DOMINGUÉZ-DOMINGUÉZ, J.; PAREDES-LOPÉZ. Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6515-6520, 2002.

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

SARWAR, G.; RATNAYAKE, W.M.N. Effects of amino acids supplementation of dietary protein on serum cholesterol and fatty acids in rats. **Nutrition Research**, v. 20, n. 5, p. 665-674, 2000.

SCHAGER, H.; JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

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, p. 855-862, 2002.

SEGURA-NIETO, M.; VÁQUEZ-SANCHEZ, N.; RUBIO-VALÁZQUEZ, H.; OLGUIN-MARTINEZ, O.; RODRIGUEZ-NESTER, C.E.; HERRERA-ESTRELLA, L. Characterization of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1553-1558, 1992.

SEPPO, L.; KEROJOKI, O.; SUOMALAINEN, T.; KORPELA, R. The effect of a *Lactobacillus helveticus* LKB-16 H fermented milk on hypertension – a pilot study on humans. **Milchwissenschaft**, v. 57, n. 3, p. 124-127, 2002.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos**. 1 ed. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.

SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Revisão: Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1,2, p. 7-19, 1999.

SHIHABI, Z. K. Analysis of angiotensin-converting enzyme by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 853, n. 1-2, p.185-188, 1999.

SHIN, D.H.; HEO, H.J.; LEE, Y.J.; KIM, H.K. Amaranth squalene reduces serum and liver lipid levels in rats fed a cholesterol diet. **British Journal of Biomedicine Science**, v. 60, n. , p. 1-4, 2003.

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**, v. 59, n. 4, p. 169-174, 2004.

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

SMACCHI, E.; GOBBETTI, M. Bioactive peptides in dairy products synthesis and interaction with proteolytic enzymes. **Food Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 129-141, 2000.

SMYTH, M.; FITZGERALD, R.J. Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available preparations. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 9, p. 819-827, 1998.

SPARRENBERGER, F.; MOREIRA, L.B.; CANEPPELE, M.C.G.L. Associação entre estresse e hipertensão. **Hipertensão**, v. 7, n. 3, p. 90-93, 2004.

STATISTICA FOR WINDOWS [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104 (1995).

STIPANUK, M. **Biochemical and physiological aspects of human nutrition**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000.

STORY, J.A.; KRITCHEVSKY, D. Comparison of the binding of various bile acids and bile salts *in vitro* by several types of fiber. **The Journal of Nutrition**, v. 106, n. , p. 1292-1294, 1976.

SUERSUNA, K. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, n. 7, p. 415-419, 1998.

SUGANO, M.; ISHIWAKI, N.; NAKASHIME, K. Dietary protein-dependent modification of serum cholesterol level in rats. Significance of the lysine/arginine ratio. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 192-199, 1984.

SUGANO, M.; YAMADA, Y.; YOSHIDA, K.; HASHIMOTO, Y.; MATSUO, T.; KIMOTO, M. The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. **Atherosclerosis**, v. 72, n. 2-3, p. 115-122, 1988.

TAKANO, T. Milk derived peptides and hypertension reduction. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5-6, p. 375-381, 1998.

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.

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

VAN DER VEN, C.; GRUPEN, H.; BONT, D. B. A.; VORAGEN, A. G. J. Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 10, p. p.813-820, 2002.

VAN ELSWIJK, D. A.; DIEFENBACH, O.; VAN DER BERG, S.; IRTH, H.; TJADEN, U. R.; VAN DER GREEF, J. Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography-biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1020, n. 1, p. 45-58, 2003.

VERMEIRSSSEN, V.; VAN CAMP, J.; 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**, v. 51, n. 19, p. 5680-5687, 2003.

VERMEIRSSSEN, V.; VAN CAMP, J.; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 357-366, 2004.

WALSH, D.J.; BERNARD, H.; MURRAY, B.A.; MACDONALD, J.; PENTZIAN, A.K.; WRIGHT, G.A.; WAL, J.M.; STRUTHERS, A.D.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R.J. In vitro generation and stability of the lactokinin β -lactoglobulin fragment (142-148). **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 11, p. 3845-3857, 2004.

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

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

WU, J.; DING, X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **Food Research International**, v. 35, n. 4, p. 367-375, 2002.

YANG, Y.; MARCZAK, E.W.; YOKOO, M.; USUI, H.; YOSHIKAWA, M. Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach rubisco. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 4897-4902, 2003.

YANG, Y.; MARCZAK, E.W.; USUI, H.; KAWAMURA, Y.; YOSHIKAWA, M. Antihypertensive properties os spinach leaf protein digests. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2223-2225, 2004.

YOSHIE-STARK, Y.; WÄSCHE, A. In vitro binding of bile acid by lupin protein isolates and their hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 179-184, 2004.

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**, v. 52, n. 25, p. 7681-7689, 2004.

YOSHIE-STARK, Y.; WADA, Y.; SCHOTT, M.; WÄSCHE, A. Functional and bioactive properties of rapeseed protein concentrates and sensory analysis of food application with rapeseed protein concentrates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 5, p. 503-512, 2006.

YUST, M.M.; PEDROCHE, J.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with Alcalase. **Food Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 1-7, 2003.

