



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



**Obtenção de concentrados protéicos de amaranto (*Amaranthus
sp*) por diferentes processos e avaliação de seus efeitos em
algumas propriedades**

Dagnith Liz Bejarano Luján

Doutoranda

Prof^a. Dr^a. Flávia Maria Netto

Orientadora

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

Campinas-SP
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B387o Bejarano Luján, Dagnith Liz
Obtenção de concentrados protéicos de amaranto (*Amaranthus sp*)
por diferentes processos e avaliação de seus efeitos em algumas
propriedades / Dagnith Liz Bejarano Luján. -- Campinas, SP: [s.n.],
2008.

Orientador: Flávia Maria Netto
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos

1. Proteínas de amaranto. 2. Compostos fenólicos. 3.
Solubilidade. 4. Reologia. 5. Microestrutura do gel. I. Netto,
Flávia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Obtained of amaranth protein concentrates (*Amaranthus sp*) by different
process and evaluation of its effects on some properties

Palavras-chave em inglês (Keywords): Amaranth proteins, Phenolic compounds, Solubility,
Rheology, Gel microstructure

Área de concentração: Nutrição Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Flávia Maria Netto

Rosiane Lopes da Cunha

Caroline Joy Steel

Rosemary Aparecida de Carvalho

Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Data de defesa: 04/09/2008

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Flávia Maria Netto

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

(orientador)

Prof^ª. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA/UNICAMP

(membro)

Prof^ª. Dra. Caroline Joy Steel

Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA/UNICAMP

(membro)

Prof^ª. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZA/USP

(membro)

Prof^ª. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada – ITAL

(membro)

Prof. Dr. Carlos Raimundo F. Grosso
Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA/UNICAMP
(membro)

Prof. Dr. José Paschoal Batistuti
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP
(membro)

Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(membro)

Felizes os que não Te viram
e creram em Ti.

Felizes os que não contemplaram teu semblante
e confessaram tua divindade.

Felizes os que, lendo o Evangelho,
reconheceram em Ti aquele a
quem esperavam.

Felizes os que, em teus enviados,
divisaram tua divina presença.

Felizes os que, no segredo de seus corações,
escutaram tua voz e responderam.

Felizes os que,
animados pelo desejo de tocar Deus,
encontraram-Te no mistério.

Felizes os que, nos momentos de escuridão,
aderiram mais fortemente a tua luz.

Felizes os que,
desconcertados pela provação, mantêm sua confiança em Ti.

Felizes os que, tendo a impressão de que estás ausente,
continuaram a crer em tua proximidade.

Felizes os que não Te viram,
mas vivem a firme esperança de Te ver um dia. Amém.

DEDICATÓRIA

A Deus, pela oportunidade e força
para fazer realidade este sonho.

Aos meus pais, Francisco e Teodocia,
com todo amor e eterna gratidão.

Aos meus irmãos, Maritza, Carlos e Patrícia,
pelo carinho, apoio e força.

Aos meus sobrinhos, Arturo, Fernanda e Francisco
pela alegria da vida.

AGRADECIMENTOS

Aos professores da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade de
aprendizado.

À Profa. Dra. Flávia Maria Netto, pela oportunidade de desenvolver este trabalho de
pesquisa e pela contribuição com seu conhecimento.

À banca examinadora por todas as correções valiosas e sugestões que contribuíram para a
melhora deste trabalho.

Às professoras Dra Maria Teresa Bertoldo Pacheco e Dra. Rosiane Lopes da Cunha um
agradecimento especial pelo tempo dedicado e pelas valiosas sugestões no desenvolvimento
da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do
Programa Estudante Convênio Pós-Graduação (PEC-PG) pela bolsa concedida de
doutorado.

À EMBRAPA Cerrados – Planaltina - DF pela doação da matéria-prima para a realização
deste trabalho. Dr. Carlos R. Spehar

Às professoras Dra. Maria Cristina Añon e Dra. Sara Ortíz, pesquisadoras do Centro de
Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias
Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina, pelo apoio e participação
nos ensaios de calorimetria.

Ao professor, Dr. Carlos Carrara, pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos,
Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina,
pelos ensinamentos e partilha de suas idéias na obtenção dos concentrados protéicos.

À Eliana pela amizade e carinho, pela disposição em me ajudar com as eletroforeses e pela
sua valiosa contribuição na etapa de gelificação. Obrigada Li, pois seus abraços
fortaleceram muito meu espírito.

À Bete, minha amiga e companheira de muitas horas. Obrigado pela ajuda, conselhos e amizade.

À Andréa, minha amiga e companheira de pesquisa, com quem aprendi muito a cada dia de trabalho e convivência.

Às amigas Soninha, Janai, Adriana e Noemi, pelo carinho e pela amizade com que me receberam sempre. Obrigada por fazerem parte de minha vida.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Nutricional, Michele, Mariana, Carol, Eliriane, Virgínia, Sarah e Laercio, pelo companheirismo e simpatia.

À Lucia, por me auxiliar com as corridas no cromatógrafo.

Ao prof. Dr. Carlos Grosso, pela sua gentileza, atenção e carinho com que me recebeu e me encaminhou no curso de doutorado.

À Iara Fagani do Laboratório de Microestrutura pela sua ajuda, paciência e boa vontade no preparo de géis para avaliação por Microscopia Eletrônica.

À prof. Dra. Débora de Queiroz Taváres, pela disposição em me ajudar com a interpretação dos resultados de estrutura de géis avaliados por Microscopia Eletrônica.

Ao prof. Dr. Jaime Amaya por permitir-me fazer uso do espectrofotômetro do Laboratório de Fontes Protéicas.

À professora Elena Bolini, pelos seus conselhos em minha formação pessoal.

Ao Chico do Laboratório Central, pelo auxílio no uso do cromatógrafo e texturometro.

Aos amigos e funcionários do DEPAN: Éder, Cinthia, Janai, Maria Ines, Fernando, Alda, Camila, Andréa, Carol, Soeli, Carla, Cidinha, Sonia, Fátima, Susana. Obrigada pelo seu carinho.

Ao pessoal da secretaria de Pós-Graduação, pela ajuda e compreensão.

À Antônia, Adriane e Cidinha do Laboratório de Microscopia Eletrônica , que me auxiliaram no uso de microscópio eletrônico.

À Aninha e Angelo, pessoal do grupo de trabalho da prof. Dra. Rosiane (DEA), por me auxiliar com as análises e discussões dos ensaios de reologia.

Ao Anderson, pela boa disposição para as correções de português do presente trabalho.
Obrigada pela valiosa ajuda e pelo carinho.

À Patricia, pela ajuda nas discussões de resultados dos ensaios reológicos.

Ao Tonhy, pela sua amizade e companhia. Obrigada por sua paciência nas noites que tive que ficar até de tarde no laboratório.

À Luz María, pela amizade e apoio em todas as horas. Obrigada pela sua alegria.

A Nilcemar e Martha, minhas amigas de mestrado, que sempre me incentivaram e deram forças para continuar no meu caminho. Obrigada pelo seu amor e sincera amizade.

Índice geral

Resumo Geral	xvi
Summary	xviii
Introdução Geral	1
Capítulo 1: Revisão Bibliográfica	7
1.1 Grão de amaranto	7
1.2 Proteínas de amaranto	9
1.3 Isolados e concentrados protéicos de amaranto	10
1.4 Funcionalidade das proteínas de amaranto	12
1.4.1 Solubilidade	13
1.4.2 Gelificação	14
1.5 Influência das condições de processo na funcionalidade da proteína	16
1.5.1 Efeito do sal	16
1.5.2 Efeito do pH	17
1.5.3 Efeito da temperatura	18
1.6 Influência de componentes alimentares e ingredientes não protéicos na funcionalidade da proteína	19
1.7 Propriedades reológicas das proteínas	20
1.7.1 Propriedades reológicas a baixa deformação	21
1.7.2 Propriedades reológicas a alta deformação	21
1.8 Referências bibliográficas	23
Capítulo 2: Caracterização físico-química e solubilidade de concentrados protéicos de <i>Amaranthus cruentus</i> e <i>Amaranthus caudatus</i>	32
Resumo	32
Abstract	33
1. Introdução	34
2. Materiais e métodos	35
2.1 Matéria-prima	35
2.2 Obtenção dos concentrados protéicos de amaranto (CPAs)	35
2.3 Composição centesimal	37
2.4 Compostos fenólicos	37
2.5 Caracterização dos CPAs	37
2.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	37
2.5.2 Grupos sulfidrilas livres (SH)	38
2.5.3 Calorimetria diferencial de varredura (CDV)	38
2.5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência – exclusão molecular (CLAE-EM) ..	39
2.5.5 Solubilidade	39
2.6 Análise estatística	39
3. Resultados e discussão	40
3.1 Perfil eletroforético dos CPAs	44
3.2 Grupos sulfidrilas livres dos CPAs	46
3.3 Calorimetria diferencial de varredura	47
3.4 Cromatografia de exclusão molecular	50
3.5 Solubilidade	52
4. Conclusões	54

5. Referências bibliográficas	54
 Capítulo 3: Caracterização físico-química e solubilidade de concentrados protéicos de <i>Amaranthus cruentus</i> obtidos por processos alternativos	 61
Resumo	61
Abstract	62
1. Introdução	63
2. Materiais e métodos	64
2.1 Matéria-prima	64
2.2 Obtenção dos CPAs	64
2.3 Composição centesimal da FIA, FDA e CPAs	69
2.4 Compostos fenólicos totais	69
2.5 Caracterização dos CPAs	69
2.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	70
2.5.2 Grupos sulfidrilas livres (SH)	70
2.5.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	70
2.5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência – exclusão molecular (CLAE-EM) ...	71
2.5.5 Solubilidade	71
2.5.6 Avaliação de cor dos CPAs	71
2.6 Análise estatística	72
3. Resultados	72
3.1 Compostos fenólicos totais e parâmetros de cor	74
3.2 Eletroforese SDS-PAGE	77
3.3 Grupos sulfidrilas livres	78
3.4 Calorimetria diferencial de varredura	79
3.5 Cromatografia de exclusão molecular	82
3.6 Solubilidade	84
4. Discussão	85
5. Conclusões	88
6. Referências bibliográficas	88
 Capítulo 4: Características estruturais e reológicas dos géis de concentrados protéicos de amarantho obtidos por processos alternativos	 95
Resumo	95
Abstract	96
1. Introdução	97
2. Materiais e métodos	98
2.1 Matéria- prima	98
2.2 Obtenção dos concentrados protéicos (CPAs)	98
2.3 Composição centesimal das farinhas e CPAs	102
2.4 Preparação das amostra	102
2.5 Ensaio reológicos em altas deformações	102
2.5.1 Análise de perfil de textura (TPA)	102
2.5.2 Propriedades mecânicas	103
2.6 Ensaio reológicos oscilatórios em baixa deformação	103
2.7 Capacidade de retenção de água (CRA)	104

2.5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	104
2.5.6 Análise estatística	104
3. Resultados	105
3.1 Perfil de textura	105
3.2 Propriedades mecânicas	108
3.3 Medidas reológicas oscilatórias em baixas deformações	109
3.4 Capacidade de retenção de água	116
3.5 Microscopia eletrônica de varredura	116
4. Discussão	118
5. Conclusão	122
6. Referências bibliográficas	123
 Conclusões gerais	 127

Índice de Tabelas

Capítulo 2:

Tabela 1. Composição centesimal das farinhas e concentrados protéicos isoeletrônicos de <i>A. caudatus</i> e <i>Amaranthus cruentus</i> , em base seca	41
Tabela 2. Teores de proteína e rendimentos dos concentrados protéicos isoeletrônicos (CPAIs) e concentrados protéicos isoeletrônicos dialisados (CPAIDs) de <i>Amaranthus cruentus</i> e <i>Amaranthus caudatus</i>	42
Tabela 3. Valores de entalpia de desnaturação (ΔH_T – J/g de proteína) e temperatura de desnaturação (T_d) dos CPAIs e CPAIDs das espécies <i>Amaranthus cruentus</i> e <i>Amaranthus caudatus</i>	50
Tabela 4. Perfil de solubilidade dos CPAIs e CPAIDs de <i>Amaranthus cruentus</i> e <i>Amaranthus caudatus</i>	53

Capítulo 3:

Tabela 1. Composição centesimal das farinhas (FIA, FDA) e concentrados protéicos de amaranto (CPAs), em base seca	72
Tabela 2. Efeito dos processos sobre o teor de proteína, rendimentos dos CPAs e rendimentos protéicos dos CPAs, soro total e resíduos	74
Tabela 3. Teores de compostos fenólicos totais (mg EAG/g de amostra) da FIA e FDA, CPAs e soro total obtidos pelos diferentes processos	76
Tabela 4. Componentes básicos da escala L^* , a^* , b^* dos CPAs	76
Tabela 5. Valores de entalpia (ΔH_T – J/g de proteína) e temperaturas de desnaturação (T_d) dos CPAs	80
Tabela 6. Perfil de solubilidade dos CPAs	85

Capítulo 4:

Tabela 1. Ponto do gel determinado pela transição de dG'/dT (Pa/°C) em função da temperatura para as soluções dos CPAs	114
Tabela 2. Propriedades de equilíbrio alcançadas aos 90 °C para as soluções dos CPAs	115

Índice de Figuras

Capítulo 2:

Figura 1. Fluxograma de obtenção dos concentrados protéicos isoeletricos (CPAIs) e concentrados protéicos isoeletricos dialisados (CPAIDs) das espécies <i>Amaranthus cruentus</i> e <i>Amaranthus caudatus</i>	36
Figura 2. Teores de compostos fenólicos totais das farinhas, CPAIs e CPAIDs correspondentes às espécies <i>Amaranthus cruentus</i> e <i>Amaranthus caudatus</i>	43
Figura 3. Fotografia dos grãos de <i>Amaranthus caudatus</i> (A) e <i>Amaranthus cruentus</i> (B), CPAIs e CPAIDs de <i>A. caudatus</i> (C e D) e de <i>A. cruentus</i> (E e F), respectivamente	44
Figura 4. Perfil eletroforético SDS-PAGE dos CPAs de <i>A. caudatus</i> (A) e <i>A. cruentus</i> (B). Coluna P – padrões, coluna 1A e 1B – CPAIs e colunas 2A e 2B - CPAIDs	45
Figura 5. Valores dos grupos sulfidrila livres ($\mu\text{mol/g}$) dos CPAIs e CPAIDs	47
Figura 6. Termogramas dos CPAIs e CPAIDs. CPAI (A) e CPAID (B) de <i>A. cruentus</i> , CPAI (C) e CPAID (D) de <i>A. Caudatus</i>	49
Figura 7. Perfil cromatográfico (CLAE-EM) dos CPAIs e CPAIDs. CPAI (A) e CPAID (C) de <i>A. caudatus</i> e CPAI (B) e CPAID (D) de <i>A. cruentus</i>	52

Capítulo 3:

Figura 1. Obtenção do concentrado protéico de amaranto padrão (CPAp) baseado no processo convencional de obtenção de isolados protéicos	66
Figura 2. Obtenção do concentrado protéico de amaranto pelo processo de lavagem ácida (CPAla)	67
Figura 3. Obtenção do concentrado protéico de amaranto pelo processo térmico a 50°C (CPAtt)	68
Figura 4. Fotografia dos CPAs. CPAp – concentrado protéico padrão, CPAla – concentrado protéico lavagem ácida e CPAtt – concentrado protéico tratado termicamente	77
Figura 5. Perfil eletroforético SDS-PAGE dos CPAs (A) e soros protéicos (B) de <i>A. cruentus</i> . Coluna P – padrões; coluna 1A e coluna 1B (soro após precipitação isoeletrica) – processo convencional; coluna 2A, coluna 2B (soro após lavagem ácida) e coluna 3B (soro após precipitação isoeletrica) – processo lavagem ácida, coluna 3A e coluna 4B (soro após precipitação isoeletrica) – processo térmico	78
Figura 6. Valores dos grupos sulfidrila livres ($\mu\text{mol/g}$) dos CPAs	79
Figura 7. Termogramas dos CPAs obtidos por processo convencional (A), processo lavagem ácida (B) e processo térmico (C)	81
Figura 8. Perfil cromatográfico (CLAE-EM) dos CPAs. CPAp (A), CPAla (B) e CPAtt (C)	83

Capítulo 4:

Figura 1. Obtenção do concentrado protéico de amaranto padrão (CPAp) baseado no processo convencional de obtenção de isolados protéicos	99
Figura 2. Obtenção do concentrado protéico de amaranto pelo processo de lavagem ácida (CPAla)	100

Figura 3. Obtenção do concentrado protéico de amaranço pelo processo térmico a 50 °C (CPAtt)	101
Figura 4. Curvas de força-tempo dos géis do CPAp (linha azul), CPAla (linha preta) e CPAtt (linha vermelha). Temperaturas de obtenção dos géis: (a) 70 °C, (b) 80 °C e (c) 90 °C	106
Figura 5. Parâmetros de textura dos géis dos CPAs preparados a diferentes temperaturas. CPAp (■), CPAla (●) e CPAtt (▲)	107
Figura 6. Propriedades mecânicas dos géis a diferentes temperaturas. CPAp (■), CPAla (●) e CPAtt (▲). Tensão de fratura (σ_f), deformação de fratura (ϵ_f), trabalho de fratura (w_f) e módulo de Young (E)	109
Figura 7. Varreduras de temperatura (G' , G'' e $\tan \delta$ versus temperatura) de dispersões protéicas dos CPAs, aquecidos de 55 a 90 °C. (a) CPAp, (b) CPAla e (c) CPAtt. G' (●) e G'' (○)	110
Figura 8. Ponto de gel determinado pela aproximação de G' e G'' a partir de dados de varredura de temperatura (G' e G'' versus tempo). (a) CPAp, (b) CPAla e (c) CPAtt. G' (●) e G'' (○)	112
Figura 9. Transições no comportamento reológico dos CPAs como uma função da temperatura (55 a 90 °C), observadas a partir das alterações no ângulo dG'/dT (Pa/°C). (a) CPAp, (b) CPAla e (c) CPAtt	113
Figura 10. Propriedades de equilíbrio alcançadas aos 90 °C. (a) tratamento controle, (b) tratamento ácido e (c) tratamento térmico. G' (●) e G'' (○)	115
Figura 11. Efeito dos processos e da temperatura de aquecimento sobre a capacidade e retenção de água dos géis protéicos de amaranço. CPAp (■), CPAla (●) e CPAtt (▲)	116
Figura 12. Efeito da temperatura sobre a microestrutura dos géis protéicos de amaranço determinado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (a) CPAp, (b) CPAla e (c) CPAtt. ba = bolha de ar, lip = lipídio	117

RESUMO GERAL

Um caminho importante para a utilização dos grãos de amaranto é a produção de isolados ou concentrados protéicos, tornando-se um ingrediente potencial para uso na formulação de alimentos. Diferentes processos para obtenção de concentrados protéicos e avaliação de seus efeitos nas propriedades funcionais foram estudados neste trabalho. O trabalho foi desenvolvido em três etapas. Na primeira, foi realizado a caracterização físico-química e solubilidade de concentrados protéicos de *Amaranthus cruentus* e *A. caudatus* obtidos seguindo a extração protéica convencional para isolados protéicos (CPAIs) e estes mesmos concentrados também foram avaliados após serem dialisados (CPAIDs). Os CPAIs e CPAIDs foram caracterizados por eletroforese SDS-PAGE, grupos sulfidrilas livres (SH), calorimetria diferencial de varredura (DSC), cromatografia líquida de alta eficiência - exclusão molecular (CLAE-EM), solubilidade em água e em NaCl 0,05 mol/L em pH 3,0, 4,5 ou 7,0 e teor de compostos fenólicos totais. Na segunda etapa, estudou-se o efeito de diferentes processos de obtenção dos concentrados protéicos (CPAs) da espécie *A. cruentus* nas suas características físico-químicas e solubilidade, propondo-se três processos: (1) processo convencional para obtenção de isolados protéicos, utilizando pH 9,0 na extração, pH 4,5 para precipitação das proteínas e neutralização; (2) lavagem ácida (pH 4,5) prévia à extração protéica e (3) processo térmico a 50 °C na etapa de extração alcalina. Os CPAs resultantes desses processos foram denominados concentrado protéico padrão (CPAp), concentrado protéico lavagem ácida (CPAla) e concentrado protéico tratado termicamente (CPAtt), respectivamente, e foram avaliados pelos perfis eletroforético e cromatográfico, grupos sulfidrilas livres (SH), calorimetria diferencial de varredura (DSC), solubilidade em água e NaCl 0,05 mol/L em pH 3,0, 4,5 ou 7,0, compostos fenólicos e parâmetros de cor. Na última etapa deste trabalho, foi estudada a gelificação de concentrados protéicos de amaranto obtidos pelos tratamentos estudados na segunda etapa. Os géis dos três CPAs, obtidos de dispersões de 12% de proteína tratadas a 70, 80 e 90°C, foram avaliados por ensaios reológicos a altas (propriedades de fratura) e baixas (propriedades de textura) deformações; os géis, com mesma concentração de proteína, porém, obtidos a temperaturas de 55 a 90 °C foram avaliados por ensaios reológicos a baixas deformações (varreduras de temperatura e tempo). Também foi estudada a capacidade de retenção de água (CRA) e a microestrutura dos géis foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A

caracterização físico-química e solubilidade de concentrados protéicos das espécies *A. cruentus* e *A. caudatus* mostrou teores de proteína e solubilidade estatisticamente maiores para a espécie *A. caudatus* do que para o *A. cruentus*, e a presença das frações albuminas, globulinas e glutelinas em ambas as espécies e concentrados protéicos. Com a diálise, houve diminuição da solubilidade, diminuição do número de grupos SH livres, formação de agregados de menor massa molar aparente e maior estabilidade térmica protéica dos concentrados de ambas as espécies. O processo de obtenção dos concentrados protéicos resultou em um aumento de duas vezes do teor de fenólicos totais em relação às farinhas desengorduradas, porém a diálise diminuiu o teor de fenólicos. Dos concentrados protéicos obtidos de sementes de *A. cruentus* pelos diferentes processos, CPAla e CPAtt apresentaram teores de proteína superiores a 75% e teor de grupos sulfidrilas livres inferior aos observados para o CPAp. Os resultados de calorimetria mostraram um pico de transição a 69,8 °C para todos os concentrados. Para CPAtt e CPAp foi observado um segundo pico endotérmico a 101,9 e 101,6 °C, respectivamente e um terceiro pico para o CPAla a 103,7 °C. Estas temperaturas de desnaturação corresponderam às diferentes frações protéicas, no entanto, um pico endotérmico intermediário (78,8 °C), observado apenas no CPAla, sugere alteração estrutural das proteínas, que pode ter ocorrido pela formação de complexos proteína-compostos fenólicos, resultando em maior estabilidade térmica do CPAla. Os resultados de composição, cor, teor de fenólicos totais, solubilidade e perfil cromatográfico confirmaram que a presença de compostos fenólicos influenciou nas propriedades avaliadas. Os géis protéicos preparados a partir do CPAp, CPAla e CPAtt foram mais elásticos, mais duros e menos adesivos com o aumento da temperatura de gelificação, sendo que os géis do CPAtt apresentaram os maiores valores de fraturabilidade, dureza, coesividade e elasticidade, seguido pelos géis do CPAp e CPAla. O ponto de gel, determinado pela variação diferencial no módulo de armazenamento (G') em função da temperatura (dG'/dT), mostrou duas temperaturas de início de gelificação para os géis do CPAp e do CPAtt, enquanto a gelificação do CPAla foi determinada por uma única temperatura. A capacidade de retenção de água dos géis aumentou com o aumento da temperatura de gelificação e esteve diretamente relacionada com o tipo de matriz do gel. Os géis obtidos a partir do CPAtt mostraram CRA superior e apresentaram rede mais estruturada quando comparados com o CPAp e CPAla. Em contraste, os géis do CPAla

apresentaram sinérese. Os resultados sugerem que os diferentes processos de obtenção de CPAs podem levar a diferentes graus de desnaturação e agregação das proteínas, com influência nas propriedades funcionais, possivelmente como resultado de variações nos componentes presentes em cada espécie de amaranto e no processo de extração. O processo de lavagem ácida teve efeitos positivos na solubilidade, no entanto, o processo térmico favoreceu a formação da rede do gel.

Palavras-chave: proteínas de amaranto, extração aquosa de proteína, concentrados protéicos, funcionalidade protéica, reologia, microestrutura do gel.

SUMMARY

An important path for the utilization of amaranth grains is the production of protein isolates or concentrates, making it a potential ingredient for use in food formulation. Alternative processes for the production of protein concentrates and the evaluation of their effects on functional properties were studied in this work. To reach this objective, the work was developed in three steps. In the first step, the physicochemical characterization and solubility of *Amaranthus cruentus* and *A. caudatus* protein concentrates obtained through conventional protein extraction for protein isolates (IAPCs) was evaluated, and these concentrates were also evaluated after dialysis (DIAPCs). IAPCs and DIAPCs were characterized through SDS-PAGE electrophoresis, free sulfhydryl groups (SH), differential scanning calorimetry (DSC), size-exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC), solubility in water and in 0.05 mol/L NaCl at pH 3.0, 4.5 and 7.0 and total phenolic compound content. In the second step, the effect of different processes for the production of amaranth protein concentrates (APCs) of the species *A. cruentus* on physicochemical characteristics and solubility was studied, proposing three processes: (1) conventional process for the production of protein isolates, using pH 9.0 for extraction, pH 4.5 for protein precipitation and neutralization; (2) acid washing (pH 4.5) previous to protein extraction, and (3) alkaline extraction at 50 °C. The resulting APCs were designated standard protein concentrate (APCst), acid washed protein concentrate (APCaw) and thermally treated protein concentrate (APCtt), respectively, and were evaluated as to their electrophoretic and chromatographic profiles, free sulfhydryl groups (SH), differential scanning calorimetry (DSC), solubility in water and in 0.05 mol/L NaCl at pH 3.0, 4.5 and

7.0, phenolic compounds and color parameters. In the last step of this work, the gelification of amaranth protein concentrates obtained by the conventional process, by acid washing previous to protein extraction and protein extraction with heating was studied. The gels of the three APCs, prepared from 12% protein dispersions at 70, 80 and 90 °C, were evaluated through rheological assays at high (texture and fracture properties) and low (time and temperature scannings) deformations. The gels, with same protein concentration, however, obtained at temperatures of 55 to 90 °C were evaluated by rheological assays at low deformations (sweeps of temperature and time). The water retention capacity (WRC) and the microstructure of the gels evaluated through scanning electron microscopy (SEM) were also studied. The study of the physicochemical and functional characterization of the protein concentrates from the species *A. cruentus* and *A. caudatus* showed statistically higher protein content and solubility for the species *A. caudatus* than for *A. cruentus* and the presence of albumin, globulin and glutelin fractions in both species and processes. After dialysis, there was a reduction in solubility, a reduction in the number of free SH groups, the formation of lower apparent molecular mass aggregates and higher protein thermal stability in the concentrates of both species. The protein concentrate production process resulted in a two-fold increase in the total phenolic content in relation to the defatted flours and dialysis reduced the phenolic content. The concentrates obtained through the alternative production processes, APCaw and APCtt, presented protein contents higher than 75% and a reduction in free sulfhydryl groups when compared to APCst. The results of the calorimetric analysis showed transition to a peak of 69.8 °C for all concentrated. The APCst and APCtt showed a second endothermic peak to 101.9 °C and 101.6 °C respectively and a third peak for the APCaw to 103.7 °C. These denaturation temperatures corresponded at different protein fractions, however, an intermediary endothermic peak of APCaw (78.8 °C) indicated structural changes in the proteins that could have occurred due the formation of protein-phenolic compound complexes, resulting in the higher thermal stability of APCaw. The results obtained for composition, color, total phenolic content, solubility and chromatographic profile confirmed that the presence of phenolic compounds influenced the properties evaluated. The protein gels prepared from APCst, APCaw and APCtt were more elastic, firmer and less adhesive with the increase of gelification temperature, and APCtt gels presented the highest values for the instrumental texture parameters fracturability,

firmness, cohesiveness and elasticity, followed by the gels prepared from APCst and APCaw. The gel point determined by the differential variation of G' versus temperature (dG'/dT) showed two gelification onset temperatures for the gels from APCst and APCtt, however, the gelification of APCaw was determined by only one temperature. The water retention capacity (WRC) of the gels increased with the increase of gelification temperature and was directly related to the gel matrix organization. The gels produced from APCtt had higher WRC and a more structured network when compared to APCst and APCaw gels. In contrast, APCaw gels presented syneresis. The results suggest that the different processes for the production of APCs may lead to different degrees of protein denaturation and aggregation, influencing functional properties, possibly due to variations in the components present in each amaranth species and variations in the extraction process. The acid washing process had positive effects on solubility, however, the thermal process favored the formation of the gel network.

Key words: amaranth proteins, protein aqueous extraction, protein concentrates, protein functionality, rheology, gel microstructure.

INTRODUÇÃO GERAL

Isolados e concentrados protéicos de origem vegetal são ingredientes de grande importância para a indústria de alimentos. Esses produtos são utilizados como ingredientes nas formulações de diversos alimentos processados, tais como produtos de panificação, laticínios e carnes, para modificar sua qualidade funcional e diminuir custos (MONDOR et al., 2004; L'HOCINE et al., 2006). As proteínas de soja são as mais amplamente utilizadas na indústria de alimentos, não só por seu valor nutricional, mas também devido às suas excelentes propriedades funcionais. No entanto, no Brasil, outras proteínas vegetais têm recebido menor atenção, entre elas estão as proteínas do amaranto (COSTA e BORGES, 2005).

O grão de amaranto apresenta teor de proteína de 14 a 19% e composição balanceada de aminoácidos essenciais, principalmente lisina, triptofano e metionina, os quais se encontram em baixas concentrações em cereais e leguminosas convencionais (AVANZA e AÑÓN, 2007). Devido a essas características nutricionais, as proteínas do amaranto são desejáveis nas formulações de alimentos industrializados e podem ser benéficas para a saúde, na prevenção de altos níveis de triglicérides e colesterol (ESCUDERO et al., 2006; MARTIROSYAN et al., 2007).

Embora as proteínas do amaranto, isolados e concentrados protéicos, ofereçam potencial como fonte de novos ingredientes para o processamento de alimentos, seu uso tecnológico depende amplamente de suas propriedades funcionais, as quais estão diretamente relacionadas com suas características estruturais (MARCONE e KAKUDA, 1999) e com tratamentos sob diferentes condições de processamento, tais como pH, temperatura e força iônica (GAMEL et al., 2006; AVANZA e AÑÓN, 2007). Tamanho de partículas e métodos de secagem também pode ser de importância na obtenção dos produtos protéicos (TIAN et al., 1999).

As condições de processo usadas na obtenção de concentrados e isolados protéicos podem modificar sua funcionalidade (NIELSON, 1997). Os processos de obtenção de concentrados protéicos de amaranto citados na literatura utilizam $\text{pH} \geq 10$ na etapa de extração da proteína (LUQUEZ et al., 1997; BEJOSANO e CORKE, 1998). A desvantagem desses métodos é a desnaturação irreversível da proteína com alteração da solubilidade (MONDOR et al., 2004). Além disso, pode ocorrer diminuição da

digestibilidade e do valor biológico da proteína, devido à formação de lisoalanina (FINOT, 1997).

Uma característica importante das proteínas é a capacidade de misturar-se com o solvente e formar um sistema homogêneo. Esta propriedade funcional crítica das proteínas é a solubilidade, sendo de grande importância na formulação de alimentos devido a sua influência sobre outras propriedades funcionais, tais como emulsificação, formação de espuma e gelificação (VOJDANI, 1996). A solubilidade protéica é função da composição aminoacídica e não aminoacídica das proteínas, da conformação nativa ou desnaturada e de fatores ambientais, tais como: pH, temperatura e força iônica (BELITZ et al., 1999).

Por outro lado, a gelificação de proteínas globulares, induzidas pelo aquecimento, é importante na textura de sistemas alimentares (COMFORT e HOWELL, 2002; MAKRI et al., 2006). A formação do gel é definida como um fenômeno de agregação protéica, onde a integridade física do gel é mantida pelo balanço das forças atrativas e repulsivas entre as moléculas protéicas, e o mecanismo de gelificação é determinado por esse balanço e as interações proteína-solvente (CLARK et al., 2001). O processo de gelificação pode ser alterado pelo pH, força iônica, temperatura e presença de componentes não protéicos (RUBINO et al., 1996; MOURE et al., 2006; MAURI e AÑÓN, 2006; AVANZA e AÑÓN, 2007). A gelificação está diretamente relacionada com as propriedades reológicas, viscoelasticidade e textura, e estas por sua vez estão associadas com a microestrutura da matriz do gel (AVANZA, PUPPO e AÑÓN, 2005).

Os métodos para avaliar as propriedades reológicas estão divididos em testes mecânicos em altas e baixas deformações. Os testes dinâmicos em baixa deformação são ferramentas úteis na caracterização do comportamento viscoelástico dos géis na região linear, onde as amplitudes de tensão ou deformação são ajustadas para valores suficientemente baixos, de modo que a tensão seja proporcional à deformação (ROSS-MURPHY, 1995). Os testes mecânicos em alta deformação são usados na obtenção de parâmetros reológicos correspondentes às condições de processamento e propriedades sensoriais. Nesses testes, a amostra é deformada acima da faixa de viscoelasticidade linear e a estrutura do gel é quebrada (FOEGEDING, BOWLAND e HARDIN, 1995).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar diferentes processos para obtenção de concentrados protéicos de amaranto, com alto teor protéico, e avaliação de seus efeitos em algumas propriedades funcionais.

Este trabalho está organizado em capítulos, conforme descrito a seguir:

Capítulo 1. Revisão bibliográfica.

Neste capítulo, encontra-se uma revisão bibliográfica sobre o grão de amaranto, proteínas do amaranto, isolados e concentrados protéicos e funcionalidade das proteínas.

Capítulo 2. Caracterização físico-química e solubilidade de concentrados protéicos de *Amaranthus cruentus* e *Amaranthus caudatus*.

Este capítulo consta de um estudo sobre a obtenção de concentrados protéicos das espécies *Amaranthus cruentus* e *A. caudatus* obtidos por processos semelhantes, baseados no método convencional para obtenção de isolados protéicos, e a avaliação das propriedades físico-químicas e solubilidade de ambos os concentrados protéicos em função da força iônica do meio.

Capítulo 3. Caracterização físico-química e solubilidade de concentrados protéicos de *Amaranthus cruentus* obtidos por diferentes processos.

Neste capítulo, estudou-se três diferentes processos para a obtenção de concentrados protéicos de amaranto e o seu efeito sobre algumas propriedades físico-químicas das proteínas do amaranto: perfil eletroforético e cromatográfico, propriedades térmicas, compostos fenólicos e parâmetros de cor. Além disso, foi avaliado a solubilidade dos concentrados protéicos.

Capítulo 4. Características estruturais e reológicas dos géis de concentrados protéicos de amaranto obtidos por diferentes processos.

Neste capítulo, foi estudada a propriedade de gelificação dos concentrados protéicos obtidos pelos tratamentos estudados no Capítulo 3, utilizando ensaios reológicos sob compressão uniaxial (propriedades de textura e fratura) e cisalhamento em baixas deformações (varreduras de temperatura e tempo). Foram determinadas as temperaturas de início de gelificação dos concentrados protéicos. A capacidade de retenção de água e microscopia eletrônica de varredura dos géis dos concentrados protéicos também foram avaliadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AVANZA, V.; PUPPO, C.; AÑÓN, C. Rheological properties of amaranth protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 889-898, 2005.

BEJOSANO, F.P.; CORKE, H. Protein quality evaluation of *Amaranthus* whole meal flours and protein concentrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 100-106, 1998.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Amino acids, peptides, proteins. In: **Food Chemistry**. Springer, Alemanha, 1999. cap. 1, p. 9-89.

CLARK, A.H; KAVANAGH, G.M.; ROSS-MURPHY, S.B. Globular protein-gelation-theory and experiment. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 383-400, 2001.

COMFORT, S; HOWELL, N.K. Gelation properties of soya and whey protein isolate mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 661-672, 2002.

ESCUDERO, N.L.; ZIRULNIK, F.; GOMEZ, N.N.; MUCCIARELLI, S.I.; GIMÉNEZ, M.S. Influence of a protein concentrate from *Amaranthus cruentus* seeds on lipid metabolism. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, p. 50-59, 2006.

FINOT, P.K. Effect of processing and storage on the nutritional value of food proteins. In: **Food Proteins and Their Applications**; Damodaram, S., Paraf, A., Eds.; Dekker: New York, 1997. p. 551-577.

FOEGEDING, E.A.; BOWLAND, E.L.; HARDIN, C.C. Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 9, n. 4, p. 237-249, 1995.

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

L'HOCINE, L.; BOYE, Y.I.; ARCAND, Y. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 3, p. C137-C145, 2006.

LUQUEZ, N.G. DE; FERNÁNDEZ, S.; DE ARELLANO, M.; DE MUCCIARELLI, S. Concentrado protéico de *Amaranthus mantegazzianus*. Caracterización físico-químico-biológica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 47, n. 4, p. 359-361, 1997.

MAKRI, E.A.; PAPAÇAMPROU, E.M.; DOXASTAKIS. Textural properties of legume protein isolate and polysaccharide gels. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1855-1862, 2006.

MARCONE, M.F.; KAKUDA, Y. A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. **Nahrung**, v. 43, n.6, p. 368-373, 1999.

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

MAURI, A.N.; AÑÓN, M.C. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1064-1072, 2006.

MONDOR, M.; IPPERSIEL, D.; LAMARCHE, F.; BOYE, J. Production of soy protein concentrates using a combination of electroacidification and ultrafiltration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6991-6996, 2004.

MOURE, A.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Functionality of oilseed protein products: A review. **Food Research International**, v. 39, p. 945-963, 2006.

NIELSON, P. M. Functionality of protein hydrolysates. In: Damodaran, S.; Paraf, A. ed. **Food protein applications**. New York, Marcel Dekker Inc., 1997. p. 443-472.

ROSS-MURPHY, S.B. Rheology of biopolymer solutions and gels. In: E. DICKINSON **New physico-chemical techniques for the characterization of complex food systems**. Ed. Glaswov: Blackie Academic and Professional, 1995. p. 130-156.

RUBINO, M.I.; ARNTFIELD, S.D.; NADON, C.A.; BERNATSKY, A. Phenolic protein interactions in relation to the gelation properties of canola protein. **Food Research International**, v. 29, p. 653-659, 1996.

TIAN, S.; KYLE, W.S.A.; SMALL, D.M. Pilot scale isolation of proteins from field peas (*Pisum sativum* L.) for use as food ingredients. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 34, p. 33-39, 1999.

VOJDANI, F. Solubility. In: **Methods of testing protein functionality**. Hall, G. M. ed. Blackie Academic, Surrey, 1996. p. 9-60.

Capítulo 1

Revisão bibliográfica

1.1 Grão de amaranto

Os grãos de amaranto têm sido usados para alimentação humana de várias maneiras. Na Índia e no Peru, são utilizados como fonte de proteínas para as classes sociais mais pobres da população e são tradicionalmente indicados para pessoas que estão em convalescença (COSTA e BORGES, 2005). No México e no Peru, os grãos são expandidos e misturados com açúcar para formar um produto chamado de *alegria* (KAUFFMAN e WEBER, 1990). O uso mais comum é a moagem da semente torrada e a incorporação dessa farinha em uma variedade de produtos de panificação, tais como pães, pastéis, biscoitos e bolos (MARCONE e KAKUDA, 1999). No Peru, as sementes são também fermentadas para fazer *chicha* ou cerveja (EARLY, 1990).

Nas últimas décadas, o cultivo do amaranto tem-se difundido em vários países do mundo (México, América Central, Índia, regiões andinas da América do Sul, China, EUA e África). O futuro do amaranto na indústria de alimentos depende, então, do uso pretendido do produto e sua utilização pelo consumidor dependerá de suas propriedades físico-químicas, as quais fornecem uma função específica no produto final (MARTIROSYAN et al., 2007). O interesse no consumo desse grão, além de sua composição (proteínas e lipídios), é a presença de componentes como fibra alimentar, amido resistente, minerais, vitaminas e fenóis, que fazem deste grão um produto com potencial para a produção de alimentos saudáveis e para uso em formulações especiais (BERTI et al., 2005; COSTA e BORGES, 2005). Com a aplicação de processos modernos, tem-se dado um novo enfoque para a exploração do amaranto, tendo-se como objetivo utilizar o grão como fonte de ingredientes, como proteínas, carboidratos e fibras, que possam ser empregados como base para a fabricação de novos produtos (COSTA e BORGES, 2005). O amido é o componente presente no grão em maior quantidade, de 58 a 66%. O amido do amaranto é classificado como tipo *waxy*, com alto conteúdo de amilopectina, e baixa temperatura de gelatinização (BELLO-PÉREZ et al., 1998; ZAPOTOCZNY et al., 2006). Os grãos são ricos em fibras, que variam de 9 a 16%, dependendo da espécie (BUNZEL et al., 2005).

Um dos componentes mais importantes do grão de amaranto é a proteína, que varia entre 14 e 19% (MARCILIO et al., 2003; CORDERO-DE-LOS-SANTOS et al., 2004; AVANZA e AÑÓN, 2007). O grão de amaranto tem sido utilizado por pessoas portadoras da doença celíaca, pois não apresenta glúten em sua composição (THOMPSON, 2001; GUERRA-MATIAS, 2005). Apresenta-se, então, como matéria-prima atraente para elaboração de produtos destinados a pessoas com intolerância a outros grãos (TOSI et al., 2001; MARCILIO et al., 2003; BERTI et al., 2005).

O teor de óleo no grão varia de 3 a 11% (ZAPOTOCZNY et al., 2006) dos quais 76% são insaturados, sendo rico em ácido linoléico e ácido linolênico (COSTA e BORGES, 2005). Han-Ping et al. (2002) relataram que o óleo do amaranto contém quantidades maiores de esqualeno (2,4 a 8,0%) que outros óleos vegetais (farelo de arroz, germe de trigo e oliva) cujo teor varia de 0,1 a 0,7%.

Além dos macronutrientes, o grão de amaranto também contém altos teores de micronutrientes, principalmente cálcio, ferro e sódio (TOSI et al., 2001; COSTA e BORGES, 2005), e baixo nível de fatores antinutricionais quando comparado a outros grãos de cereais (LORENZ e WRIGHT, 1984; KLIMCZAK et al., 2002; GAMEL et al., 2006).

Devido à sua composição peculiar e valor nutricional, pesquisas sobre as sementes de amaranto têm focado seu interesse em benefícios à saúde, principalmente em doenças como diabetes, hiperlipidemia, obesidade, hipertensão, doenças coronárias, doença celíaca e fenilcetonúria (THOMPSON, 2001; HAN-PING et al., 2002; CZERWINSKI et al., 2004; KIM et al., 2006a; KIM et al., 2006b; BERTI et al., 2005; GUERRA-MATIAS e ARÊAS, 2005; MARTIROSYAN et al., 2007). Dietas contendo concentrado protéico de amaranto como fonte de proteína (12%) diminuíram em 33,6% o colesterol LDL e aumentaram em 46% o colesterol HDL de ratos Wistar, quando comparadas com a dieta controle que teve como fonte de proteína a caseína. Não houve diferenças significativas entre ambas as dietas sobre o colesterol total, porém, houve diminuição do nível de triglicéridos em 22% nos ratos alimentados com a dieta de concentrado protéico comparada com a dieta controle de caseína (ESCUDEIRO et al., 2005). Tironi e Añón (2007) consideraram a farinha e isolados protéicos de amaranto como fontes promissoras de peptídeos antioxidantes (polipeptídeos com massa molar na faixa de 3 a 56 kDa). Kim et al. (2006b) mostraram que as dietas suplementadas com grão de amaranto (500 g/kg de dieta) e fração de óleo (100 g/kg de

dieta) diminuíram significativamente os níveis de glicose e insulina no soro em ratos diabéticos alimentados por três semanas e a atividade antioxidante da enzima nos animais foi revertida para valores normais.

Segundo Silva-Sánchez et al. (2004), o valor nutricional das proteínas do grão de amaranto é equivalente ao do leite, da carne e do ovo. As proteínas do amaranto apresentam perfil aminoacídico balanceado em relação a cereais e leguminosas convencionais, incluindo lisina, aminoácidos sulfurados e triptofano (COSTA e BORGES, 2005). Segundo Marcílio et al. (2003), os aminoácidos limitantes das proteínas do amaranto, de acordo com o padrão da FAO (1985), são a leucina, seguida da valina e treonina. Além do perfil aminoacídico, a digestibilidade protéica calculada pelo PDCAAS (digestibilidade protéica corrigida pelo escore químico de aminoácidos) tem sido empregada para avaliar a qualidade nutricional. Bejosano e Corke (1998a) relataram valores de PDCAAS de 0,64 para farinha integral de amaranto e 0,71 para concentrados protéicos, sendo os valores maiores em relação ao trigo (0,40), aveia (0,57) e lentilha (0,52).

1.2 Proteínas do amaranto

As principais frações protéicas do grão de amaranto são albuminas, globulinas e glutelinas (MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996, SCILINGO et al., 2002). Segundo Avanza e Añón (2007), as albuminas são a principal fração protéica (49 a 65%), seguida pelas globulinas (22 a 42%) e glutelinas (14 a 18%). As albuminas têm sido citadas como proteínas globulares de baixa massa molecular (133,4 kDa), envolvidas em diferentes funções biológicas (AVANZA et al., 2005b; AVANZA e AÑÓN, 2007). Dois tipos de albumina foram descritos: albumina-1, extraída da farinha com soluções aquosas ou sais, e albumina-2, obtida por extração aquosa após extração da albumina-1 e globulinas (GORINSTEIN et al., 1996; MARTINEZ et al., 1997).

As globulinas são compostas de globulina-11S (amarantina), globulina-P (globulina I ou albumina-2) e quantidades pequenas de globulina-7S (conamarantin) (AVANZA e AÑÓN, 2007). A globulina-11S apresenta massa molecular (389 kDa) e características moleculares semelhantes às das globulinas de leguminosas (MARCONE e YADA, 1991; MARCONE e YADA, 1992; CHEN e PAREDES-LÓPEZ, 1997; CASTELLANI et al., 2000), com estrutura quaternária dodecamérica formada por subunidades ácidas (massa

molecular de 30 a 40 kDa) e sub-unidades básicas (massa molecular ao redor de 20 kDa) ligadas por uma ligação dissulfeto (SEGURA NIETO et al., 1994). A globulina-P é composta de moléculas unitárias com massa molecular e composição de polipeptídeos (polipeptídeos A, polipeptídeos B e subunidades polipeptídicas M) semelhante à globulina-11S. A globulina-P, no entanto, possui alta entalpia de desnaturação, baixa solubilidade em solução aquosa neutra, tende a polimerizar e contém maior proporção de subunidades monoméricas de 54 kDa que a globulina 11S (MARTÍNEZ et al., 1997). A globulina 7S do amaranto tem sido caracterizada como um hetero-oligômero com massa molecular de 186 kDa formada por oito sub-unidades unidas por ligações não covalentes (MARCONE, 1999). Segundo Segura-Nieto et al. (1994), as glutelinas apresentam características moleculares semelhantes às da globulina 11S.

1.3 Isolados e concentrados protéicos de amaranto

A utilização de isolados protéicos pela indústria de alimentos tem aumentado na última década devido ao seu elevado valor nutricional, boa funcionalidade, elevado teor de proteínas, chegando até 95%, e baixo teor de fatores antinutricionais (SALCEDO-CHÁVEZ et al., 2002; CORDERO-DE-LOS-SANTOS et al., 2005). Os isolados protéicos são, em geral, obtidos seguindo-se o processo convencional: extração protéica da farinha desengordurada com solução de álcali (pH 8,0 a 11), seguida por precipitação da proteína no ponto isoelétrico na faixa de pH 4,0 a 5,0 e neutralização (PAREDES-LÓPEZ et al., 1994). Embora isolados protéicos sejam aqueles produtos com mais de 90% de proteína e concentrados protéicos aqueles que apresentam teor de proteína superior a 70%, na literatura científica sobre processos de obtenção de produtos a partir de grãos de amaranto, os produtos, independentemente do teor protéico, são denominados isolados, devido ao processo utilizado (MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996; FIDANTSI e DOXASTAKIS, 2001; SALCEDO-CHÁVEZ et al., 2002). Para leguminosas como a soja, a ANVISA (Resolução de Diretoria Colegiada – RDC, Nº 268, 2005) denomina como isolado teores de proteína de no mínimo 88% (b.s.), enquanto os concentrados devem possuir teores mínimos de 68% (b.s.). Além da proteína, concentrados protéicos apresentam outros componentes como amido, celulose e hemicelulose, os carboidratos totais, que representam de 25 a 30% dos componentes (LUQUEZ et al., 1996; LUQUEZ et al., 1997; FUKUSHIMA, 2000).

O processo de obtenção de isolados protéicos de amaranto foi estudado por diversos autores. Martínez e Añón (1996) obtiveram isolados protéicos de amaranto com teores de proteína de 80 a 90% utilizando diferentes condições de extração e precipitação: extração na faixa de pH 8,0 a 11,0 e precipitação em pH 5,0 e extração de proteínas a pH 9,0 e precipitação na faixa de pH 3,0 a 7,0. Salcedo-Chávez et al. (2002) relataram a obtenção de isolados protéicos por otimização do processo convencional (extração protéica na faixa de pH 8,0 a 9,0 e precipitação isoelétrica na faixa de pH 4,0 a 6,0), resultando em teores de proteína de 75,8% em condições intermediárias de pH de extração e precipitação (8,5 e 5,0, respectivamente), e 83,4% em condições máximas de pH de extração (9,0) e baixas de pH de precipitação (4,5). Ambos os grupos de pesquisadores observaram a diminuição da entalpia de transição dos isolados, 1,5 a 6,9 J/g, indicando alta proporção de interações hidrofóbicas ou agregação, devido à desnaturação parcial da proteína por efeitos do processo isoelétrico.

Outro dos processos relatados para obtenção de isolados protéicos de amaranto é o processo de micelação, o qual resulta em menor grau de desnaturação quando comparado com o processo isoelétrico. Neste método, a recuperação da proteína é realizada por diminuição da força iônica do meio no qual as proteínas são solubilizadas, seguido de precipitação na forma de micelas (PAREDES-LÓPEZ et al., 1994). Isolados protéicos de amaranto obtidos por processos de precipitação isoelétrica e micelação apresentaram 93,1 e 80,2% de proteína, respectivamente (CORDERO-DE-LOS-SANTOS et al., 2005).

A influência da força iônica na obtenção de isolados também foi avaliada. Isolados protéicos de amaranto obtidos a partir da farinha desengordurada, 15,6% de proteína, por precipitação isoelétrica e diálise apresentaram 36 e 67% de proteína, respectivamente. As diferenças nos teores de proteína foram atribuídas às frações protéicas presentes em cada isolado (FIDANTSI e DOXASTAKIS, 2001).

Bejosano e Corke (1998a) obtiveram concentrados protéicos de amaranto por moagem via úmida e alcalina (NaOH 0,25% por 24h), seguido de precipitação isoelétrica do soro protéico e posterior secagem (70 °C por 12 h). O teor de proteína dos concentrados protéicos variou de 67,4 a 75,3%, e foram considerados adequados para substituição parcial de farinha de trigo na produção de pães e pastéis (BEJOSANO e CORKE, 1998b) e substituição parcial de carne em produtos tipo emulsão (BEJOSANO e CORKE, 1998c).

Concentrados protéicos de amaranto obtidos por solubilização da proteína em pH 11,0 e precipitação a pH 4,5, seguidas por secagem do precipitado a 40 a 45 °C por 48 h, apresentaram 50,9% de proteína, teor comparável ao da farinha de soja, 57,5% (LUQUEZ et al., 1996). Nestas metodologias, o pH de extração utilizado para aumentar o rendimento de extração da proteína é ≥ 10 , o que pode levar à reações indesejáveis, como a formação de lisoalanina, resultando na diminuição da digestibilidade e do valor biológico da proteína (FINOT, 1997).

1.4 Funcionalidade das proteínas do amaranto

As propriedades funcionais das proteínas são propriedades físico-químicas que, além de governar seu comportamento em sistemas alimentares durante sua preparação, processamento, estocagem e consumo (KINSELLA et al., 1989; AVANZA et al., 2005a), determinam, em última instância, se são desejáveis ou não como ingredientes alimentares (MARCONE e KAKUDA, 1999). A funcionalidade das proteínas em um sistema alimentar é determinada por fatores intrínsecos (composição e concentração da proteína, hidrofobicidade ou hidrofiliicidade, ponto isoelétrico, etc), fatores extrínsecos (temperatura, pH, sais, etc), composição do sistema modelo e os diferentes tratamentos ou condições de processo usados em sua preparação (temperatura, tempo, concentração de proteína, pH e força iônica) (CORDERO-DE-LOS-SANTOS et al., 2005). A maioria dos fatores extrínsecos e condições ou tratamento de processos são governados pelo sistema alimentar e por condições de estocagem e processamento. Os fatores intrínsecos são integralmente característicos da proteína e são desejáveis para uma variedade de modificações. As três principais estratégias que têm sido estudadas para modificação de proteínas são: a modificação química, tratamento com calor e modificação enzimática (VOJDANI e WHITAKER, 1994; PANYAM e KILARA, 1996).

As principais propriedades funcionais das proteínas são: solubilidade, absorção de água, gelificação, emulsificação e formação de espuma e essas propriedades são em geral prejudicadas em pH próximo de seu ponto isoelétrico (PANYAM e KILARA, 1996). As propriedades funcionais da proteína podem influenciar as características sensoriais do alimento, tais como: cor, aroma e textura. Algumas propriedades como solubilidade, formação e estabilidade de emulsões e espumas, viscosidade, adesão e gelificação, são

influenciadas amplamente pelas propriedades físico-químicas das proteínas, tais como: composição, conformação, hidrofobicidade e estabilidade térmica (LAWRENCE e NIELSEN, 2001; SCHWENKE, 2001).

1.4.1 Solubilidade

A solubilidade é um atributo funcional crítico das proteínas requerido nas formulações. Proteínas altamente solúveis são desejáveis quando propriedades de gelificação, emulsificação e formação de espuma são requeridas (DAMODARAM, 1996). As características de solubilidade protéica dependem da hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos e da carga da proteína, além das características químicas e físicas da superfície protéica, e de características termodinâmicas de sua interação com o solvente (DAMODARAN, 1996). Interações hidrofóbicas e iônicas influenciam na solubilidade das proteínas. As interações hidrofóbicas promovem interações proteína-proteína que resultam em diminuição da solubilidade, enquanto interações iônicas promovem interações proteína-água que resultam em aumento da solubilidade (DAMODARAM, 1996; KRISTINSSON e RASCO, 2000).

Modificações químicas tais como acetilação ou succinilação têm sido usadas para melhorar a solubilidade das proteínas pela substituição dos grupos ϵ -amino. Contudo, podem prejudicar a digestibilidade da proteína (MARCONE e KAKUDA, 1999). Por outro lado, a modificação enzimática das proteínas tem resultado em melhoras da solubilidade (BEJOSANO e CORKE, 1999; CLEMENTE et al., 2000; TSUMURA et al., 2005).

O perfil de solubilidade protéica também é afetado pelo aquecimento, variação de pH e da força iônica, tipos de íon, polaridade do solvente e condições de processo (DAMODARAN, 1996; FIDANTSI e DOXASTAKIS, 2001). Dependendo da estabilidade térmica das proteínas e das condições de aquecimento, as proteínas podem ser parcial ou totalmente desnaturadas chegando a agregar, alterando sua solubilidade (PETRUCCELLI e AÑÓN, 1995).

As proteínas de amaranto apresentam baixa solubilidade em solventes aquosos, assim, para mudar sua conformação, têm sido utilizadas diferentes condições de pH, força iônica e temperatura, resultando em produtos com diferentes composições, características

estruturais e funcionais (MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996; MAHAJAN e DUA, 2002; AVANZA e AÑÓN, 2007).

Marcone e Kakuda (1999) reportaram que isolados de globulinas de amaranto (IGA) apresentaram melhor solubilidade do que isolados de globulinas de soja (IGS), principalmente ao redor do ponto isoelétrico. A solubilidade do IGA foi nove vezes maior que a do IGS na região de pH 5 a 6. Esses autores concluíram que o IGA, além de apresentar melhor qualidade nutricional do que o IGS, apresentou bom potencial para ser incluído na formulação de alimentos.

Cordero-de-los-Santos et al. (2005) determinaram a solubilidade de dois isolados protéicos de amaranto obtidos por precipitação isoelétrica (PI) e por micelação (PM). Os isolados foram caracterizados por alta solubilidade em pH alcalino, mínima ao redor do ponto isoelétrico e moderada na região ácida. Em pH 5,0, o PI apresentou maior solubilidade do que o PM, o mesmo aconteceu quando foi comparado com o isolado protéico de soja em pH 6,0. As diferenças observadas foram atribuídas aos processos de obtenção dos isolados protéicos assim como às proteínas presentes nos isolados. No amaranto, as albuminas e globulinas representam 67% da proteína total, as glutelinas 21% e as prolaminas 1,2%. Em contraste, 90% da proteína total da soja são globulinas e 10% albuminas, sendo que as globulinas são mais solúveis em pH neutro. Scilingo et al. (2002) avaliaram a estrutura e solubilidade de isolados protéicos de amaranto tratados a 90 °C por 10 minutos. Os resultados mostraram agregação e dissociação de proteínas com perda de solubilidade do isolado. Bejosano e Corke (1999) relataram que os concentrados protéicos obtidos via moagem úmida e alcalina, seguida da precipitação isoelétrica do soro protéico, apresentaram melhor solubilidade do que o isolado protéico de soja comercial. Segundo estes autores, é possível produzir concentrados protéicos funcionais como subprodutos da extração do amido de amaranto.

1.4.2 Gelificação

A gelificação é uma das propriedades funcionais de maior importância em sistemas alimentares. Alterações conformacionais da proteína e no seu estado de agregação influenciam a formação da rede de gel tridimensional, a viscoelasticidade e a capacidade de retenção da água com mínima sinérese (DICKINSON, 1998). O processo de formação de

gel também é afetado pela concentração, composição e grau de desnaturação da proteína. Quatro transições moleculares, que são intrínsecas às proteínas, ocorrem durante a gelificação de proteínas globulares quando aquecidas: desnaturação ou desdobramento da proteína nativa, agregação da molécula desdobrada, formação da estrutura linear (fios) dos agregados e associação de fios para formar a rede (AGUILERA, 1995). A rede protéica formada durante o processo de gelificação ocorre principalmente por causa do aumento das interações proteína-proteína e diminuição das interações proteína-água, e de forças de atração e repulsão que ocorrem entre cadeias polipeptídicas adjacentes (PANYAM e KILARA, 1996; MATSUMURA e MORI, 1996; AVANZA et al., 2005a). Coagulação das proteínas é observada quando prevalecem interações proteína-proteína (PANYAM e KILARA, 1996). As forças de atração incluem interações covalentes e não covalentes e a participação de cada tipo de interação depende da natureza da proteína, do pH e da força iônica do meio (PANYAM e KILARA, 1996; PUPPO et al., 1995). Entretanto, as forças de repulsão que atuam principalmente em valores de pH distantes do ponto isoelétrico e as interações proteína-água que ajudam na separação das cadeias polipeptídicas, favorecem a formação de uma matriz homogênea (HEERTJE, 1993).

Firmeza, microestrutura e transparência de géis podem ser controladas pelas condições do meio de gelificação. Próximo do ponto isoelétrico, as proteínas formam géis particulados e opacos. No entanto, géis homogêneos, transparentes, fortes e de fios finos, são formados em pH distantes do ponto isoelétrico. A transparência dos géis pode ser controlada pela força iônica do meio ou pelas taxas de aquecimento (KITABATAKE e DOI, 1993; FOEGEDING et al., 1995).

As ligações dissulfeto geralmente aumentam a dureza da matriz do gel, enquanto as interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio contribuem para a manutenção da estrutura da rede (ZHENG et al., 1993; PUPPO e AÑÓN, 1998). As ligações dissulfeto, formadas durante o aquecimento, produzem géis irreversíveis, como ocorre com a ovalbumina (VAN KLEEF, 1986) e a β -lactoglobulina (CLARK et al., 2001). Em contraste, os géis de gelatina são estabilizados reversivelmente pelas ligações de hidrogênio (LEDWARD, 1986).

Com o aumento da concentração de proteína (10 a 20% p/v), temperatura (70 a 95 °C) e tempo de aquecimento (10 a 30 minutos), os géis de isolados protéicos de amaranto formaram uma matriz mais ordenada, estabilizada principalmente por ligações dissulfeto e

em menor extensão por interações não covalentes, principalmente ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. O aumento na concentração de proteína levou à formação de matrizes com alta capacidade de retenção de água, no entanto, o aumento na temperatura de aquecimento produziu géis de maior transparência e baixa capacidade de retenção de água. As globulinas do amaranço (11S e P) participaram na estrutura do gel via agregados de alta massa molar, maior que 100 kDa (AVANZA et al., 2005a). A caracterização reológica dos géis protéicos de amaranço mostrou que os géis formados foram elásticos ($\tan \delta < 0,1$), de alta dureza, fraturabilidade e coesividade, contudo apresentaram baixa adesividade (AVANZA et al., 2005b).

1.5 Influência das condições de processo na funcionalidade da proteína

No isolamento e purificação de proteínas a partir do material nativo e no processamento de sistemas alimentares multicomponentes para obtenção do produto final, as proteínas alimentares são sujeitas à diversos tratamentos que podem causar alterações em suas propriedades funcionais e físico-químicas. Processos de secagem, tratamento com solventes, ajuste de pH, aquecimento, estocagem e o uso de aditivos tais como sais, açúcares e detergentes têm influenciado na funcionalidade das proteínas (MA e HARWALKAR, 1991).

1.5.1 Efeito do sal

Os sais são comumente usados nas formulações, concentrações de 0,2 a 0,3 M são empregadas na maioria de produtos alimentares e o pH do alimento se altera na presença de sais durante o processamento térmico (MAHAJAN e DUA, 2002). A adição do sal produz aumento progressivo na temperatura de desnaturação das proteínas. Este efeito é atribuído ao aumento das interações hidrofóbicas que contribuem para a manutenção da conformação nativa, via modificação da estrutura da água (MA e HARWALKAR, 1991). O grau que a estrutura da água é atingida depende da natureza dos cátions ou ânions, seguindo a série *Hofmeister* ou série liotrópica. Assim, cátions e ânions (Ca^{2+} , SCN^-) correspondentes ao nível superior da série resultam na maior desestruturação, promovendo enfraquecimento das interações hidrofóbicas intramoleculares e aumento no desdobramento da proteína, e

conseqüentemente, a diminuição da temperatura e entalpia de desnaturação (MA e HARWALKAR, 1991; SCILINGO e AÑÓN, 2004).

MAHAJAN e DUA (2002) estudaram a influência de sais (0,2 a 1,0 mol/L) e do pH (2 a 12) na funcionalidade das proteínas do amaranto. Observaram que a capacidade de absorção da água e a solubilidade das proteínas foi melhorada na presença de NaCl. Tal fato foi atribuído ao efeito *salting in* do NaCl sobre as interações hidrofóbicas, diminuindo a agregação e aumentando a solubilidade protéica. Na presença de NaHCO₃, a solubilidade foi menor nas concentrações 0,4 e 0,6 mol/L, devido à proteção eletrostática dos grupos carregados pelos sais, os quais diminuíram a repulsão eletrostática e aumentaram as interações hidrofóbicas. Fidantsi e Doxastakis (2001), avaliando o efeito dos sais sobre o comportamento estrutural dos isolados protéicos de amaranto obtidos por precipitação isoeletrica ou extração protéica seguida de diálise, observaram que NaCl, nas concentrações de 0,2 e 0,4 mol/L, diminuiu a solubilidade da proteína, modificando a estrutura e conformação protéica.

Em estudo com isolados protéicos de soja, que tem estrutura semelhante às do amaranto, foi relatado que a adição de pequenas quantidades de sais de cálcio (1,23 a 5,0 mg/g proteína) induziu a formação de agregados solúveis, enquanto que maiores concentrações (5,0 a 9,73 mg/g proteína) levaram à insolubilização seletiva da fração glicinina. A adição desse íon também aumentou a estabilidade térmica da proteína (SCILINGO e AÑÓN, 2004).

1.5.2 Efeito do pH

Na produção de isolados protéicos, o ajuste de pH é requerido para a extração e precipitação isoeletrica das proteínas. Valores extremos de pH geralmente diminuem a temperatura e entalpia de desnaturação, daí a importância de controlar cuidadosamente o pH durante a extração e processamento das proteínas (MA e HARWALKAR, 1991). Os valores de pH próximos da região isoeletrica provocam desnaturação e desdobramento das proteínas, com exposição de grupos sulfidril e hidrofóbicos (MAURI e AÑÓN, 2006).

Martínez e Añón (1996) analisaram os efeitos das condições de extração e precipitação sobre o comportamento calorimétrico e eletroforético das proteínas de amaranto. Quando a extração foi realizada em pH maior que 9,0 e a precipitação em pH

menor que 5,0, houve diminuição da estabilidade térmica e maior desnaturação protéica. Salcedo-Chávez et al. (2002) avaliaram diferentes combinações de pH de extração (7,8 a 9,2) e pH de precipitação (4,3 a 5,7) para a produção de isolados protéicos de amaranto. As melhores respostas de concentração de proteína, entalpia e temperatura de desnaturação foram obtidas em pH de extração 9,2 ou 8,0 e pH de precipitação 5,7. Fidantsi e Doxastakis (2001) compararam o comportamento térmico de isolados protéicos de amaranto obtidos por processos de precipitação isoeletrica e diálise. Dispersões de isolados protéicos de ambos os processos foram tratadas a 75 °C por 15 minutos. Os isolados obtidos pelo processo de diálise foram mais efetivos na estabilização de emulsões do que isolados obtidos pelo processo isoeletrico, quando avaliados a valores de pH 5,5 e 7,0.

O efeito do pH nas propriedades térmicas de soluções de isolados protéicos de soja para formação de filmes protéicos foi avaliado a diferentes valores de pH (2,0; 8,0 e 11,0). O tratamento ácido resultou em diminuição da entalpia de desnaturação, indicando forte desnaturação da glicinina e parcial desnaturação da β -conglucina. Por outro lado, o tratamento alcalino, pH 8,0, levou à forte desnaturação da β -conglucina e desnaturação parcial da glicinina, enquanto a pH 11,0 foram observadas baixas temperaturas de desnaturação para ambas as frações protéicas, com separação e alargamento dos picos, indicando que houve perda de cooperatividade no decorrer da desnaturação (MAURI e AÑÓN, 2006). Os autores concluíram que as proteínas com tratamento prévio à formação do filme foram desnaturadas, formando agregados insolúveis que afetaram a solubilidade do filme.

1.5.3 Efeito da temperatura

O aquecimento é amplamente usado no preparo de alimentos e têm influência significativa sobre a conformação protéica. Dependendo das condições de aquecimento, as proteínas podem sofrer desnaturação parcial ou total e podem agregar mudando seu comportamento funcional (SCILINGO et al., 2002). O efeito do tratamento térmico (70 e 90 °C, por 3, 5, 10, 15 e 30 minutos) de isolados protéicos de amaranto, obtidos por extração protéica a pH 9,0 e 11,0, seguida por precipitação isoeletrica a pH 5,0, foi estudado por Avanza e Añón (2007). O tratamento térmico formou agregados de alta massa molecular estabilizados por ligações dissulfeto e ligações não covalentes. Houve uma

desnaturação de 30% quando os isolados protéicos foram tratados a 70 °C, entretanto, a 90 °C, o isolado protéico obtido a pH 9,0 foi mais desnaturado que o isolado protéico obtido a pH 11,0 (75 e 55% de desnaturação, respectivamente). Após 30 minutos de tratamento, foi observada diminuição na solubilidade da proteína, cerca de 35%, para os isolados extraídos a pH 9,0 com relação ao isolado não tratado, no entanto, a diminuição na solubilidade foi próxima a 50% para o mesmo isolado tratado a 90 °C. Ambos os tratamentos, a 70 ou 90 °C, afetaram a solubilidade do isolado obtido a pH 11,0, o qual apresentou diminuição de solubilidade de 10% em relação ao isolado não tratado.

No estudo de Gamel et al. (2006), farinhas de amaranto obtidas a partir de sementes tratadas sob as seguintes condições: pressão por 15 minutos e secagem a 50 °C por 16 h, sementes expandidas a 180 °C por 10 segundos e sementes germinadas a 32 °C por 48 h seguidos de secagem a 30 e 60 °C foram avaliadas. O tratamento térmico diminuiu a solubilidade em 23 e 30% das sementes submetidas à pressão e das sementes expandidas, respectivamente e foi observado aumento da solubilidade em 7% das proteínas das farinhas derivadas de sementes germinadas e secas a 30 e 60 °C.

1.6 Influência de componentes alimentares e ingredientes não protéicos na funcionalidade da proteína

Na obtenção de produtos protéicos, vários constituintes alimentares (carboidratos, lipídios, fibra e compostos antinutricionais) interferem com a extração da proteína e podem ter influência nas propriedades funcionais das proteínas.

Os polifenóis têm sido citados como responsáveis pela cor dos isolados protéicos de vegetais devido aos produtos da reação proteína-fenol, que resulta em polímeros altamente corados (MARCONE e KAKUDA, 1999; XU e DIOSADY, 2002). Sob condições alcalinas, os compostos fenólicos sofrem rápida oxidação enzimática e não enzimática, formando quinonas que logo reagem com as proteínas resultando em uma solução de cor marrom escura que é eliminada com a lavagem do isolado protéico após precipitação isoeletrica (SOSULSKI, 1979). Os compostos fenólicos podem se ligar às proteínas por vários mecanismos em meio aquoso, incluindo ligações de hidrogênio, ligações covalentes, interações hidrofóbicas e ligações iônicas. A reação proteína-polifenol é influenciada pelo pH, nível de oxigênio, tempo e temperatura (BEJOSANO e CORKE, 1998a). A

complexidade desses mecanismos torna difícil a extração de proteínas. Segundo Xu e Diosady. (2002), vários processos têm sido avaliados para a remoção de compostos fenólicos das proteínas, tais como: diafiltração, tratamento com NaCl 0,05 mol/L e tratamento com NaCl 0,05 mol/L seguido de diafiltração, porém, estes tratamentos apresentaram remoção incompleta, perda de proteína e custo excessivo.

Estudos comparativos das propriedades funcionais de isolados de globulina de amaranto (IGA) e isolados de globulina de soja (IGS) revelaram que os IGA foram significativamente mais escuros ($p < 0,05$) que os IGS, o que sugeriu a presença de taninos indesejáveis do tegumento do amaranto, co-precipitados com a proteína na extração e preparação de isolados de amaranto levando às diferenças na cor (MARCONE e KAKUDA, 1999). Os mesmos resultados de cor foram observados para isolados protéicos de amaranto obtidos por precipitação isoeletrica e micelação (CORDERO-DE-LOS-SANTOS et al., 2005).

O efeito dos compostos fenólicos também foi relatado para outros produtos protéicos de origem vegetal. Processos de extração foram desenvolvidos para produzir extratos protéicos de girassol usando sais de magnésio e Na_2SO_3 , resultando em extrato protéico com menor pigmentação (INRA, 1979). A remoção de compostos fenólicos livres de isolados protéicos de canola foi realizada por diafiltração do extrato alcalino prévio à precipitação isoeletrica ou diafiltração após tratamentos com NaCl 0,05 mol/L ou NaCl 0,05 mol/L e SDS 0,1%. Para reduzir os efeitos de oxidação sobre o *flavour* do produto, Na_2SO_3 0,1% foi adicionado à solução de extração, como um agente redutor. O uso combinado desses tratamentos foi bem sucedido na redução do conteúdo fenólico de um 80 a 90% (XU e DIOSADY, 2002). Isolados protéicos de soja obtidos por tratamento ácido (lavagem ácida prévia à extração protéica) apresentaram maior solubilidade quando comparados com o tratamento controle, atribuindo-se tal fato à eliminação parcial de compostos fenólicos durante o processo de extração (L'HOCINE et al., 2006).

1.7. Propriedades reológicas das proteínas

A reologia é a ciência que estuda a relação que existe entre as forças externas que atuam sobre um corpo e a deformação ou escoamento que estas produzem (STEFFE, 1996). Os alimentos são materiais estruturais e reologicamente complexos que, em geral, se

comportam como um material viscoelástico, cujo comportamento é independente da magnitude de tensão ou deformação aplicada, sendo apenas função do tempo (STEFFE, 1996). O comportamento viscoelástico dos alimentos vem sendo amplamente estudado em reômetros que cisalham a amostra, enquanto que parâmetros reológicos por compressão são utilizados na caracterização da textura dos alimentos (COMFORT e HOWELL, 2002; AVANZA et al., 2005b; CAVALLIERI e CUNHA, 2008).

A gelificação, uma das propriedades funcionais de importância das proteínas é entendida experimentalmente a partir de ensaios reológicos a baixas e altas deformações.

1.7.1 Propriedades reológicas a baixas deformações

A viscoelasticidade linear é caracterizada em deformações muito pequenas onde a estrutura molecular praticamente não é afetada e, neste caso, pode-se dizer que os efeitos elásticos seguem a lei de Hooke e os efeitos viscosos obedecem a lei de Newton (BARNES et al., 1989). Os ensaios em cisalhamento oscilatório que determinam as relações entre tensão, deformação e tempo, são úteis para caracterizar a conformação macromolecular e interações intermoleculares. A cinética do processo de gelificação pode ser monitorada através de varreduras de tempo ou temperatura e um dos critérios mais utilizados para a determinação do ponto de gel é o da igualdade dos módulos de armazenamento (G') e de dissipação de energia (G'') (PILOSOF, 2000). A fim de melhor visualizar este evento, o desenvolvimento da estrutura pode ser monitorado pela variação no módulo de armazenamento (G') em função da temperatura (dG'/dT).

1.7.2 Propriedades reológicas a altas deformações

Os ensaios a altas deformações são úteis para obter parâmetros reológicos correspondentes às condições de processamento e propriedades sensoriais (MATSUMURA e MORI, 1996). A caracterização da textura do gel a altas deformações tem sido avaliada por métodos imitativos (Análise do Perfil de Textura - TPA) e métodos fundamentais (propriedades mecânicas ou de fratura). Ambos os ensaios são realizados por compressão uniaxial, onde uma determinada deformação (ϵ) é imposta ao gel, e a resposta a esta deformação é a tensão normal (σ), tomada em função do tempo.

Os métodos imitativos imitam as condições que se usam na prática, não usam correlações fundamentais para descrever a textura do produto e a reprodutibilidade é alcançada se há bastante cuidado no preparo da amostra e execução do ensaio. O TPA é um ensaio de compressão uniaxial de dois ciclos que imita a ação de mastigar os dentes, onde diversos parâmetros tais como dureza, fraturabilidade, coesividade, adesividade e elasticidade podem ser obtidas da curva força *versus* tempo (BOURNE, 2002).

Os ensaios fundamentais medem propriedades reológicas bem definidas e a compressão uniaxial é de um ciclo. Neste ensaio se avalia as forças e deformações requeridas para causar ruptura do gel. No ponto de ruptura, determinam-se as propriedades que fornecem informações sobre as características do material e podem ser correlacionadas com a textura do produto (TPA). Estas propriedades são: tensão na ruptura (σ_R), a qual reflete a dureza do gel, e a deformação na ruptura (ϵ_R), indicador da coesividade do gel, apresentadas pelas Equações 1 e 2 (WALKENSTRÖM e HERMANSSON, 1994).

$$\sigma_R = F(t) \left[\frac{H(t)}{H_0 A_0} \right] \quad (1)$$

$$\epsilon_R = - \ln \left[\frac{H(t)}{H_0} \right] \quad (2)$$

onde $F(t)$ é a força [N], A_0 [m²] e H_0 [m] são, respectivamente, a área e a altura iniciais da amostra de gel, e $H(t)$ é a altura do gel no tempo t .

As propriedades mecânicas do gel (σ_R , ϵ_R) são determinadas a partir da curva tensão *versus* deformação de Henky, sendo o ponto de ruptura o valor máximo desta curva (STEFFE, 1996).

Outro parâmetro característico do gel é o módulo de elasticidade (E), que é determinado a partir da tangente da região linear inicial da curva tensão-deformação (ROSENTHAL, 1999). Este parâmetro intrínseco do material está correlacionado com a firmeza do gel.

1.8 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, J.M. Gelation of whey proteins. **Food Technology**, v. 49, p. 83-86, 88-89, 1995.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal**. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC, Nº 268, 2005.

AVANZA, M.V.; 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.

AVANZA, V., PUPPO, C., AÑÓN, C. Structural characterization of amaranth protein gels. **Journal of Food Science: Engineering and Physical Properties**. v. 70, n. 3, p. E223-E229; 2005a

AVANZA, M.V.; PUPPO, M.C.; AÑÓN, M.C. Rheological characterization of amaranth protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 889-898, 2005b.

BARNES, H.A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989.

BEJOSANO, F.P.; CORKE, H. Protein quality evaluation of *Amaranthus* whole meal flours and protein concentrates. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 100-106, 1998a.

BEJOSANO, F.P.; CORKE, H. Effect of *Amaranthus* and buckwheat proteins on wheat dough properties and noodle quality. **Cereal Chemistry**, v. 75, p. 171-176, 1998b

BEJOSANO, F.P.; CORKE, H. *Amaranthus* and buckwheat protein concentrate effects on emulsion-type meat product. **Meat Science**, v. 50, n. 3, p. 343-353, 1998c.

BEJOSANO, F.P.; CORKE, H. Properties of protein concentrates and hydrolysates from *Amaranthus* and buckwheat. **Industrial Crops and Products**, v. 10, p. 175, 183, 1999.

BELLO-PÉREZ, L.; COLONNA, P.; ROGER, P. PAREDES-LÓPEZ, O. Macromolecular features of amaranth starch. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 395-402, 1998.

BERTI, C.; RISO, P.; BRUSAMOLINO, A.; PORRINI, M. Effect on appetite control of minor cereal and pseudocereal products. **British Journal of Nutrition**, n. 94, p. 850-858, 2005.

BOURNE, M.C. Texture, viscosity and food. In: **Food texture and viscosity: Concept and measurement**. Academic Press, Geneva, New York, 2002. cap. 1, p. 1-32.

BUNZEL, M.; RALPH, J.; STEINHART, H. Association of non-starch polysaccharides and acid ferulic in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, p. 551-559, 2005.

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.

CAVALLIERI, A.L. F and CUNHA, R.L. The effects of acidic rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 439-448, 2008.

CHEN, S.; PAREDES-LOPEZ, O. Isolation and characterization of the 11S globulin from amaranth seeds. **Journal of Food Biochemistry**, v. 21, n.1, p. 53-65, 1997.

CLARK, A. H; KAVANAGH, G. M.; ROSS-MURPHY, S. B. Globular protein gelation-theory and experiment. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 383-400, 2001.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 254-262, 2000.

COMFORT, S; HOWELL, N.K. Gelation properties of soya and whey protein isolate mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 661-672, 2002.

CORDERO-DE-LOS-SANTOS, M.; OSUNA-CASTRO, J.; BORODANENKO, A.; PAREDES-LÓPEZ. Physicochemical and functional characterization of amaranthus (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 4, p. 269-280, 2005.

COSTA, A.; BORGES, A. Avaliação da produção agrícola do amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). **Holos**, v. 21, p. 97-111, 2005.

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

DAMODARAM, S. Functional properties. In: Nakai, S., Modler, W. **Food proteins: properties and characterization**. Wiley-VCH, Inc. 1996. p. 167-234.

DICKINSON, E. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 347-354, 1998.

EARLY, D.K. Amaranth production in Mexico and Peru. In: JANICK, J. and SIMON J.E. **Advances in New Crops**. Timber Press, Portland, OR., 1990. p. 140-142.

ESCUDERO, N.L.; ZIRULNIK, F.; GOMEZ, N.N.; MUCCIARELLI, S.I.; GIMÉNEZ, M.S. Influence of a protein concentrate from *Amaranthus cruentus* seeds on lipid metabolism. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, p. 50-59, 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.

FINOT, P.K. Effect of processing and storage on the nutritional value of food proteins. In: **Food Proteins and Their Applications**; Damodaram, S., Paraf, A., Eds.; Dekker: New York, 1997; pp 551-577.

FOEGEDING, E.A.; BOWLAND, E.L.; HARDIN, C.C. Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 9, n. 4, p. 237-249, 1995.

FUKUSHIMA, D. Soybean Processing. In: NAKAI and MODLER. **Food proteins: processing applications**. Ed. Wiley-VCH, Inc. 2000. p. 309-342.

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

GORINSTEIN, S.; ZEMSER, M.; FRIEDMAN, M.; VASCO-MENDEZ, N.L.; PAREDEZ-LÓPEZ, O. Denaturant-induced conformations of globulins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 93-99, 1996.

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

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

HEERTJE, I. Structure and function of food products: a review. **Food Structure**, v. 12, p. 343-364, 1993.

INRA INST NAT RECH AGRONOMIQUE. **Purifying proteins extracts from sunflower kernels-by processing from suspension containing alkaline earth or magnesium salts and sodium sulphite**. n. US4174313-A, 13 nov. 1979.

KAUFFMAN, C.S.; WEBER, L.E. Grain amaranth. In: Janick J. and Simon, E. **Advances in New Crops**. Timber, Portland, OR, 1990. p. 127-139.

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, p. 195-199, 2006b.

KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D.M.; BRADY, J.; BRINGE, N.A. Milk proteins: Possible relationship of structure and function. In: Fox, P. F. **Developments in Dairy Chemistry**. Ed. Elsevier, 1989. p. 55-95.

KITABATAKE, N.; DOI, E. Improvement of protein gel by physical and enzymatic treatment. **Food Reviews International**, v. 9. p. 445-471, 1993.

KLIMCZAK, M.; MALECKA, M.; PACHOLEK, B. Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. **Nahrung**, v. 46, n. 3, p. 184-186, 2002.

KRISTINSON, H.G.; RASCO, B.A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n.1, p. 43-81, 2000.

LAWRENCE, J.C.; NIELSEN, S.S. Partial isolation and characterization of a cysteine proteinase inhibitor from lima bean (*Phaseolus lunatus*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 49, p.1020-1025, 2001.

LEDWARD, D.A. Gelation of gelatine. In: **Functional properties of food macromolecules**. MITCHELL, J.R.; LEDWARD, D.A., editors. London, New York: Elsevier Applied Science Publishers, p. 171-201, 1986.

L'HOCINE, L.; BOYE, Y.I.; ARCAND, Y. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 3, p. C137-C145, 2006.

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

LUQUEZ, N.; FERNÁNDEZ, S.; MUCCIARELLI, S. Concentrado protéico de *Amaranthus cruentus* Propiedades funcionales. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 46, n. 2, p.143-145, 1996.

LUQUEZ, N.; FERNÁNDEZ, S.; DE ARELLANO, M.; DE MUCCIARELLI, S. Concentrado protéico de *Amaranthus mantegazzianus*. Caracterización físico-químico-biológica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 47, n. 4, p. 359-361, 1997.

MA, C.Y.; HARWALKAR, R. Thermal analysis of food proteins. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 35, p.317-367, 1991.

MAHAJAN. A.; DUA, S. Salts and pH induced changes in functional properties of amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) seed meal. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 834-837, 2002.

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.

MARCONE, M.F.; YADA, R.Y. Isolation, purification and characterization of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2281-2289, 1991.

MARCONE, M.F.; YADA, R.Y. Study of the charge profile and covalent subunit association of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 385-389, 1992.

MARCONE, 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.

MARCONE, M.F.; KAKUDA, Y. A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. **Nahrung**, v. 43, n. 6, p. 368-373, 1999.

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

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

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

MATSUMURA, Y.; MORI, T. Gelation. In: Hall G.M. **Methods of testing protein functionality**. Ed. London: Blackie Academic and Professional, 1996. p. 76-109.

MAURI, A.N.; AÑÓN, M.C. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1064-1072, 2006.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 120-125, 1996.

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

PAREDES-LÓPEZ, O.; MORA-ESCOBEDO, R.; ODORICA-FALOMIR, C. Isolation of amaranth proteins. **LWT-Food Science and Technology**, v. 21 p. 59-61, 1998.

PETRUCELLI, S.; AÑÓN, M.C. Thermal aggregation of soy protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 12, p. 3035-3041, 1995

PILOSOFF, A.M.R. Gelation. In: PILOSOFF, A.M.R.; BARTOLOMAI, G.B. **Caracterización funcional y estructural de proteínas**. Buenos Aires, 2000. p. 75-95.

PUPPO, M.C.; LUPANO, C.; AÑÓN, M.C. Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 43, p. 2356-2361, 1995.

PUPPO, M.C.; AÑÓN, M.C. Effect of pH and protein concentration on rheological behavior of acidic soybean protein gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3039-3046, 1998.

ROSENTHAL, A.J. **Food texture**. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, 1999. 311p.

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.

SCHWENKE, K.D. Legume protein structure and interaction: reflections about the functional potential of legume proteins. **Nahrung/Food**, v. 45, n. 6, p. 377-381, 2001.

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.

SCILINGO, A.A.; AÑÓN, M.C. Characterization of soybean protein isolates. The effect of calcium presence. **Journal of the American oil Chemists' Society**, v. 81, n. 1 p. 63-69, 2004

SEGURA-NIETO, M.; BARBA DE LA ROSA, A.P.; PAREDES-LÓPEZ, O. Biochemistry of amaranth proteins. In: **Amaranth: Biology, Chemistry and Technology**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 185-205, 1994.

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.

SOSULSKI, F.W. Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products: a review. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 56, p. 711-714, 1979.

STEFFE, J.F. Introduction to rheology. In: J.F. STEFFE. **Rheological methods in food process engineering**. USA: Freeman Press, 1996. p. 1-93.

THOMPSON, T. Case problem: questions regarding the acceptability of buckwheat, amaranth, quinoa, and oats for patient with celiac disease. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, p. 586-587, 2001.

TIRONI, V.A.; AÑÓN, M.C. Antioxidant activity of peptides from *Amaranthus mantegazzianus*: A preliminary study on the isolation of active fractions. **Abstracts ICC International Conference on Cereals and Cereal Products Quality and Safety**, p. 190, 2007.

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

TSUMURA, K.; SAITO, T.; TSUGE, K.; ASHIDA, H.; KUGIMIYA, W.; INOUE, K. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, p. 255-261, 2005.

VAN KLEEF, F.S.M. Thermally induced protein gelation: gelation and rheological characterization of highly concentrated ovalbumin and soy protein gels. **Biopolymers**, v. 25, p. 31-59, 1986.

VOJDANI, F.; WHITAKER, J.R. Chemical and enzymatic modification of proteins for improved functionality. In: **Food Functionality in Food Systems** (Hettiarachchy, N. S. e Ziegler, G. R.), ed. Marcel Dekker Inc, New York, p. 261-309, 1994.

WALKENSTRÖN, P.; HERMANSSON, A.M. Mixed gels of fine-stranded and particule network of gelatin and whey proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 8, p. 589-607, 1994.

XU, L.E; DIOSADY, L.L. Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates. **Food Research International**, v. 35, p. 23-30, 2002.

ZAPOTOCZNY, P.; MARKOWSKI, M.; MAJEWSKA, K.; RATAJSKI, A.; KONOPKO, H. Effect of temperature on the physical, functional, and mechanical characteristics of hot-airpuffed amaranth seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 469-476, 2006.

ZHENG, B.; MATSUMURA, Y.; MORI, T. Relationships of molecular forces on rheological and structural properties of legumin gels from broad beans. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p. 1257-1260, 1993.

Capítulo 2

Caracterização físico-química e solubilidade de concentrados protéicos de *Amaranthus cruentus* e *Amaranthus caudatus*

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as características de concentrados protéicos (CPAs) obtidos a partir de *Amaranthus cruentus* (Brasil) e de *A. caudatus* (Peru). Os concentrados protéicos foram obtidos seguindo-se o processo convencional para obtenção de isolados protéicos (CPAIs) e os concentrados protéicos isoelétricos dialisados (CPAIDs) foram obtidos a partir da dispersão dos CPAIs em pH neutro e diálise. As proteínas foram avaliadas por SDS-PAGE, grupos sulfidrilas livres (SH), calorimetria diferencial de varredura (DSC), cromatografia líquida de alta eficiência - exclusão molecular (CLAE-EM); solubilidade em água e em NaCl 0,05 mol/L em pH 3,0, 4,5 ou 7,0. Determinou-se também o teor de compostos fenólicos totais dos concentrados. Os teores de proteína dos CPAs diferiram significativamente ($p < 0,05$). Foram observadas bandas eletroforéticas na faixa de 14 a 67 kDa para o CPA de *A. caudatus* e para CPA de *A. cruentus*, correspondentes às frações albuminas, globulinas e glutelinas. Os CPAIs apresentaram 15 μmol de grupos sulfidrilas livres /g, dos quais 11 $\mu\text{mol/g}$ se encontraram ocultos no interior das moléculas. Houve uma exposição de grupos não reativos dos CPAIDs de 12% superior aos dos CPAIs. O DSC mostrou maiores temperaturas de desnaturação, 101,86 e 103,72 °C, para as globulinas dos CPAs de *A. cruentus* do que para as de *A. caudatus*, 98,36 e 99,75 °C. Os perfis cromatográficos mostraram que os concentrados dialisados resultaram na formação de agregados de menor massa molecular aparente que os não dialisados. A solubilidade foi significativamente maior ($p < 0,05$) para os CPAs de *A. caudatus* do que para os CPAs de *A. cruentus*. A diálise resultou na diminuição de solubilidade das proteínas. O teor de compostos fenólicos, expresso em equivalente de ácido gálico (EAG)/g de amostra, variou de 0,32 a 0,43 e de 0,31 a 0,34 para farinha integral de amaranto (FIA) e farinha desengordurada de amaranto (FDA), respectivamente para ambas as espécies. O processo de obtenção dos concentrados aumentou em duas vezes o teor de fenólicos totais nas espécies em relação às farinhas desengorduradas e a diálise diminuiu em 27 e 40% ($p < 0,05$) para as espécies *A. caudatus* e

A. cruentus, respectivamente. As diferenças entre os concentrados proteicos foram pequenas, resultado de variações nos componentes presentes em cada espécie de amaranto e no processo de extração.

Physicochemical and solubility characterization of *Amaranthus cruentus* and *Amaranthus caudatus* protein concentrates

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the characteristics of protein concentrates (APCs) obtained from *Amaranthus cruentus* (Brazil) and *A. caudatus* (Peru). The protein concentrates were obtained following conventional protein extraction for protein isolates (IAPCs) and dialyzed isoelectric protein concentrates (DIAPCs) were obtained through the dispersion of IAPCs at neutral pH and dialysis. Proteins were evaluated by SDS-PAGE electrophoresis, free sulfhydryl groups (SH), differential scanning calorimetry (DSC), size-exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC), and solubility in water and in 0.05 mol/L NaCl at pH 3.0, 4.5 and 7.0. Total phenolic contents of the concentrates were also determined. Protein contents of the APCs differed significantly ($p < 0.05$). Electrophoretic bands in the range of 14 to 67 kDa were observed for the APC from *A. caudatus* and for the APC from *A. cruentus*, corresponding to albumin, globulin and glutelin fractions. The IAPCs presented 15 μmol free sulfhydryl groups /g, of which 11 $\mu\text{mol/g}$ were hidden inside the molecules. Non-reactive SH groups in DIAPCs were 12% higher than in IAPCs. Differential scanning calorimetry showed higher denaturation temperature for the globulins from *A. cruentus* APC than for those from *A. caudatus* APC. The chromatographic profiles showed that dialysis resulted in the formation of lower apparent molecular mass aggregates. Solubility was significantly higher ($p < 0.05$) for *A. caudatus* APCs than for *A. cruentus* APCs. After dialysis, the solubility of the APCs was reduced. Phenolic compound content, expressed as gallic acid equivalents (GAE)/g sample, varied from 0.32 to 0.43 and from 0.31 to 0.34 for whole amaranth flour (WAF) and defatted amaranth flour (DAF), respectively. The APC production process doubled the content of total phenolics in the species in relation to the DAFs and dialysis reduced it at levels of 27 and 40% ($p < 0.05$) for the species *A. caudatus* and *A. cruentus*, respectively.

The differences between the APCs were small, possibly a result of variations in the components present in each amaranth species and of the extraction process.

1. INTRODUÇÃO

A composição e as propriedades nutricionais do grão de amaranto têm sido intensamente estudadas na última década (TOSI et al., 2002; YADAV e SEHGAL, 2003; GAMEL et al., 2006; ZAPOTOCZNY et al., 2006). As proteínas de amaranto apresentam composição balanceada de aminoácidos essenciais, principalmente lisina, triptofano e metionina, os quais se encontram em baixas concentrações em cereais e leguminosas convencionais, e qualidade protéica semelhante à do leite, da carne e do ovo (TEUTÓNICO e KNORR, 1985; MENDOZA e BRESSANI, 1987; MARTINEZ e AÑÓN, 1996; CASTELLANI et al., 1999). Além de sua composição peculiar e valor nutricional, as proteínas do amaranto podem ser benéficas para a saúde. Diversos autores reportaram propriedade redutora do colesterol e atividade antioxidante (CZERWINSKI et al., 2004; KIM et al., 2006a; KIM et al., 2006b; MARTIROSYAN et al., 2007), além de efeito no controle do apetite (BERTI et al., 2005). Proteínas de amaranto têm sido incluídas na formulação de dietas para pessoas com necessidades especiais, como diabéticos (KIM et al., 2006b, GUERRA-MATIAS e ARÊAS, 2005), celíacos (THOMPSON, 2001; GUERRA-MATIAS e ARÊAS, 2005), hipertensos (MARTIROSYAN et al., 2007) e fenilcetonúricos (BERTI et al., 2005). Contudo, a inclusão de produtos protéicos na formulação de alimentos depende amplamente de suas propriedades funcionais, as quais estão diretamente relacionadas com suas características físico-químicas, influenciadas pelo pH e força iônica do meio (FIDANTSI e DOXASTAKIS, 2001; CORDERO-DE-LOS-SANTOS et al., 2005).

Métodos para obtenção de isolados e frações protéicas tem sido desenvolvidos e estudos sobre a caracterização desses produtos têm sido relatados (MORA-ESCOBEDO et al., 1990; SEGURA-NIETO et al., 1992; MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996; SALCEDO-CHÁVEZ et al., 2002; CORDERO-DE-LOS-SANTOS et al., 2005), porém não existem trabalhos sobre a caracterização de concentrados protéicos de diferentes espécies de amaranto obtidas sob o mesmo procedimento de extração. Dessa forma, neste trabalho objetivou-se comparar concentrados protéicos das espécies *Amaranthus cruentus* e

Amaranthus caudatus, cujo processo de obtenção foi baseado no método convencional para obtenção de isolados protéicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

Foram utilizadas sementes de duas espécies de amaranto: *Amaranthus cruentus*, variedade BR Alegria, obtida por doação da EMBRAPA Cerrados – Planaltina – DF e *Amaranthus caudatus*, variedade Oscar Blanco, cultivada na zona do Callejón de Huaylas (Huaraz - Peru).

2.2 Obtenção dos concentrados protéicos de amaranto (CPAs)

Os CPAs foram obtidos a partir das farinhas desengorduradas de amaranto (FDAs) das duas espécies, de acordo com Salcedo-Chávez et al. (2002). As farinhas integrais (FIAs) foram obtidas por moagem do grão em moinho de facas (modelo MA630, Marconi, Piracicaba-SP, Brasil) e peneiradas até obter em se farinhas com granulometria $\leq 425 \mu\text{m}$. As farinhas foram tratadas com hexano (1:6 p/v) durante 24 h a temperatura ambiente, com o objetivo de extrair a fração lipídica. O solvente foi removido por centrifugação a $9000 \times g/30 \text{ min}/4^\circ\text{C}$ em centrífuga (modelo RC5C, Sorvall® Instruments Dupont, Wilmington, Alemanha), e as farinhas permaneceram em capela de exaustão, a temperatura ambiente, por 48 h, para completa evaporação do solvente e foram posteriormente armazenadas a 4°C até seu uso.

Os CPAs obtidos seguindo o processo convencional para obtenção de isolados protéicos (SALCEDO-CHÁVEZ et al., 2002) foram denominados concentrados protéicos isoeletricos (CPAIs). O fluxograma do processo está apresentado na Figura 1.

Concentrados protéicos isoeletricos dialisados (CPAIDs) foram obtidos por diálise (membrana Spectrum, massa molar $3,5 \times 10^3 \text{ Da}$, $9,3 \text{ mL cm}^{-1}$ e $3,4 \text{ cm}$ de diâmetro) por 48 h a 4°C da dispersão protéica após a etapa de neutralização (Figura 1). No processo de diálise, a água destilada foi trocada a cada 5 h e o material retido na membrana foi liofilizado. O processo de obtenção dos CPAs, FIAs e FDAs foi realizado três vezes.

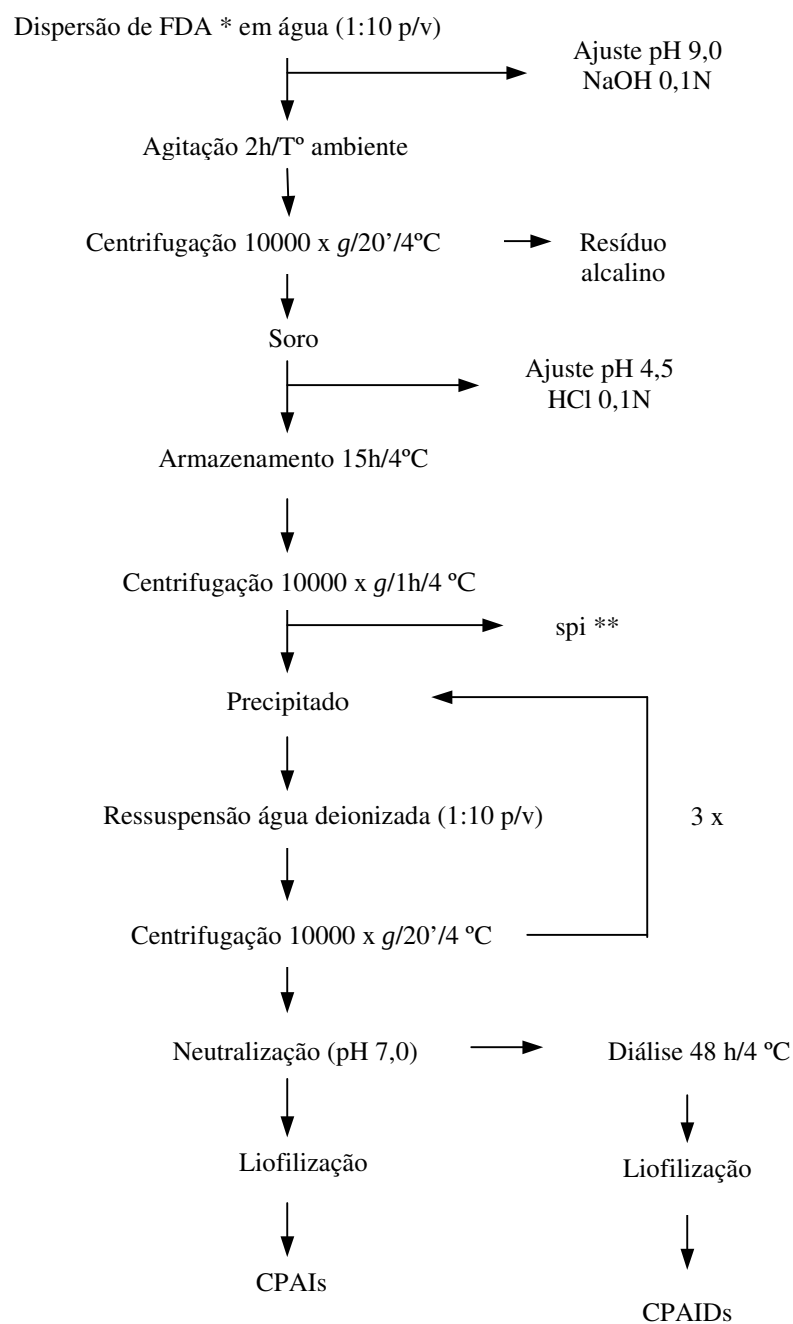


Figura 1. Fluxograma de obtenção dos concentrados protéicos isoeletricos de amaranto (CPAIs) e concentrados protéicos isoeletricos dialisados (CPAIDs).

*FDA: farinha desengordurada de amaranto, ** soro após precipitação isoeletrica.

2.3 Composição centesimal

Os teores de cinzas e de umidade foram determinados de acordo com a AOAC (2005) e o teor de nitrogênio total foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 2005). O teor de proteínas foi determinado multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator de conversão 5,85 (MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996; AOAC, 2005). Lipídios totais foram determinados pelo método de Bligh e Dyer (1959), e o teor de amido foi determinado de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.4 Compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos das farinhas (FIAs, FDAs) e CPAs foi determinado por método colorimétrico, utilizando reagente de Folin-Ciocalteu (GAMEL et al., 2006), a partir de seus respectivos extratos metanólicos (TSALIKI et al., 1999), com adaptações. Para obtenção dos extratos metanólicos, amostras das farinhas e concentrados foram misturadas com proporções de metanol (1:5 e 1:20, respectivamente) em um agitador de tubos, por 10 minutos, e logo aquecidas a 50 °C por uma hora. Em seguida, as amostras foram resfriadas e filtradas em membrana de 0,45 µm (Millipore). Volumes de 100 µL dos extratos metanólicos das amostras foram misturados com 2 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 2%. Após 2 min, 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu (1:1) foram adicionados à mistura. A absorbância foi medida a 750 nm após 30 minutos, utilizando-se água destilada como branco. Para a elaboração da curva padrão, foi utilizado o ácido gálico nas concentrações de 20 a 120 µg/mL dissolvido em água destilada. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso como equivalentes de ácido gálico (EAG).

2.5 Caracterização dos CPAs

2.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil das proteínas dos CPAs foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970). A metodologia requer que dois tipos de géis sejam usados

para a corrida da amostra: gel de separação (12% T e 4% C) e gel de empilhamento (4% T e 2,67% C), sendo que T é referido à concentração total do monômero e C à concentração do crosslinking. Os CPAs foram diluídos em 2 mL de tampão redutor (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%) e aquecidos a 90 °C por 5 minutos. Foram aplicados volumes de 15 μ L das soluções dos CPAs contendo 0,4% de proteína. Padrões de massa molar de 14 a 94 kDa (Bio-Rad, cód. 161-0304), foram utilizados para determinação da massa molar das frações protéicas. Após a corrida, os géis foram corados com Comassie Blue G-250 0,1% e descorados por meio de lavagens em solução ácido acético/metanol/água (1:4:5).

2.5.2 Grupos sulfidrilas livres (SH)

Para determinação dos grupos sulfidrilas livres, foi utilizado o procedimento descrito por Castellani et al. (1999), utilizando-se reagente de Ellman. Para determinação dos grupos SH totais, 10 mg de proteína das amostras foram dissolvidas em tampão pH 8,0 (Tris 0,08 mol/L; glicina 0,09 mol/L; EDTA 0,04 mol/L e uréia 8 mol/L). Após 1 h, as soluções foram centrifugadas a 16000 x *g*, a 20 °C por 20 min, e, em seguida, 3 mL dos sobrenadantes foram misturados com 40 μ L do reagente de Ellman (4 mg/mL de ácido 5,5'- ditiobis (2 - nitrobenzoico (DTNB) em metanol). Após 15 min, a absorbância foi monitorada a 412 nm e um coeficiente com absorção molar de 13600 M⁻¹ cm⁻¹ foi utilizado. Os grupos SH reativos foram determinados utilizando-se o mesmo tampão, porém sem uréia.

2.5.3 Calorimetria diferencial de varredura

O comportamento térmico dos CPAs foi analisado em calorímetro DSC 2920 (TA Instruments, New Castle, USA), segundo a metodologia descrita por Martínez e Añón (1996). O equipamento foi calibrado com Indium, com taxa de aquecimento de 10°C/min. Alíquotas de 10 mg das dispersões protéicas (20% p/v) foram acondicionadas em cápsulas herméticas de alumínio e aquecidas a 10°C/min na faixa de 20 a 120°C/min. A temperatura de desnaturação e entalpia de transição foram obtidas pela análise dos termogramas com o programa Universal Analysis Instruments, versão 4.3A.

2.5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência - exclusão molecular (CLAE-EM)

A massa molar aparente das proteínas nos CPAs foi determinada em cromatógrafo Varian (bomba 9012 – série 04824 e detector UV 9050 – série 02570, Califórnia-EUA), utilizando uma coluna BioSep-SEC-S 2000 Phenomenex (300 x 7,8 mm), série 333734-50. Volumes de 20 µL das amostras, 0,5 mg/mL de proteína em tampão fosfato de sódio, foram injetados na coluna e eluídos com tampão fosfato de sódio 0,05 M (NaCl 0,15 M pH 6,8), a 30 °C, com fluxo de 0,4 mL/min e a absorbância foi monitorada a 280 nm. As massas molares aparentes correspondentes aos picos eluídos foram estimadas a partir de uma curva de calibração construída com massas molares 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). A equação linear resultante da curva de calibração foi:

$$\text{Log MM} = -0,5418V_e + 5,7674 \quad (R^2 = 0,9914)$$

onde: V_e é o volume de eluição de uma determinada fração protéica do concentrado em mililitros e MM é a massa molar aparente em kDa.

2.5.5 Solubilidade

A solubilidade protéica dos CPAs foi determinada a partir de dispersões 1% de proteína (p/v) em 0,05 mol/L de cloreto de sódio ou água destilada, ajustando o pH para 3,0; 4,5 e 7,0 com 0,1 N de HCl ou 0,1 N de NaOH (MORR et al., 1985). As dispersões protéicas foram misturadas sob agitação magnética por 1 h, seguido pela centrifugação a 20000 x g por 30 min. A proteína solúvel foi determinada pelo método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 2005).

2.6 Análise estatística

Os resultados do teor protéico, rendimento do concentrado, rendimento protéico, solubilidade, grupos SH e compostos fenólicos foram avaliados estatisticamente pela média dos valores, análise de variância, e teste de Tukey a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), através do software STATISTICA (Tulsa, OK, U.S.A., 1995), version 6.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal da farinha integral (FIA), farinha desengordurada (FDA) e concentrado protéico isoeletrico (CPAI) para as duas espécies de amaranto está ilustrada na Tabela 1.

O teor de proteína variou de 13,7% para a FIA de *A. caudatus* a 14,9%, para a FIA de *A. cruentus*. As FDAs de ambas as espécies apresentaram teor de proteína ao redor de 16,5%, valores semelhantes aos relatados por outros autores (SALCEDO-CHÁVEZ et al., 2002; CORDERO-DE-LOS-SANTOS et al., 2005). O teor de proteína dos CPAs, no entanto, diferiu significativamente entre as espécies ($p < 0,05$), apresentando a espécie *A. caudatus*, maior teor de proteína (Tabela 2). Bejosano e Corke (1998) obtiveram concentrados protéicos com 67 a 75% de proteína a partir de FDA de *A. cruentus*, pelo procedimento de moagem úmida alcalina ($\text{pH} > 10$) seguido de precipitação isoeletrica do soro protéico, valores semelhantes aos obtidos no presente trabalho para a mesma espécie, enquanto Luquez et al. (1997), para concentrados protéicos de *A. mantegazzianus* reportaram teores de proteína inferiores, de 50,9 a 55,3%, seguindo o processo de extração da proteína em $\text{pH} 11$ e precipitação do extrato protéico em $\text{pH} 4,5$. As diferenças no teor protéico dos CPAs obtidos das duas espécies podem estar relacionadas com os outros componentes presentes nas sementes como amido, fibras não digeríveis e componentes antinutricionais como os compostos fenólicos (GORINSTEIN et al., 1996). Foram verificadas diferenças nos teores de amido e de carboidratos totais entre as espécies estudadas (Tabela 1), maior teor para a espécie *A. cruentus* do que para a espécie *A. caudatus*. Tapia-Blácido (2006) também relatou maior teor de carboidratos em concentrados protéicos obtidos de *A. cruentus* (33,0% de amido) do que o de *A. caudatus* (23,3%). A relação carboidratos totais:amido permaneceu basicamente constante para ambos os CPAs.

O rendimento do concentrado obtido a partir da farinha foi de 4,4% para o *A. caudatus* e de 5,1% para o *A. cruentus* (Tabela 2). Esses rendimentos foram próximos aos de Martínez e Añón (1996), que obtiveram 4,9% de rendimento na obtenção de isolado protéico a partir da farinha desengordurada de *A. hypochondriacus* (17% de proteína). Os CPAs obtidos de ambas as espécies apresentaram semelhante rendimento de proteína (percentagem da proteína total da farinha recuperada no concentrado), 20,9 e 22,3% para os

CPAIs, enquanto 19,1 e 18,4% para os CPAIDs. Esses valores foram inferiores aos obtidos por Bejosano e Corke (1998), que relataram recuperação de 37,6% de proteína para concentrados de amaranto. No presente trabalho a maior perda de proteína foi no resíduo alcalino, que apresentou 53,4% do total de proteína da FDA. Na etapa de precipitação no pI, verificou-se a perda de 15,7% da proteína total no soro, que é, em geral, descartado. Os rendimentos protéicos obtidos foram inferiores aos relatados por Salcedo-Chávez et al. (2002) para isolados de *A. cruentus* (53,4 a 61%) e Cordero-de-los-Santos et al. (2005) para isolados de *A. hypochondriacus* (56,4%).

Tabela 1. Composição centesimal das farinhas e concentrados protéicos isoelétricos de *Amaranthus caudatus* e de *Amaranthus cruentus*

Composição	% (base seca) *					
	<i>A. caudatus</i>			<i>A. cruentus</i>		
	FIA	FDA	CPAI	FIA	FDA	CPAI
Proteínas	13,7 ± 0,1	16,4 ± 0,1	77,9 ± 0,5	14,9 ± 0,2	16,5 ± 0,3	73,6 ± 0,4
Lipídios	7,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1	2,7 ± 0,1	7,6 ± 0,1	1,9 ± 0,1	3,3 ± 0,1
Cinzas	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,0 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,5 ± 0,2
Carboidratos totais **	75,6 ± 0,2	79,2 ± 0,3	16,1 ± 0,1	74,5 ± 0,1	78,4 ± 0,2	19,6 ± 0,1
Amido	50,2 ± 1,6	43,1 ± 1,3	3,9 ± 0,1	55,9 ± 0,4	51,9 ± 0,13	4,9 ± 0,2

* Valores representam média ± desvio padrão; n = 3

** Determinado por diferença

FIA: farinha integral de amaranto, FDA: farinha desengordurada de amaranto, CPAI: concentrado protéico de amaranto

Tabela 2. Teores de proteína e rendimentos dos concentrados protéicos de *A. cruentus* e *A. caudatus*

Amostras	% (base seca) *		
	Proteína **	Rendimento concentrado **	Rendimento protéico **
CPAI <i>A. caudatus</i>	77,9 ± 0,7 ^a	4,4 ± 0,2 ^a	20,9 ± 0,9 ^a
CPAID <i>A. caudatus</i>	79,9 ± 0,5 ^a	3,9 ± 0,1 ^a	19,1 ± 0,1 ^a
CPAI <i>A. cruentus</i>	73,6 ± 0,4 ^b	5,1 ± 0,4 ^a	22,3 ± 1,7 ^a
CPAID <i>A. cruentus</i>	75,3 ± 0,7 ^b	4,1 ± 0,1 ^a	18,4 ± 0,1 ^a

* Valores representam média ± desvio padrão; n = 3. Rendimento do concentrado: g de concentrado/100 g de farinha desengordurada, rendimento protéico: percentagem da proteína total da farinha desengordurada recuperada no concentrado

** Valores de cada coluna com diferente letra diferem significativamente (p<0,05) de acordo ao teste de comparação de médias de Tukey

CPAI: concentrado protéico de amaranto, CPAID: concentrado protéico de amaranto dialisado

Foram observadas diferenças significativas (p<0,05) no teor de compostos fenólicos tanto entre as espécies como entre os processos de obtenção dos concentrados (Figura 2). O teor de fenólicos totais foi 26% maior na farinha de *A. cruentus* que na de *A. caudatus*. Estes valores estão de acordo com a faixa reportada para cereais, 0,2 a 1,3 mg EAG/g amostra (KÄHKÖNEN et al., 1999). O teor de fenólicos totais aumentou com o processo de extração (Figura 2), devido, possivelmente, à formação de complexos proteína-fenol. Sob condições alcalinas, compostos fenólicos podem ser oxidados para quinonas e reagir com os grupos funcionais das proteínas, tais como aminas, tiol, indol, imidazol e dissulfeto (GONZÁLES-PEREZ et al., 2002; XU e DIOSADY, 2002). Como a formação do complexo proteína-fenol é dependente da estrutura protéica e do tipo e concentração do polifenol (PRIGENT et al, 2003; PI-JEN e CHEN-HUE, 2006), a disponibilidade de sítios ativos das proteínas, assim como o tipo de fenóis presentes, podem ter influenciado a concentração de compostos fenólicos nos CPAs. Prigent et al. (2003) relataram que a interação proteína-fenol pode levar à precipitação das proteínas através da ligação de vários fenóis a uma molécula protéica ou por ligação de um fenol a várias moléculas protéicas, sendo que o tipo de interação, covalente ou não covalente, responsável pela formação do complexo é dependente da proporção molar proteína-fenol.

A diálise reduziu em 27 e 40% ($p < 0,05$) o teor de fenólicos totais dos concentrados protéicos em relação aos concentrados não dialisados para *A. cruentus* e *A. caudatus*, respectivamente. A maior perda de fenólicos na diálise do CPA *A. caudatus* pode sugerir que houve menor agregação proteína-fenol, promovida por interações hidrofóbicas (XU e DIOSADY, 2000), o que facilitou a passagem pela membrana.

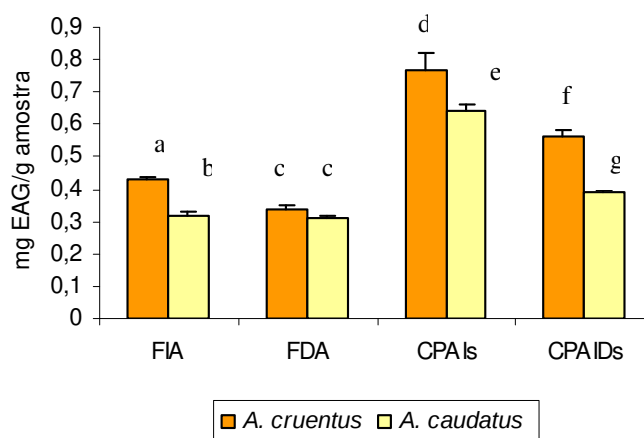


Figura 2. Teores de compostos fenólicos totais das farinhas e concentrados protéicos correspondentes às espécies *A. cruentus* e *A. caudatus*. Valores das colunas dentro da série com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo ao teste de comparação de médias de Tukey. FIA: farinha integral de amaranto, FDA: farinha desengordurada, CPAIs: concentrados protéicos isoelétricos, CPAIDs: concentrados protéicos isoelétricos dialisados

A cor dos grãos do amaranto, por observação visual (Figura 3), sugere que na espécie *A. cruentus*, por ser mais escura, há maior concentração de taninos condensados na cobertura da semente e possivelmente presença de outros compostos fenólicos, como ácidos fenólicos do que no *A. caudatus* (BEJOSANO e CORKE, 1998; KLIMCZAK et al., 2002). Assim como os grãos, os derivados do *A. caudatus* apresentaram cor marrom mais clara que os de *A. cruentus*. Ambos os CPAIDs apresentaram cor mais clara do que os CPAIs, possivelmente pelo fato que parte dos pigmentos e carboidratos foram removidos com a diálise. A cor dos produtos protéicos, tais como isolados e concentrados, é influenciada por vários fatores, tais como: reações de proteína-polifenol (XU e DIOSADY, 2002; WINTERS e MINCHIN, 2005; L'HOCINE et al., 2006), condições de processo (YADAV e SEHGAL, 2003; BEAN et al., 2006; GAMEL et al., 2006) e produtos de oxidação

presentes nas sementes (KLIMCZAK et al., 2002, CORDERO-DE-LOS-SANTOS et al., 2005).

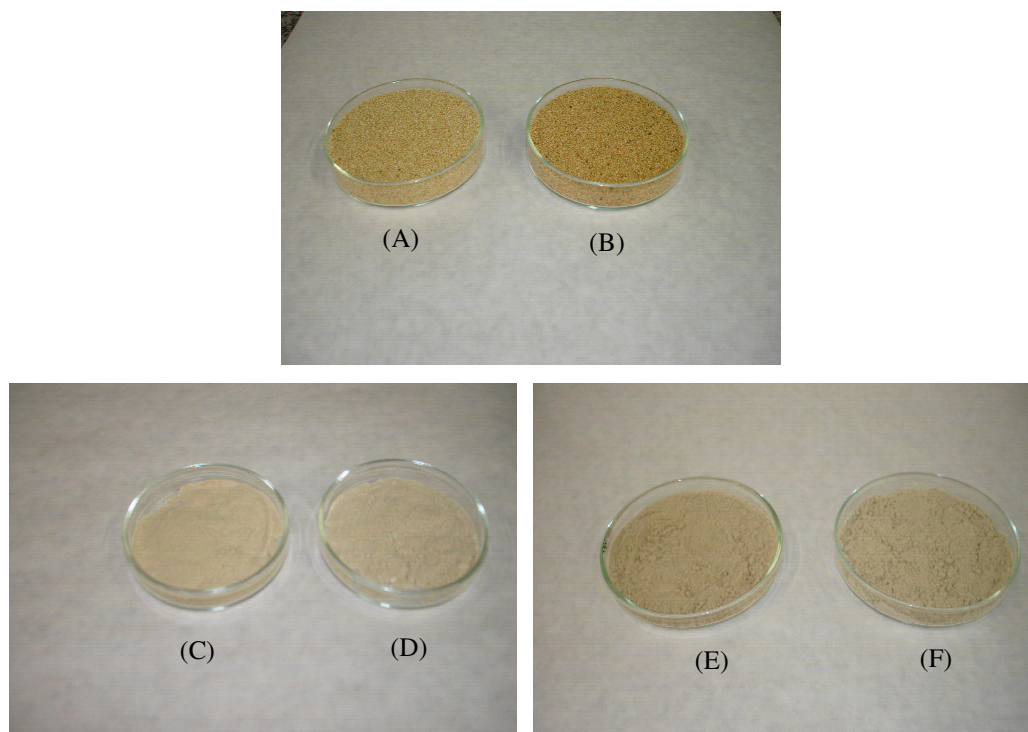


Figura 3. Fotografia dos grãos de *A. caudatus* (A) e *A. cruentus* (B), CPAIs e CPAIDs de *A. caudatus* (C e D) e de *A. cruentus* (E e F), respectivamente.

3.1 Eletroforese SDS-PAGE

O perfil eletroforético dos CPAs apresentou pequenas diferenças entre as espécies de amaranto (Figura 4). Os CPAs obtidos das espécies *A. caudatus* e *A. cruentus* apresentaram 7 e 8 bandas respectivamente. As bandas eletroforéticas correspondentes aos CPAIs estiveram na faixa de 15 a 54 kDa (15,1; 17,7; 21,1; 24,4; 36,9; 44,6 e 54,1 kDa) para o *A. caudatus* e de 15 a 66 kDa (14,6; 20,3; 23,5; 37,2; 43,4; 51,4 e 60,9 e 66,2 kDa) para o *A. cruentus*. Diferenças no perfil eletroforético podem ser creditadas ao processo de extração e características moleculares das espécies. A este respeito, Martínez et al. (1997) relataram que as globulinas do amaranto, proteínas de estocagem mais abundantes, podem

estar presentes em diferentes estados de agregação dentro da semente, levando à diferentes solubilidades em solventes aquosos.

A banda de 66,2 kDa observada no perfil do CPA de *A. cruentus* possivelmente corresponde à fração globulina (GORINSTEIN et al., 1996). Mora-Escobedo (1990) observou bandas de massa molecular acima de 50 kDa no perfil eletroforético de globulinas de *A. hypochondriacus* e sugeriu que essas frações poderiam corresponder à proteína não reduzida ou proteínas não ligados por ligações dissulfeto, como as globulinas da aveia. Outros autores relataram que a fração globulina do amaranto contém alguns heteroligômeros de alta massa molar do tipo 7S (conamarantina) na faixa de 50 a 73 kDa (BARBA DE LA ROSA et al., 1992; MARCONE e YADA, 1992; SEGURA-NIETO et al., 1994; GORINSTEIN et al., 1991; GORINSTEIN et al., 1996).

Uma subunidade com 54 kDa foi observada no perfil do CPA *A. caudatus*. Banda com igual massa molecular foi observada no perfil eletroforético da albumina-2 relatada por Martínez et al. (1997) e Castellani et al. (2000). De acordo com esses autores, o peptídeo monomérico de 54 kDa não é dissociado pelo SDS, e forma parte de polipeptídeos agregados de alta massa molecular. Essa fração protéica e sua tendência para polimerizar é que diferenciam a albumina-2 da globulina 11S.

As bandas de massa molecular inferior a 30 kDa correspondem à albumina-1 e as bandas eletroforéticas com massa molecular superior a 30 kDa correspondem a componentes das frações albumina-2, globulinas e glutelinas, de acordo com o descrito por Konishi et al. (1985), Segura-Nieto et al. (1994) e Martínez e Añón (1996), para frações e isolados protéicos extraídos a pH 9,0 e precipitados a pH 4,0 e 5,0.

A diálise dos concentrados resultou em perdas de frações albuminas e globulinas de baixa massa molecular, menores que 14 kDa.

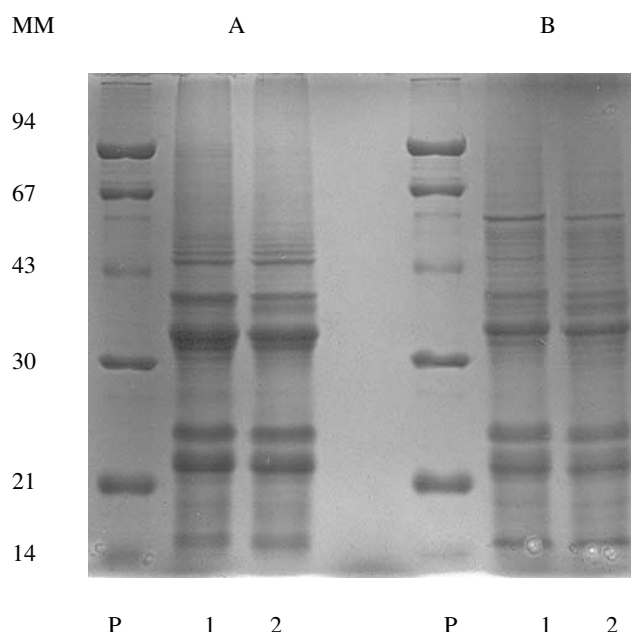


Figura 4. Perfil eletroforético SDS-PAGE dos concentrados protéicos (CPAs) de *A. caudatus* (A) e *A. cruentus* (B). Coluna P – padrões, colunas 1A e 1B – concentrados protéicos isoeletricos (CPAIs) e colunas 2A e 2B – concentrados protéicos isoeletricos dialisados (CPAIDs).

3.2 Grupos sulfidrilas livres

Observa-se, na Figura 5, que houve diferenças significativas nos grupos SH tanto entre as espécies como entre os processos de obtenção dos CPAs. Os valores dos grupos sulfidrilas livres reativos, determinados em tampão Tris pH 8,0, foram 3,5 $\mu\text{mol/g}$ de amostra para o CPAI de *A. caudatus* e 4,5 $\mu\text{mol/g}$ para o CPAI de *A. cruentus*, enquanto os grupos SH livres dos CPAIs, determinados após desnaturação com uréia 8 M, foram ao redor de 15 $\mu\text{mol/g}$ para ambas as espécies de amaranto. Os valores obtidos no presente trabalho estão de acordo com a faixa relatada na literatura para isolado de globulina P do amaranto, 3,4 $\mu\text{mol/g}$ em tampão Tris e 10,2 $\mu\text{mol/g}$ após desnaturação com uréia (CASTELLANI et al., 1999). Estes valores estão na faixa de valores reportados para o isolado protéico de soja, que apresenta estrutura molecular semelhante ao isolado protéico de amaranto, 1,1 $\mu\text{mol/g}$ em tampão Tris e 32,8 $\mu\text{mol/g}$ após desnaturação com uréia (MAURI e AÑÓN, 2006).

Aproximadamente 11 μmol de grupos SH /g de amostra presentes nos CPAIs não são reativos, o que sugere que a maioria dos grupos SH presentes nos CPAs estão

envolvidos em pontes dissulfeto. Os grupos sulfidríla e dissulfeto são de importância na manutenção da estrutura protéica, além de ter influência nas propriedades físico-químicas das proteínas. Assim, a redução das ligações dissulfeto pode levar ao aumento da solubilidade protéica e afetar outras propriedades tais como a de gelificação (PETRUCCELLI e AÑÓN, 1995; CASTELLANI et al., 1999).

A diálise resultou na redução significativa ($p < 0,05$) do número de grupos SH livres reativos e totais dos CPAIDs. Contudo, verificou-se que os grupos não reativos (SH livres totais – SH reativos) dos concentrados dialisados foram 12% superiores aos dos não dialisados, sugerindo que a redução da força iônica do meio resultou na agregação da proteína, e conseqüentemente, na diminuição do número de grupos SH livres expostos. A exposição dos grupos SH livres em pequena quantidade é uma característica da maioria das proteínas (CASTELLANI et al., 1999). Por outro lado, o aumento da concentração de grupos sulfidríla livres tem sido correlacionado com o grau de desnaturação protéica (MAURI e AÑÓN, 2006).

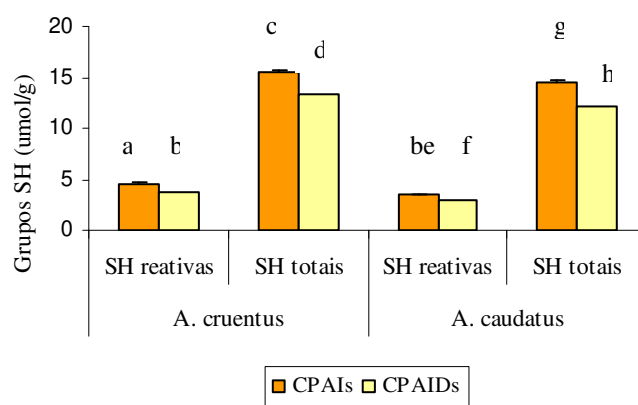


Figura 5. Grupos sulfidríla livres dos concentrados protéicos. Valores das colunas dentro da série com diferente letra diferem significativamente ($p < 0,05$) de acordo ao teste de comparação de médias de Tukey. CPAIs: concentrados protéicos isoelétricos, CPAID: concentrados protéicos isoelétricos dialisados.

3.3 Calorimetria diferencial de varredura

Os termogramas dos concentrados protéicos, dialisados ou não, apresentaram dois picos de transição (Figura 6): o primeiro, de menor área, ao redor de 70 °C, e o segundo,

entre 98 e 104 °C. Segundo os resultados de calorimetria relatados por Martínez et al. (1996), Gorinstein et al. (1996) e Chen e Paredes-López (1997) para proteínas de amaranço, as temperaturas de desnaturação do primeiro pico corresponderam às frações albumina-1, glutelinas e aos menores componentes das globulinas. Porém, este pico de transição também pode corresponder à gelatinização do amido. Os CPAs têm em sua composição componentes não protéicos tais como gordura, amido, fibra e compostos fenólicos, sendo verificados teores de amido de 3,8% para o *A. caudatus* e 4,9 para o *A. cruentus*. Segundo Pereira (2004) e Tapia-Blácido (2006), que estudaram sistemas de *A. cruentus* contendo 5 e 4% de amido respectivamente, equivalente ao teor de amido presente nas suspensões dos CPAs (20% p/v), relataram intervalos de temperatura de gelatinização de 67,7 a 77,4 °C e 68,4 a 72,1 °C, respectivamente. O segundo pico endotérmico corresponde à desnaturação da albumina-2 e globulinas-11S, de acordo com os relatos de Martínez e Añón (1996). Salcedo-Chávez et al. (2002) verificaram um único pico com temperatura de desnaturação de 100 °C para isolados protéicos de *A. cruentus* obtidos utilizando diferentes valores de pH de extração (7,8 a 9,2) e precipitação (4,3 a 5,7).

No presente estudo, os concentrados do *A. cruentus* (CPAI e CPAID) apresentaram maior temperatura de desnaturação do que os do *A. caudatus* para o segundo pico endotérmico. Isto pode estar relacionado com a maior concentração de compostos fenólicos presentes na espécie *A. cruentus*, e a interação destes compostos com proteínas, formando o complexo proteína-fenol, refletindo em maior estabilidade térmica (BEJOSANO e CORKE, 1998; PRIGENT et al., 2003).

Os valores de entalpia de transição (ΔH) dos CPAs de *A. caudatus* foram maiores do que os de *A. cruentus*, 1,3 vezes para o CPAI e 3,2 vezes para o CPAID (Tabela 3), o que pode ser devido tanto às frações e proporções de proteínas presentes como ao teor de carboidratos das amostras. Pela análise eletroforética realizada, foi observada a presença de albumina-1, globulinas e glutelinas para ambas as espécies e processos, porém a presença da albumina-2 foi observada somente nos CPAs de *A. caudatus*, o qual apresentou maior ΔH .

Os valores de entalpia de desnaturação total ($\Delta H_t = \Delta H_1 + \Delta H_2$), 1,9 a 6,2 J/g de proteína, obtidos no presente trabalho foram inferiores aos relatados por Martínez e Añón (1996), 6,3 e 12,5 J/g de proteína para isolados extraídos a pH 9,0 e precipitados a pH 4,0 e

5,0, respectivamente, condições semelhantes às utilizadas no presente trabalho. Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato do produto estar parcialmente purificado e apresentar componentes não protéicos. No entanto, foram próximos aos valores apresentados por Salcedo-Chávez et al. (2002) e Cordero-de-los Santos et al. (2005), que relataram valores na faixa de 1,5 a 6,8 J/g de proteína.

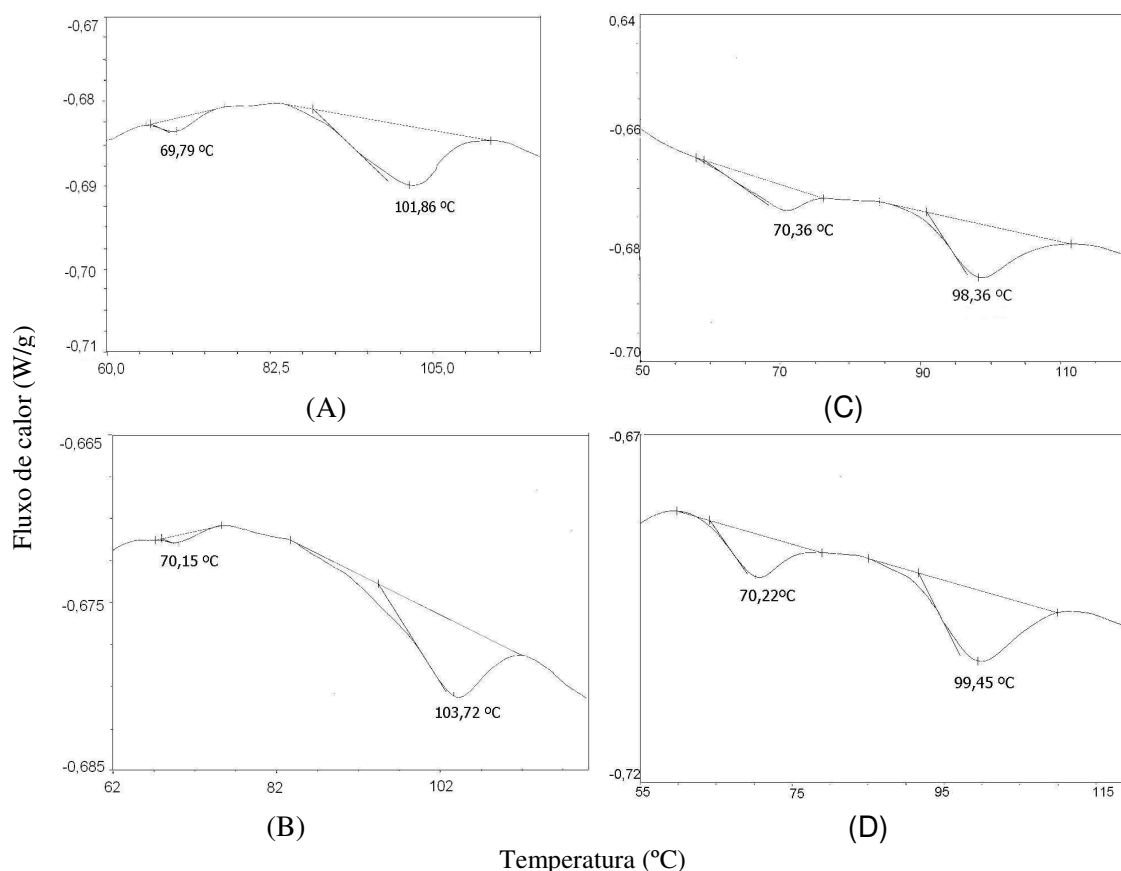


Figura 6. Termogramas dos concentrados protéicos de amaranto obtidos por precipitação isoelétrica (CPAIs) e diálise (CPAIDs). CPAI (A) e CPAID (B) de *A. cruentus*, CPAI (C) e CPAID (D) de *A. caudatus*. T_d : valores de temperatura de desnaturação.

Os concentrados dialisados de ambas as espécies estudadas apresentaram termogramas com os picos mais separados e pequeno aumento significativo na temperatura de transição quando comparados aos não dialisados, sugerindo que a retirada de componentes de menor massa molecular teve um efeito estabilizante sobre a estrutura das proteínas do amaranto. A diálise também resultou na diminuição significativa do ΔH para o

A. cruentus e pequeno aumento não significativo para o *A. caudatus*. Segundo Arntfield e Murray (1981), diferenças na entalpia de desnaturação (ΔH) são relacionadas à proporção relativa de interações polares e não polares no agregado formado. Diminuição no ΔH pode ser devida ao aumento na estabilidade de interações hidrofóbicas, as quais têm uma contribuição exotérmica para o ΔH .

Tabela 3. Valores de entalpia e temperatura de desnaturação dos concentrados protéicos das espécies *A. cruentus* e *A. caudatus*

CPAs **	ΔH (J/g de proteína)		ΔH_t (J/g de proteína) *	T_d (°C) *	
	Primeiro pico	Segundo pico		Primeiro pico	Segundo pico
CPAI cru	0,31 $\pm$ 0,5	3,69 $\pm$ 0,1	4,00 $\pm$ 0,2 ^a	69,79 $\pm$ 0,1 ^a	101,86 $\pm$ 0,3 ^a
CPAID cru	0,06 $\pm$ 0,1	1,88 $\pm$ 0,2	1,94 $\pm$ 0,1 ^b	70,15 $\pm$ 0,6 ^a	103,72 $\pm$ 0,1 ^b
CPAI cau	1,51 $\pm$ 0,1	3,82 $\pm$ 0,1	5,33 $\pm$ 0,1 ^c	70,36 $\pm$ 0,1 ^a	98,36 $\pm$ 0,5 ^c
CPAID cau	1,73 $\pm$ 0,3	4,49 $\pm$ 0,1	6,22 $\pm$ 0,1 ^c	70,22 $\pm$ 0,2 ^a	99,45 $\pm$ 0,1 ^c

* Valores representam média $\pm$ desvio padrão, médias de cada coluna com diferente letra diferem significativamente ($p < 0,05$) de acordo ao teste de comparação de médias de Tukey

ΔH : entalpia de desnaturação, T_d : temperatura de desnaturação, ΔH_t : entalpia de desnaturação total

** CPAs: concentrados protéicos de amaranto

CPAI cru: concentrado protéico isoelétrico *A. cruentus*,

CPAID cru: concentrado protéico isoelétrico dialisado *A. cruentus*

CPAI cau: concentrado protéico isoelétrico *A. caudatus*

CPAID cau: concentrado protéico isoelétrico dialisado *A. caudatus*

3.4 Cromatografia por exclusão molecular

Os cromatogramas dos CPAs estão apresentados na Figura 7. Os CPAIs das espécies *A. caudatus* (Figura 7A) e *A. cruentus* (Figura 7B) apresentaram basicamente os mesmos picos, porém com intensidade diferente, indicando diferentes graus de agregação, de acordo com a espécie de amaranto utilizada. A presença de complexos de alta massa molar foi observada, possivelmente como resultado da desnaturação parcial da proteína e reações de associação e dissociação durante a extração e precipitação protéica, podendo estar envolvidas interações covalentes e não covalentes (CORDERO-DE-LOS-SANTOS et al., 2005). O pico O, de massa molar aparente de 754,7 kDa (Figura 7B), indica a formação de agregados de alta massa molar, observada com menor intensidade para o CPAI de *A. caudatus*. Agregados de alta massa molar são, em parte, estabilizados por ligações dissulfídicas (CASTELLANI et al., 1999).

Os picos **A** e **B**, com massa molar aparente de 474,9 e 287,8 kDa, respectivamente para o *A. caudatus*, e 430,2 e 260,1, respectivamente, para o *A. cruentus*, possivelmente correspondem a agregados de globulinas (MORA-ESCOBEDO et al., 1990; OSUNA-CASTRO et al., 2000). Konishi et al. (1985), que trabalharam com isolados de globulina de amaranto, verificaram que 81% da globulina de *A. hypochondriacus*, obtidas com as mesmas condições de eluição usadas por Mora-Escobedo et al. (1990), apresentou massa molar aparente de 440 kDa. Osuna-Castro et al. (2000) e Cordero-de-los-Santos et al. (2005) observaram no isolado protéico de *A. hypochondriacus* um pico de massa molar aparente de 1380 kDa, após eluição em tampão (Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 8,0 + NaCl 0,3 mol/L), atribuído à associação de unidades moleculares de amarantin com massas molares entre 300 e 350 kDa.

Os picos **C** e **D**, observados nos CPAIs de ambas as espécies (Figura 7A e 7B), apresentaram massa molar menor que 5 kDa e correspondem às frações de albuminas (MORA-ESCOBEDO et al., 1990; LQARI et al., 2002), enquanto os picos **E** e **F**, observados nos mesmos CPAIs, possivelmente correspondem a compostos secundários, tais como fenóis, que foram co-precipitados com a proteína durante a precipitação isoeletrica e parcialmente eliminados após diálise (GONZÁLES-PÉREZ et al., 2002).

A diálise resultou em agregação das frações, formando picos de menor massa molar aparente do que o observado nos CPAIs, picos **G** e **H**, 32 e 227 kDa para o *A. caudatus* (Figura 7C) e picos **I** e **J**, 2,81 e 79 kDa para o *A. cruentus* (Figura 7D). No cromatograma do CPAID de *A. caudatus* (Figura 7C), observou-se junção de picos, indicando agregação das frações tanto na região de alta como de baixa massa molar, enquanto no cromatograma do CPAI do *A. cruentus*, a menor área, pico **I**, indicaria insolubilização dos agregados de maior massa molar devido à diálise, e a maior área, pico **J**, indicaria formação de complexo proteína-fenol que foi retido na membrana de diálise, o qual está relacionado com o maior teor de compostos fenólicos no CPA de *A. cruentus* do que no CPA de *A. caudatus*. Segundo Hosney et al. (1981) os taninos condensados apresentam massa molar na faixa de 0,5 a 3 kDa.

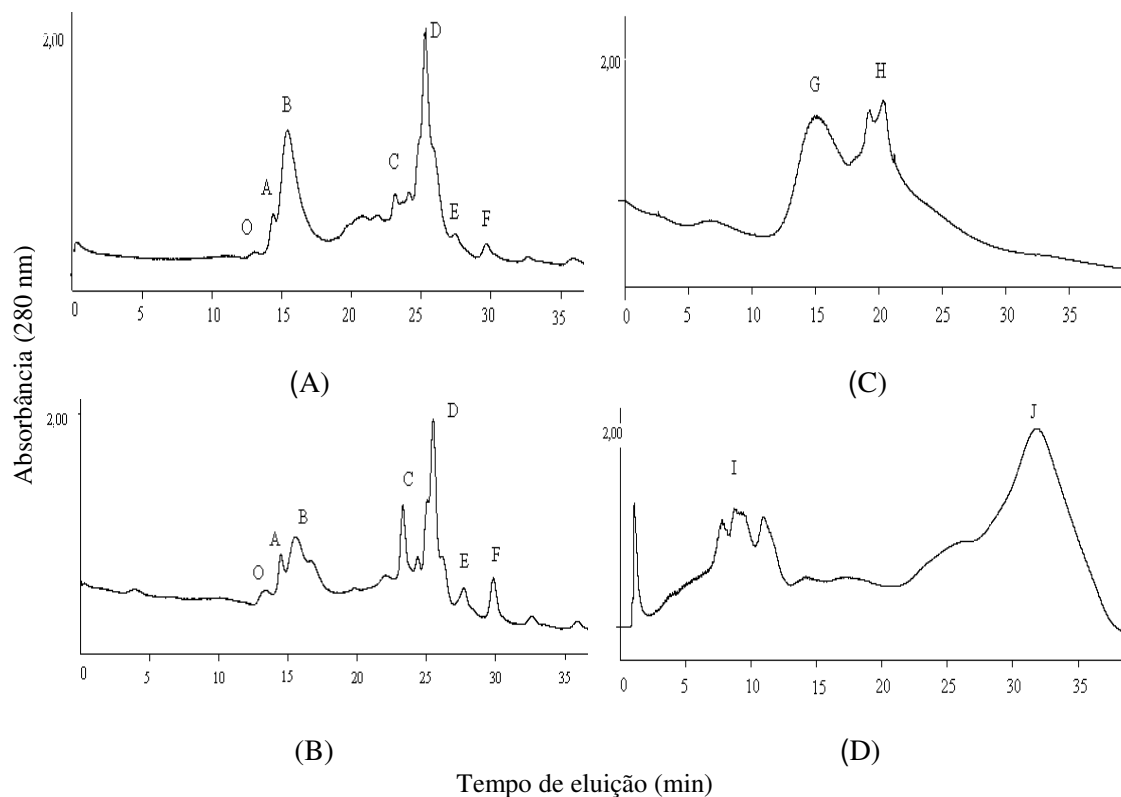


Figura 7. Perfil cromatográfico (CLAE–EM) dos concentrados protéicos obtidos por precipitação isoelétrica (CPAIs) e diálise (CPAIDs). CPAI (A) e CPAID (C) de *A. caudatus*, e CPAI (B) e CPAID (D) de *A. cruentus*.

3.5 Solubilidade

Os perfis de solubilidade dos CPAs estão apresentados na Tabela 4. Os CPAIs em ambos os solventes, apresentaram maior solubilidade em pH 3,0 e mínima em pH 4,5. Estes resultados foram semelhantes aos relatados por Bejosano e Corke (1999), que trabalharam com concentrados protéicos de *A. cruentus*, por Marcone e Kakuda (1999), para isolados de globulinas de *A. hypochondriacus* e por Salcedo-Chávez et al. (2002), para farinha de *A. cruentus*.

Em ambos os solventes, os CPAs de *A. caudatus* apresentaram maior solubilidade do que os CPAs de *A. cruentus*. Este fato pode ser atribuído, ao menos em parte, à maior concentração de compostos fenólicos no CPA de *A. cruentus* (Figura 2), que podem ter interferido na solubilidade da proteína. Taninos do tegumento da semente do amaranto

ligam-se às proteínas durante o processo de extração protéica, formando agregados de menor solubilidade (MARCONE e KAKUDA, 1999).

Com a diálise, houve diminuição da solubilidade dos concentrados protéicos, no entanto, foi observado aumento na presença de NaCl 0,05 mol/L em pH 7,0. A principal fração da proteína do amaranto é a globulina solúvel em sal (Glb-S). O aumento na solubilidade também pode ser atribuído ao efeito *salting in* sobre os grupos carregados da proteína, diminuindo gradativamente a agregação protéica promovida pelas interações hidrofóbicas e, conseqüentemente, aumentando a solubilidade (FENNEMA, 1996). A presença de sais influencia fortemente a solubilidade, o equilíbrio de associação-dissociação e as mudanças estruturais das proteínas e polipeptídios (MAHAJAN e DUA, 2002).

Tabela 4. Solubilidade protéica (%) dos concentrados protéicos de *A. caudatus* e *A. cruentus* em água e 0,05 mol/L NaCl.

CPAIs *				
pH	Água		0,05 mol/L NaCl	
	<i>A. caudatus</i>	<i>A. cruentus</i>	<i>A. caudatus</i>	<i>A. cruentus</i>
3,0	65,4 ± 0,2 ^a	55,1 ± 0,2 ^d	52,4 ± 0,2 ^g	32,9 ± 0,2 ^j
4,5	11,2 ± 0,2 ^b	5,8 ± 0,1 ^e	9,9 ± 0,1 ^h	5,7 ± 0,2 ^{e k}
7,0	46,2 ± 0,1 ^c	38,1 ± 0,6 ^d	35,9 ± 1,0 ^{f i}	29,4 ± 0,9 ^l
CPAIDs *				
3,0	59,2 ± 0,2 ^m	53,3 ± 1,9 ^{d p}	45,1 ± 0,6 ^g	29,0 ± 0,4 ^v
4,5	13,6 ± 0,5 ⁿ	8,5 ± 0,4 ^q	14,6 ± 0,5 ^{n t}	10,5 ± 0,4 ^{h w}
7,0	39,2 ± 1,4 ^{f o}	27,5 ± 0,4 ^r	53,9 ± 0,2 ^u	35,4 ± 0,7 ^{i x}

* Valores representam média±desvio padrão de três repetições e médias; na mesma linha com diferente letra diferem significativamente (p<0,05), de acordo ao teste de comparação de médias de Tukey. CPAIs: concentrados protéicos de amaranto isoelétricos, CPAIDs: concentrados protéicos de amaranto isoelétricos dialisados

As diferenças de solubilidade entre os concentrados protéicos podem ser atribuídas às diferenças na composição aminoacídica entre espécies, interações entre proteínas, presença de fenóis, carboidratos e outros componentes, assim como a ligação desses componentes à proteína durante os processos de obtenção dos CPAs. Compostos fenólicos e o ácido fítico também pode interferir na solubilidade protéica (MARCONE e KAKUDA, 1999; RAHMA et al, 2000). Desta forma, a menor solubilidade dos CPAs do *A. cruentus*

em pH 4,5 tenha sido devida à presença de maior teor de compostos fenólicos e ácido fítico no *A. cruentus* do que no *A. caudatus*. Cordero-de-los-Santos et al. (2005) relataram baixa solubilidade em água (pH 4,5) para o isolado protéico de amaranto obtido por precipitação isoeletrica (IP) em relação ao isolado protéico obtido por micelação (MP), atribuindo tal fato ao maior conteúdo de ácido fítico no IP.

4. CONCLUSÕES

As diferenças de composição e características estruturais entre os CPAs obtidos foram reduzidas e podem ter sido influenciadas pelos componentes presentes em cada espécie de amaranto. O CPA de *A. caudatus* apresentou maiores teores de proteína e solubilidade do que o CPA *A. cruentus*. As análises de eletroforese mostraram principalmente a presença de frações de globulinas nos CPAs, albumina-2 e globulinas 11S, caracterizadas por apresentar maior estabilidade térmica em relação às outras frações protéicas, albumina-1, glutelinas e globulinas de baixa massa molecular. Os perfis cromatográficos mostraram diferentes graus de agregação e formação do complexo proteína-fenol. O processo de extração aumentou em duas vezes o teor de compostos fenólicos em relação às farinhas. A diálise resultou na diminuição do teor de compostos fenólicos nos CPAs, a solubilidade das proteínas foi diminuída pela perda de frações protéicas de baixa massa molecular e foi observada agregação das proteínas em função da força iônica do meio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Association of official methods analytical chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18th. Edition. Washington, DC., 2005.

ARNTFIELD, S.D.; MURRAY, E.D. The influence of processing parameters on food protein functionality. I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 14, p. 289-294, 1981.

BARBA DE LA ROSA, A.; PAREDEZ-LÓPEZ, O.; GUEGUEN, J. Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 937-940, 1992.

BEAN, S.R.; IOERGER, B.P.; PARK, S.H.; SINGH, H. Interaction between sorghum protein extraction and precipitation conditions on yield, purity and composition of purified protein fractions. **Cereal Chemistry**, v. 83, n. 1, p. 99-107, 2006.

BEJOSANO, F.P.; CORKE, H. Protein quality evaluation of Amaranthus whole meal flours and protein concentrates. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 76, p. 100-106, 1998.

BEJOSANO, F.P.; CORKE, H. Properties of protein concentrates and hydrolysates from Amaranthus and Buckwheat. **Industrial Crops and Products**, v. 10, p. 175-183, 1999.

BERTI, C.; RISO, P.; BRUSAMOLINO, A.; PORRINI, M. Effect on appetite control of minor cereal and pseudocereal products. **British Journal of Nutrition**, v. 94, p. 850-858, 2005.

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

CASTELLANI, O.F.; MARTÍNEZ, E.N.; AÑÓN, C.M. Role of disulfide bonds upon the structural stability of an amaranth globulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3001-3008, 1999.

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

CHEN, S.; PAREDES-LÓPEZ, O. Isolation and characterization of the 11S globulin from amaranth seeds. **Journal of Food Biochemistry**, v. 21, p. 53-65, 1997.

CORDERO-DE-LOS-SANTOS, M.; OSUNA-CASTRO, J.; BORODANENKO, A.; PAREDES-LÓPEZ. Physicochemical and functional characterization of amaranthus (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 4, p. 269-280, 2005.

CZERWINSKI, J.; BARTNIKOWSKA, E.; LEONTOWICZ, H.; LANGE, E.; LEONTOWICZ, M.; KATRICH, E.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*amaranth hypochondriacus*) meals positively affect

plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, p. 622-629, 2004.

FENNEMA, O.R. Amino Acids, peptides and proteins. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. Marcel Dekker, Inc. New York, 1996. cap. 6, p. 321-429.

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

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

GONZÁLES-PÉREZ, S.; MERCK, K.B.; VEREIJKEN, J.M.; KONINGSVELD, G.A.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A.G.J. Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1713-1719, 2002.

GORINSTEIN, S.; MOSHE, R.; GREENE, L.J.; ARRUDA, P. Evaluation of four amaranthus species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 851-854, 1991.

GORINSTEIN, S.; ZEMSER, M.; FRIEDMAN, M.; VASCO-MÉNDEZ, N.; PARÉDES-LÓPEZ, O. Denaturant-induced conformations of globulins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 93-99, 1996.

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

HOSENEY, R. C.; VARRIANO-MARSTON, E.; DENSY, D. A. V. Sorghum and millet. In: **Advances in cereal science and technology**. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, 1981. v. 4, p. 71.

KÄHKÖNEN, M.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3954-3962, 1999.

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 and 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, p. 195-199, 2006b.

KLIMCZAK, M.; MALECKA, M.; PACHOLEK, B. Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. **Nahrung**, v. 46, n. 3, p. 184-186, 2002.

KONISHI, Y., YUKO, F., KAYOKO, I., KATUZOTOSHI, O. HIDETSUGU, F. Isolation and Characterization of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 1453-1459, 1985

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 27, p. 680-685, 1970.

L'HOCINE, L.; BOYE, Y.I.; ARCAND, Y. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 3, p. C137-C145, 2006.

LQARI, H.; VIOQUE, J.; PEDROCHE, J.; MILLAN, F. Lupinus angustifolius protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. **Food Chemistry**, v. 76, p. 349-356, 2002.

LUQUEZ, N.G. DE; FERNÁNDEZ, S.; DE ARELLANO, M.; DE MUCCIARELLI, S. Concentrado protéico de *Amaranthus mantegazzianus*. Caracterización físico-químico-biológica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 47, n. 4, p. 359-361, 1997.

MAHAJAN. A.; DUA, S. Salts and pH induced changes in functional properties of amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) seed meal. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 834-837, 2002.

MARCONE, M.F.; YADA, R.Y. Study of the charge profile and covalent subunit association of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 385-389, 1992.

MARCONE, M.F.; KAKUDA, Y.A. A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. **Nahrung**, v. 6, p. 368-373, 1999.

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

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

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

MAURI, A.N.; AÑÓN, M.C. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1064-1072, 2006.

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

MORA-ESCOBEDO, R.; PAREDES-LÓPEZ, O.; ORDORICA-FALOMI, C. Characterization of albumins and globulins from amaranth. **LWT-Food Science and Technology**, v. 23, p. 484-487, 1990.

MORR, C.V.; GERMAN, J.E.; KINSELLA, J.M.; REGENSTEIN, J.P.; VAN BUREN, J.P.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 1715-1718, 1985.

OSUNA-CASTRO, J.; RASCÓN-CRUZ, Q.; NAPIER, J.; FIDO, R.J.; SHEWRY, P.R.; PAREDES-LÓPEZ. Overexpression, purification and in vitro refolding of the 11S globulin from amaranth seed in Escherichia coli. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5249-5255, 2000.

PEREIRA, L.B. **Caracterização de suspensões e géis de amido de amaranto: efeito da adição de sacarose e NaCl nas propriedades reológicas e térmicas**. 2004. 141 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

PETRUCCELLI, S.; AÑÓN, M.C. Partial reduction of soy protein isolate disulfide bonds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2001-2006, 1995.

PI-JEN, T.; CHEN-HUE, S. Significance of phenol-protein interactions in modifying the antioxidant capacity of peas. **Journal of Agricultural and Chemistry**, v. 54, p. 8491-8494, 2006.

PRIGENT, S.V.; GRUPPEN, H.; VISSER, A.J.W.G.; KONINGSVELD, G.; JONG, G.A.H.; VORAGEN, A.G.J. Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (Chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5088-5095, 2003.

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.

SEGURA-NIETO, M.; VÁZQUEZ-SANCHEZ, N.; RUBIO-VELÁZQUEZ, H.; OLGUÍN-MARTÍNEZ, L. E.; RODRÍGUEZ-NÉSTER, C. E.; HERREREA-ESTRELLA, L. Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1553-1558, 1992.

SEGURA-NIETO, M.; BARBA DE LA ROSA, A.P.; PAREDES-LÓPEZ, O. Biochemistry of amaranth proteins. In: **Amaranth: Biology Chemistry and Technology**; CRC Press: Boca Raton, FL, 1994. Cap. 5, p 75-106.

TAPIA-BLACIDO, D. R. **Filmes a base de derivados do amaranto para uso em alimentos**. 2006. 351 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

TEUTÓNICO, R.A.; KNORR, D. Amaranth: composition, properties and applications of a rediscovered food crop. **Food Technology**, v. 39, p. 49-61, 1985.

THOMPSON, T. Case problem: questions regarding the acceptability of buckwheat, amaranth, quinoa, and oats for patient with celiac disease. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, p. 586-587, 2001.

TOSI, E.A.; RÉ, E.D.; MASCIARELLI, R.; SÁNCHEZ, H.; OSELLA, C.; DE LA TORRE, M.A. Whole and defatted hyperproteic Amaranth flours tested as wheat flour supplementation in mold breads. **LWT-Food Science and Technology**, v. 35, p. 472-475, 2002.

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

WINTERS, A.L.; MINCHIN, F. Modification of the Lowry assay to measure proteins and phenols in covalently bound complexes. **Analytical Biochemistry**, v. 346, p. 43-48, 2005.

XU, L.; DIOSADY, L. L. Interactions between canola proteins and phenolic compounds in aqueous media. **Food Research International**, v. 33, p. 725-731, 2000.

XU, L.; DIOSADY, L.L. Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates. **Food Research International**, v. 35, p. 23-30, 2002.

YADAV, S.K.; SEHGAL, S. Effect of domestic processing and cooking on select antinutrient contents of some green leafy vegetables. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 58, p. 1-11, 2003.

ZAPOTOCZNY, P.; MARKOWSKI, M.; MAJEWSKA, K.; RATAJSKI, A.; KONOPKO, H. Effect of temperature on the physical, functional, and mechanical characteristics of hot-airpuffed amaranth seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 469-476, 2006.

Capítulo 3

Caracterização físico-química e solubilidade de concentrados protéicos de *Amaranthus cruentus* obtidos por diferentes processos

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes processos de obtenção dos concentrados protéicos de amaranto (CPAs) em suas características físico-químicas e solubilidade. O concentrado protéico de amaranto obtido pelo processo convencional, utilizando pH 9,0 na extração (CPAp), foi comparado aos concentrados protéicos obtidos pelos processos modificados, realizando lavagem ácida prévia à extração protéica em pH alcalino (CPAla) e por extração protéica sob aquecimento a 50 °C (CPAtt). Os concentrados obtidos foram analisados por eletroforese em SDS-PAGE, grupos sulfidrilas livres (SH), calorimetria diferencial de varredura (CDV), cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (CLAE-EM), solubilidade em água e NaCl 0,05 mol/L em pH 3,0, 4,5 ou 7,0, compostos fenólicos e parâmetros de cor. O teor de proteína do concentrado protéico padrão foi 73% e dos concentrados CPAtt e CPAla superiores a 75% ($p < 0,05$). Os valores grupos sulfidrilas livres totais dos CPAtt e CPAla foram inferiores ao observado para o CPAp, porém houve aumento de exposição em 10%. O processo térmico induziu a formação de agregados de alta massa molecular e diminuição da solubilidade em água e NaCl 0,05 mol/L, no entanto, o aumento na solubilidade foi observado para o CPAla. O teor dos fenólicos totais dos concentrados CPAtt e CPAla apresentou redução de 50% ($p < 0,05$) em relação ao CPAp. O índice de claridade (IC) para os CPAla e CPAtt foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que o CPAp. Os resultados indicam que o processo de lavagem ácida teve efeitos positivos na composição, solubilidade e estabilidade térmica dos concentrados. O processo térmico também promoveu efeitos positivos nas características do teor protéico e parâmetros de cor, porém afetou a solubilidade, no entanto, o processo convencional quando comparado com os processos de lavagem ácida e térmico prejudicou as propriedades avaliadas.

Physicochemical characterization and solubility of *Amaranthus cruentus* protein concentrates obtained by different processes

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the effect of different processes for the production of amaranth protein concentrates (APCs) on their characteristics physicochemical and solubility. The protein concentrate obtained by the conventional process for the production of protein isolates, with extraction at pH 9.0 (APCst), was compared to the protein concentrates obtained through the modified process, by acid washing previous to protein extraction (APCaw) and protein extraction with heating (APCtt). The concentrates obtained were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis, free sulfhydryl groups (SH), differential scanning calorimetry (DSC), size-exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC), solubility in water and in 0.05 mol/L NaCl at pH 3.0, 4.5 and 7.0, phenolic compounds and color parameters. The protein content of the standard protein concentrate was 67%, and those of APCtt and APCaw, higher than 70% ($p < 0.05$). The processes reduced total free sulfhydryl groups of APCtt and APCaw, however, a 10% increase in their exposure was observed. The DSC analysis showed higher thermal stability for APCaw than for the other concentrates. Thermal treatment induced the formation of high molecular mass aggregates and the reduction of solubility in water and in 0.05M NaCl, however, an increase in solubility was observed for APCaw. Analysis of total phenolic compound content, expressed as gallic acid equivalents (GAE)/g sample, showed that APCtt and APCaw concentrates had a 50% reduction ($p < 0.05$) in total phenolic content in relation to APCst. The clarity index (CI) for APCaw and APCtt was significantly ($p < 0.05$) higher than for APCst. The results indicate that the acid washing process had positive effects on the composition, solubility and thermal stability of the concentrates. The thermal process also promoted positive effects on protein content and color parameters; however, it affected solubility. Notwithstanding, the conventional process, when compared to the acid washing and thermal process affected negatively the functional properties of the proteins.

1. INTRODUÇÃO

Uma das características mais importantes do grão de amaranto é o seu teor de proteína, entre 14-19%, superior à maioria dos cereais (CORDERO-DE-LOS-SANTOS et al., 2005; AVANZA e AÑÓN, 2007). As principais frações protéicas no grão são albuminas, globulinas e glutelinas, as quais diferem em sua solubilidade (MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996). Estudos têm mostrado que as proteínas de amaranto apresentam perfil de aminoácidos balanceado, incluindo altas concentrações de lisina, triptofano e metionina (COSTA e BORGES, 2005; KIM et al., 2006). A inclusão de produtos protéicos de amaranto na formulação de alimentos depende amplamente de suas propriedades funcionais, as quais estão diretamente relacionadas com suas características estruturais (MARCONE e KAKUDA, 1999) e com as diferentes condições de processamento, tais como temperatura, pH e força iônica (GAMEL et al., 2006; AVANZA e AÑÓN, 2007). Embora propriedades físico-químicas de proteínas de amaranto venham sendo amplamente estudadas (MARCONE et al., 1994; MARTÍNEZ et al., 1997; GORINSTEIN et al., 2001), o conhecimento sobre o efeito de diferentes processos de obtenção de concentrados protéicos sobre elas ainda é escasso.

As proteínas de amaranto são de difícil dissolução em solventes aquosos, assim, para a obtenção de produtos com maior teor protéico, têm sido utilizadas diferentes condições de pH, força iônica e temperatura, resultando em produtos com diferentes composições, características estruturais e funcionais (MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996; MAHAJAN e DUA, 2002; AVANZA e AÑÓN, 2007). Em alguns estudos, o pH de extração utilizado para aumentar o rendimento de extração é ≥ 10 (LUQUEZ et al., 1996; BEJOSANO e CORKE, 1998), o que pode levar à reações indesejáveis, como a formação de lisoalanina, resultando na diminuição da digestibilidade e do valor biológico da proteína (FINOT, 1997).

Por outro lado, a presença de componentes, tais como os compostos fenólicos, que podem interferir na extração da proteína e limitar seu uso na indústria de alimentos (LORENZ e WRIGHT, 1984; KLIMCZAK et al., 2002; GAMEL et al., 2006) são pouco estudados no caso do amaranto. Considerando estes pontos e a limitada informação disponível sobre processos alternativos para obtenção de produtos de amaranto, foram

propostos três processos: (1) processo convencional para obtenção de isolados protéicos, utilizando pH 9,0 na extração, (2) lavagem ácida prévia à extração protéica, com objetivo de reduzir o teor de compostos fenólicos e diminuir as interações proteína-fenol; (3) processo térmico, que teve por finalidade contribuir com o desdobramento da proteína em condições de extração protéica alcalina, realizada com aquecimento moderado. Os produtos obtidos foram avaliados em relação a algumas propriedades físicoquímicas e de solubilidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

Foram utilizadas sementes de amaranto (*Amaranthus cruentus*), variedade BR Alegria, obtidas por doação da EMBRAPA Cerrados – Planaltina - DF.

2.2 Obtenção dos concentrados protéicos de amaranto (CPAs)

A farinha integral de amaranto foi obtida por moagem em moinho de facas (modelo MA630, Marconi, Piracicaba-SP, Brasil) e peneirada até obter-se farinha com granulometria $\leq 425 \mu\text{m}$. As frações com granulometria $> 425 \mu\text{m}$ foram moídas novamente, por 3 vezes, para obter a granulometria desejada. Para obtenção da farinha desengordurada, a farinha integral foi tratada com hexano 1:6 (p/v), por 24 h, a temperatura ambiente. O solvente foi removido por centrifugação a $9000 \times g/30 \text{ min}$, a 4°C , em centrífuga (modelo RC5C, Sorvall® Instruments Dupont, Wilmington, Alemanha). A farinha permaneceu em capela de exaustão a temperatura ambiente, até completa evaporação do solvente, sendo posteriormente armazenada a 4°C até seu uso.

Três processos foram usados para obtenção dos concentrados protéicos: (1) processo convencional para obtenção de isolados protéicos (SALCEDO-CHÁVEZ et al., 2002), apresentado na Figura 1. O CPA resultante deste processo foi denominado concentrado protéico padrão (CPAp); (2) lavagem ácida prévia à extração protéica (Figura 2), com objetivo da obtenção de um concentrado com baixo teor de compostos fenólicos (L'HOCINE et al., 2006). O CPA foi denominado CPA_{Ala}. O processo seguiu as mesmas etapas do processo convencional (1), porém a FDA foi previamente dispersa (1:10) em água em pH 4,5, agitada por 30 min a temperatura ambiente e centrifugada. O precipitado

foi, então, levado para extração protéica alcalina, conforme descrito para o CPAP; (3) a extração protéica alcalina (pH 9,0) foi realizada a 50 °C por 2 h, sob agitação constante (Figura 3). O CPA obtido deste último processo foi denominado concentrado protéico tratado termicamente (CPAtt).

A farinha desengordurada foi obtida em 3 bateladas e os CPAs utilizados (CPAP, CPAla e CPAtt) em 8 bateladas cada. O teor de proteína foi determinado em cada batelada e bateladas com teor protéico menor a 70% foram descartadas. As análises foram realizadas a partir da mistura das respectivas bateladas.

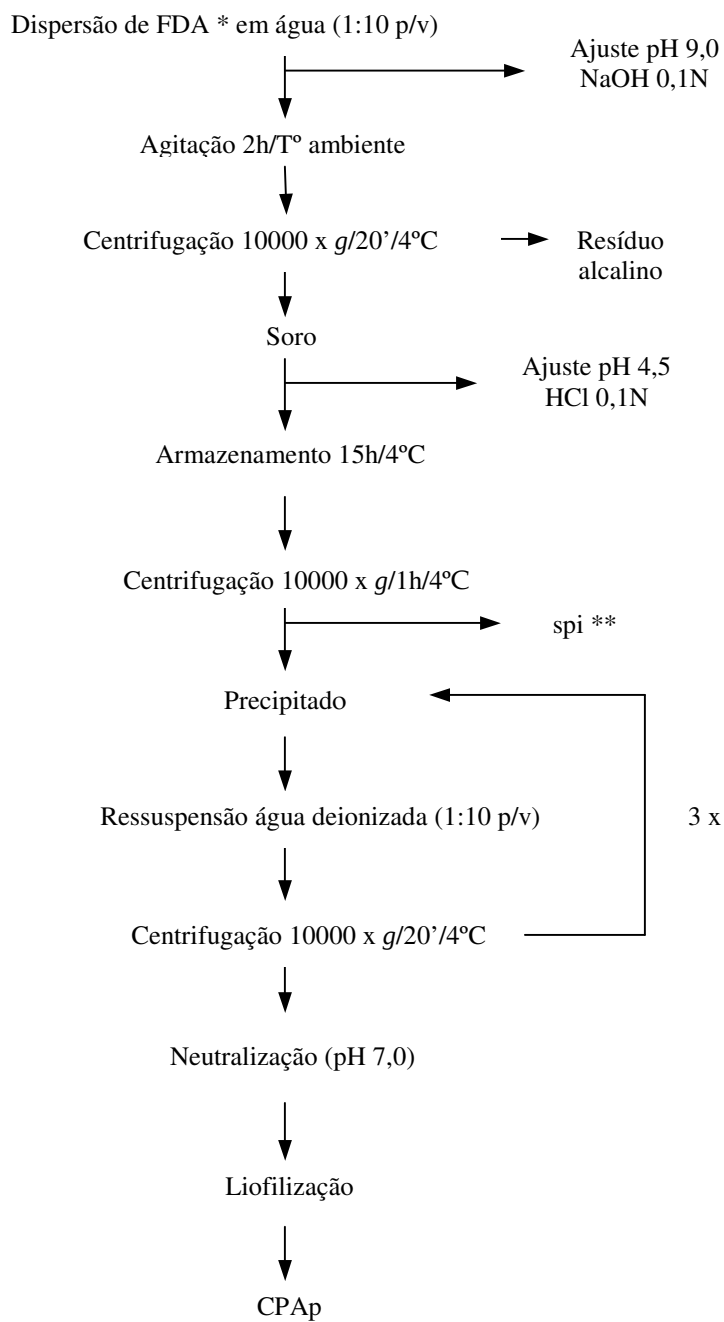


Figura 1. Obtenção do concentrado protéico de amaranto padrão (CPAp) baseado no processo convencional de obtenção de isolados protéicos.

*FDA: farinha desengordurada de amaranto, **spi: soro após precipitação isoelétrica.

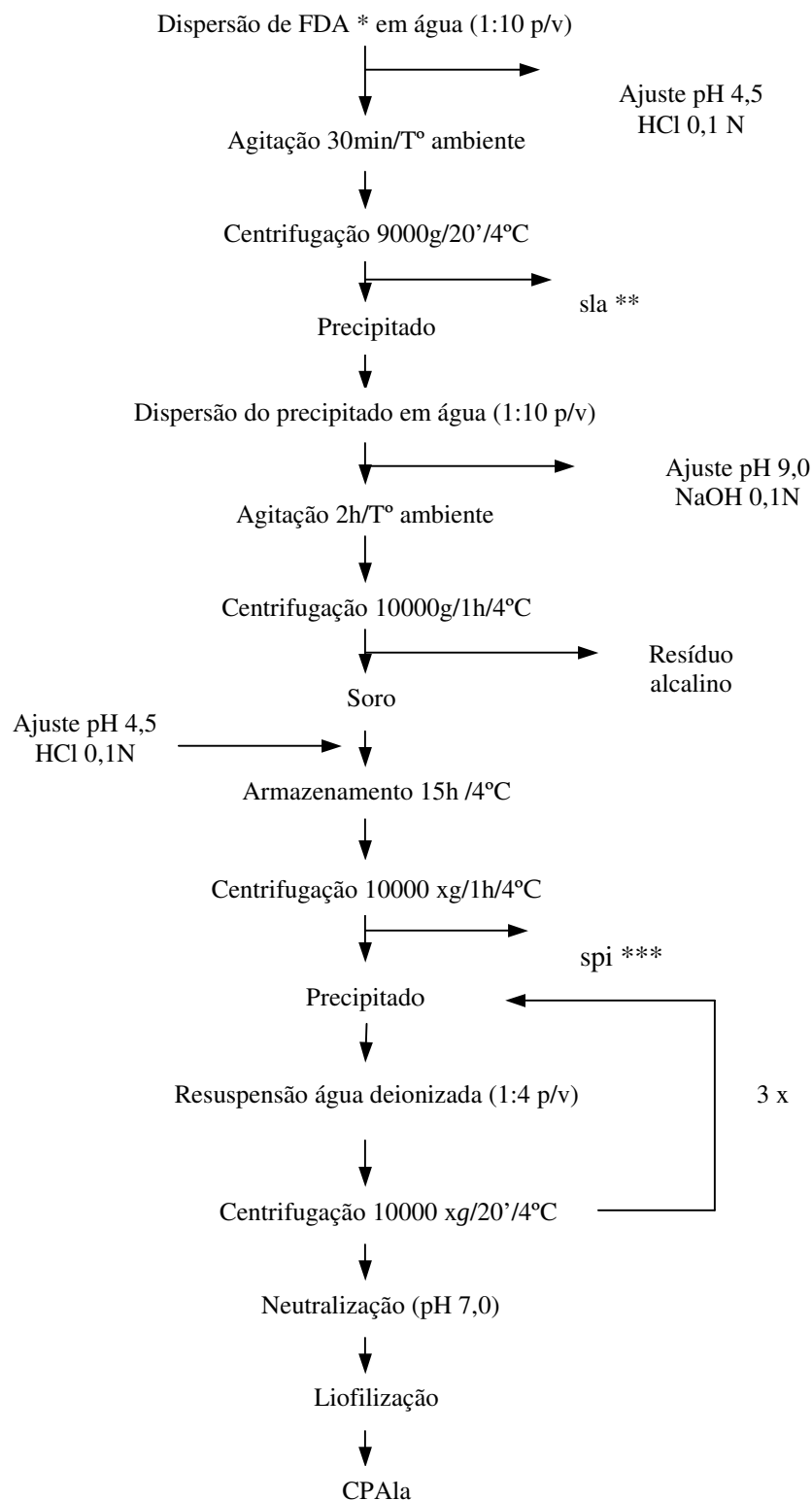


Figura 2. Obtenção do concentrado protéico de amaranto pelo processo de lavagem ácida (CPAla).
 *FDA: farinha desengordurada de amaranto, **sla: soro após lavagem ácida, ***spi: soro após precipitação isoeletrica.

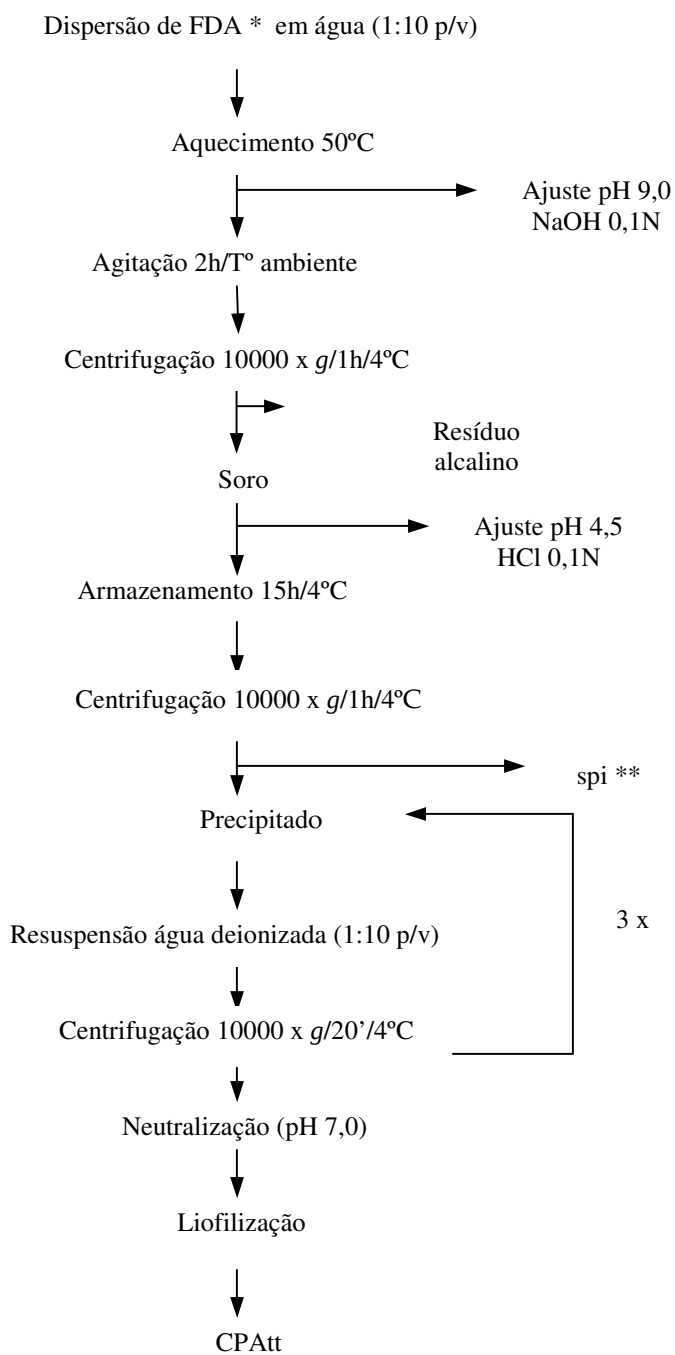


Figura 3. Obtenção do concentrado protéico de amaranto pelo processo térmico a 50°C (CPAtt).

*FDA: farinha desengordurada de amaranto, **spi: soro após precipitação isoelétrica (spi).

2.3 Composição centesimal das FIAs, FDAs e CPAs

Os teores de cinzas e umidade das farinhas (FIA e FDA) e CPAs foram determinados de acordo com a AOAC (2005). O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 2005), sendo o de proteínas obtido multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator de conversão 5,85 (MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996). Lipídios totais foram determinados pelo método de Bligh e Dyer (1959), e o teor de amido foi determinado de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). As análises foram realizadas em triplicata. Os rendimentos dos CPAs (g CPA/100 g FDA) e rendimentos protéicos nos CPAs, soros e resíduos (proteína total da farinha recuperada em cada produto em relação à proteína na matéria prima utilizada) também foram determinados.

2.4 Compostos fenólicos totais

O teor de fenólicos totais das farinhas (FIA, FDA), concentrados protéicos e soros protéicos correspondentes aos processos de lavagem ácida (sla + spi), térmico (spi) e convencional (spi) foi determinado pelo método colorimétrico utilizando reagente de Folin-Ciocalteu, a partir de seus respectivos extratos metanólicos (TSALIKI et al., 1999 com modificações). Para obtenção dos extratos metanólicos, amostras das farinhas foram misturadas com metanol na proporção de 1:5 (p/v) e de concentrados e soros protéicos na proporção de 1:20 (p/v), em um agitador de tubos por 10 minutos e logo aquecidas a 50 °C por uma hora. Em seguida, as amostras foram resfriadas e filtradas em membrana 0,45 µm (Millipore). Volume de 100 µL dos extratos metanólicos das amostras foram misturadas com 2 mL de Na₂CO₃ 2%. Após 2 minutos, 100 µL do reagente Folin- Ciocalteu (1:1) foram adicionados à mistura. A absorbância foi medida a 750 nm após 30 minutos, utilizando-se água destilada como branco. Para a elaboração da curva padrão, foi utilizado o ácido gálico nas concentrações de 20 a 120 µg/mL dissolvido em água destilada. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso como equivalentes de ácido gálico (EAG).

2.5 Caracterização dos CPAs

2.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil das proteínas dos CPAs e dos soros protéicos (sla, spi) foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970). Nesta metodologia dois tipos de géis são usados: gel de separação (12% T e 4% C) e gel de empacotamento (4% T e 2,67% C), sendo que T é referido à concentração total do monômero e C à concentração do crosslinking. Amostras dos CPAs e soros contendo 0,4% de proteína foram diluídos em 2 mL de tampão redutor (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%) e aquecidos a 90 °C por 5 minutos. Posteriormente volumes de 15 μ L das soluções aquecidas foram aplicados nos géis. Padrões de 14,4 a 97,4 kDa (Bio-Rad, cód. 161-0304, Steinheim, Alemanha) foram utilizados para determinação da massa molecular das frações protéicas. Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie Blue G-250 0,1% e descorados em solução ácido acético/metanol/água (1:4:5).

2.5.2 Grupos sulfidrilas livres (SH)

Para determinação dos grupos sulfidrilas livres foi utilizado o procedimento descrito por Castellani et al. (1999), utilizando-se reagente de Ellman. Para determinação dos grupos SH totais, 10 mg de proteína das amostras foram dissolvidas em tampão pH 8,0 (Tris 0,08 mol/L; glicina 0,09 mol/L; EDTA 0,04 mol/L e uréia 8 mol/L). Após 1 h, as soluções foram centrifugadas a 16000 x *g* a 20 °C por 20 min e, em seguida, 3 mL dos sobrenadantes foram misturados com 40 μ L do reagente de Ellman (4 mg/mL de ácido 5,5'- ditiobis (2 - nitrobenzoico (DTNB) em metanol). Após 15 min, a absorbância foi monitorada a 412 nm e um coeficiente com absorção molar de 13600 M⁻¹ cm⁻¹ foi utilizado. Os grupos SH reativos foram determinados utilizando-se o mesmo tampão, porém sem uréia.

2.5.3 Calorimetria diferencial de varredura

O comportamento térmico dos CPAs foi analisado com um calorímetro DSC 2920 (TA Instruments, New Castle, USA), segundo a metodologia descrita por Martínez e Añón

(1996). O equipamento foi calibrado com índio com taxa de aquecimento de 10°C/min. Alíquotas de 10 mg das dispersões protéicas (20% p/v) foram acondicionadas em cápsulas herméticas de alumínio e aquecidas a 10 °C/min na faixa de 20 a 120 °C/min. A temperatura de desnaturação e a entalpia de transição foram obtidas pela análise dos termogramas com o programa Universal Analysis Instruments, versão 4.3A.

2.5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência - exclusão molecular (CLAE-EM)

Utilizou-se cromatógrafo Varian (bomba 9012 – série 04824 e detector UV 9050 – série 02570, Califórnia-EUA) e uma coluna BioSep-SEC-S 2000 Phenomenex (300 x 7,8 mm) série 333734-50. Volumes de 20 µL das amostras, 0,5 mg/mL de proteína em tampão fosfato de sódio foram injetados na coluna e eluídas com tampão fosfato de sódio 0,05 M (NaCl 0,15 M, pH 6,8) a 30 °C, com fluxo de 0,4 mL/min e a absorbância foi monitorada a 280 nm. As massas molares aparentes correspondentes aos picos eluídos foram estimadas a partir de uma curva de calibração construída com massas molares 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). A equação linear resultante da curva de calibração foi:

$$\text{Log MM} = -0,5418V_e + 5,7674 \quad (r^2 = 0,9914)$$

onde: V_e é o volume de eluição de uma determinada fração protéica do concentrado em mililitros e MM é a massa molar aparente em kDa.

2.5.6 Solubilidade

A solubilidade protéica dos CPAs foi determinada a partir de dispersões 1% de proteína (p/v) em 0,05 mol/L de cloreto de sódio ou água destilada, ajustando o pH para 3,0; 4,5 e 7,0 com 0,1 N de HCl ou 0,1 N de NaOH (MORR et al., 1985). As dispersões protéicas foram misturadas sob agitação magnética por 1 h, seguida pela centrifugação a 20000 x g por 30 min. A proteína solúvel foi determinada pelo método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 2005).

2.5.7 Avaliação de cor dos CPAs

Os parâmetros de cor dos CPAs foram determinados em espectrofotômetro-colorímetro modelo ColorQuest II, marca HunterLab (EUA) utilizando a escala CIELab, ângulo do observador 10° e luz padronizada D₆₅. Os parâmetros de medida foram: Luminosidade (L*), verde e vermelho (a*) e amarelo e azul (b*). O índice de claridade (IC) foi calculado com a equação (MARCONE e KAKUDA, 1999):

$$IC = L^* - 3b^*$$

As medidas em cada amostra foram realizadas com cinco repetições, obtendo-se valores médios de L*, a* e b*.

2.6 Análise estatística

Os resultados do teor protéico, rendimento do concentrado, rendimento protéico, solubilidade, grupos SH, fenólicos totais e parâmetros de cor foram avaliados estatisticamente pela média dos valores, análise de variância e teste de Tukey, a um nível de significância de 5% (p<0,05), através do software STATISTICA (Tulsa, OK, U.S.A., 1995), version 6.0.

3. RESULTADOS

A composição centesimal da farinha integral (FIA), farinha desengordurada (FDA) e concentrados protéicos de amaranto (CPAs) estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal das farinhas e concentrados protéicos de amaranto

Composição	% (base seca) *				
	FIA	FDA	CPAp	CPAla	CPAtt
Proteínas	14,9 ± 0,2	16,5 ± 0,3	73,6 ± 0,4 ^a	77,8 ± 0,3 ^b	75,2 ± 0,2 ^c
Lipídios	7,6 ± 0,1	1,9 ± 0,1	3,3 ± 0,1 ^a	2,9 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,2 ^b
Cinzas	3,0 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,5 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,1 ^a
Carboidratos totais**	74,5 ± 0,2	78,4 ± 0,2	19,6 ± 0,1 ^a	15,7 ± 0,3 ^b	17,6 ± 0,1 ^{bc}
Amido	55,9 ± 0,4	51,9 ± 0,3	4,9 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,2 ^b	6,4 ± 0,3 ^c

* valores representam média ± desvio padrão; n=3. Médias de cada linha com diferente letra diferem significativamente (p<0,05), de acordo ao teste de comparação de médias de Tukey

** Determinado por diferença

FIA: farinha integral de amaranto, FDA: farinha desengordurada de amaranto, CPAp: concentrado protéico de amaranto padrão, CPAla: concentrado protéico de amaranto lavagem ácida, CPAtt: concentrado protéico de amaranto tratado termicamente

A farinha desengordurada apresentou teor de proteína semelhante aos valores relatados por Salcedo-Chávez et al. (2002) e Cordero-de-los-Santos et al. (2005), que trabalharam com as variedades *A. cruentus* e *A. hypochondriacus*. O teor de proteína do CPAp foi maior do que os obtidos por Luquez et al. (1997) e Escudero et al. (2004), sendo de 55 e 52% respectivamente, para *A. mantegazzianus* e *A. cruentus*. Os autores utilizaram a técnica de solubilização da proteína em pH 11 e precipitação em pH 4,5. Contudo, os resultados foram semelhantes aos relatados por Bejosano e Corke (1998) para a mesma variedade, seguindo o processo de moagem úmida alcalina para isolamento do amido.

O teor de lipídios e de carboidratos do CPAp foi a metade dos valores obtidos por Luquez et al. (1997) e Escudero et al. (2004), demonstrando que a etapa de desengordurado da farinha integral que é comumente usada para melhorar a extração de proteína resultou em concentrados protéicos com maior teor de proteína quando comparado com os concentrados protéicos obtidos por solubilização da proteína em pH 11,0, onde não foi realizada a etapa de desengorduramento. Houve redução de carboidratos, 19,8 e 10,2%, no CPAIa e CPAtt, respectivamente, em relação ao CPAp, no entanto, foi observado aumento de 9% nos lipídios do CPAtt.

Os CPAs em estudo apresentaram teores semelhantes de cinzas, diferindo nos teores de proteína e amido para os três processos $p < (0,05)$. A Tabela 2 mostra os teores de proteína e os rendimentos nas diversas etapas de obtenção dos CPAs pelos três processos em estudo. O teor de proteína do CPAtt e CPAIa apresentaram pequeno aumento em relação ao CPAp, 2 e 6% respectivamente ($p < 0,05$). L'Hocine et al. (2006), trabalhando com os mesmos processos utilizados na presente pesquisa para produção de isolados protéicos de soja, não observaram aumento significativo nos teores de proteína dos isolados obtidos, 98, 96 e 94%, correspondentes aos processos de lavagem ácida, convencional e térmico, respectivamente. No presente trabalho foi observado que o comportamento de extração protéica pelo tratamento térmico foi inverso ao apresentado pela soja, que teve menor solubilização da proteína na etapa de extração protéica.

O rendimento (do concentrado e de proteína) do CPAtt foi 10% superior ao do CPAp, enquanto o CPAIa, quando comparado ao CPAp apresentou rendimento 25% inferior. O rendimento de obtenção dos CPAs foi semelhante ao reportado por Martínez e Añón (1996), porém inferiores aos relatados por Salcedo-Chávez et al. (2002) para isolados

de *A. cruentus* (53,4 a 61%) e Cordero-de-los-Santos et al. (2005) para isolados de *A. hypochondriacus* (56,4%). O efeito dos três processos sobre o rendimento protéico dos CPAs no presente trabalho e de isolados protéicos de soja obtidos por processos semelhantes (L'HOCINE et al., 2006) foi similar, sendo que o processo térmico resultou em maior recuperação de proteína, seguido pelos processos convencional e ácido.

Tabela 2. Efeito dos processos sobre o teor de proteína, rendimentos dos concentrados e rendimentos protéicos dos concentrados, soro total e resíduos

CPAs	% (base seca) *				
	CPAs		Rendimento protéico		
	Rendimento	Proteína	CPAs	Soro total	Resíduo
CPAp	5,1 ± 0,4 ^a	73,6 ± 0,4 ^c	22,3 ± 0,3 ^e	15,7 ± 1,1 ^g	53,4 ± 1,1 ⁱ
CPAla	3,7 ± 0,1 ^b	77,8 ± 0,3 ^d	17,8 ± 1,3 ^f	29,2 ± 1,6 ^h	46,2 ± 1,2 ^j
CPAtt	5,6 ± 0,4 ^a	75,2 ± 0,2 ^{cd}	25,6 ± 0,5 ^e	22,4 ± 1,7 ^{gh}	50,6 ± 0,9 ⁱ

* Valores representam média ± desvio padrão; n = 3. Rendimento do concentrado: g de concentrado/100 g de farinha desengordurada, rendimento protéico: percentagem da proteína total da farinha desengordurada recuperada no concentrado, soro total e resíduo

Valores de cada coluna com diferente letra diferem significativamente (p<0,05), de acordo ao teste de comparação de médias de Tukey

CPAs: concentrados protéicos de amaranto: CPAp: concentrado protéico padrão, CPAla: concentrado protéico lavagem ácida, CPAtt: concentrado protéico tratado termicamente

A maior perda de proteína nas etapas de obtenção dos CPAs foi no resíduo alcalino, sendo que o processo de lavagem ácida produziu a menor perda (p<0,05) nesta etapa em relação aos demais processos (Tabela 2). A perda de proteína no soro total do processo ácido foi duas vezes maior que no processo convencional. Bejosano e Corke (1998) também relataram baixa recuperação de proteína (37,6%) na obtenção do concentrado protéico com quantidades significativas de proteína perdidas/presente no resíduo alcalino. A somatória da massa de proteína em todas as etapas foi menor que 100%, indicando perdas não quantificadas ao longo do processo, possivelmente na recuperação dos precipitados após a centrifugação.

3.1 Compostos fenólicos totais e parâmetros de cor

A Tabela 3 mostra o teor de fenólicos totais presente nas farinhas, CPAs e nos soros obtidos nos processos. O teor de fenólicos totais na FIA e FDA está dentro da faixa

reportada para cereais (0,2 a 1,3 mg EAG/g amostra) (KÄHKÖNEN et al., 1999). Outros autores têm relatado teor de fenólicos na farinha de 5,2 a 5,9 mg de equivalente de ácido tânico por kg de amostra (GAMEL et al., 2006) e 39,2 a 56,2 mg de equivalente de ácido caféico por 100 g de amostra (KLIMCZAK et al., 2002). O CPAp apresentou teor de fenólicos semelhantes ao relatado por Bejosano e Corke (1998), entanto o CPAIa e CPAtt apresentaram teores de fenólicos equivalentes a 63 e 50% do teor encontrado no CPAp (0,5 e 0,4 mg EAG/g amostra, respectivamente). Todos os CPAs apresentaram maiores teores de fenólicos que a FDA, cerca de 2,6 vezes maior no caso do CPAp. Para concentrados protéicos de amaranto (*A. cruentus*), Bejosano e Corke (1998) também observaram aumento do teor de fenólicos totais do que a FIA, cerca de 3,5 vezes, porém, em relação à proteína presente nas amostras observaram redução de 40%. O teor de fenólicos totais em relação à quantidade de proteína na amostra do CPAIa e CPAtt apresentou redução de 65 e 71%, respectivamente. A maior redução de compostos fenólicos observado no presente trabalho foi possivelmente devido ao menor tempo de exposição seguido nos processos de obtenção do CPAs em relação à prolongada extração alcalina (24 h) utilizada por Bejosano e Corke (1998). Segundo Shamanthaka e Narasinga (1990) durante o isolamento da proteína, proteínas e compostos fenólicos são liberados no meio alcalino, sendo que estes últimos são oxidados para quinonas e, sob esta forma estrutural, são altamente reativos para ligar-se às proteínas.

O teor de fenólicos totais nos soros do processo de lavagem ácida foi significativamente maior (33%) que os do processo convencional, enquanto que no soro do processo térmico, foi 30% menor ($p < 0,05$). Considerando que no processo térmico o soro apresentou baixo teor de fenólicos em relação aos outros processos e o CPAtt teor de fenólicos semelhante ao CPAIa, sugere-se que maior teor de fenólicos foi perdido no resíduo. No processo térmico, a temperatura e o tempo de aquecimento podem favorecer a reação proteína-fenol (BEJOSANO e CORKE, 1998; PI-JEN e CHEN-HUE, 2006; GAMEL et al., 2006) e esta pode ser a causa da redução de compostos fenólicos no CPAtt devido à formação de complexos proteína-fenol que precipitaram no resíduo alcalino.

Tabela 3. Teores de compostos fenólicos totais das farinhas, concentrados protéicos e soro total obtidos pelos diferentes processos

Compostos fenólicos totais (mg EAG/g de matéria seca) *				
Farinhas		CPAs	Soro total **	CPAs **
FIA	FDA			
0,4	0,3	CPAp	23,5 ± 0,3 ^a	0,8 ± 0,1 ^d
		CPAla	31,3 ± 0,5 ^b	0,5 ± 0,1 ^e
		CPAtt	16,3 ± 0,6 ^c	0,4 ± 0,1 ^e

* Valores representam média ± desvio padrão; n = 3

** Valores de cada coluna com diferente letra diferem significativamente (p<0,05) de acordo ao teste de comparação de médias de Tukey

FIA: farinha integral de amaranto, FDA: farinha desengordurada de amaranto, CPAs: concentrados protéicos de amaranto, CPAp: concentrado protéico padrão, CPAla: concentrado protéico lavagem ácida, CPAtt: concentrado protéico tratado termicamente

Os parâmetros de cor dos CPAs são apresentados na Tabela 4. Foram observadas diferenças significativas das condições de processo sobre o índice de luminosidade (L*). O CPAla apresentou maior índice de luminosidade em relação ao CPAp e CPAtt, indicando que a lavagem ácida prévia à extração protéica resultou em produto mais claro que os demais processos. Os menores valores para os índices de vermelho (a*) e amarelo (b*) foram observados no CPAla e CPAtt, o que pode ser visto como uma tendência de alteração da cor do CPAla e CPAtt quando comparados com a cor do CPAp como consequência da redução de compostos fenólicos nesses concentrados

Tabela 4. Componentes básicos da escala L* a* b* dos CPAs

CPAs	L*	a *	B *	IC
CPAp	76,3 ± 0,5 ^a	1,2 ± 0,1 ^a	14,3 ± 0,2 ^a	33,3 ± 0,1 ^a
CPAla	77,8 ± 0,5 ^b	0,9 ± 0,1 ^b	12,9 ± 0,5 ^b	39,1 ± 1,5 ^b
CPAtt	75,2 ± 0,3 ^c	1,0 ± 0,1 ^b	12,6 ± 0,1 ^{bc}	37,4 ± 0,1 ^c

* Valores representam média ± desvio padrão, n = 5. Valores de cada coluna com diferente letra diferem significativamente (p<0,05) de acordo ao teste de comparação de médias de Tukey

CPAs: concentrados protéicos de amaranto, CPAp: concentrado protéico padrão, CPAla: concentrado protéico lavagem ácida, CPAtt: concentrado protéico tratado termicamente

Coordenadas de cor para grau de luz (L*), vermelho/verde (a*), amarelo/azul (b*)

Visualmente os processos de lavagem ácida e térmico produziram CPAs com cor mais clara nos CPAla e CPAtt (Figura 4), sendo que o CPAla apresentou maior claridade,

confirmando os resultados obtidos através da escala CIE Lab. Resultados semelhantes foram observados em isolados protéicos de soja obtidos por processo de lavagem ácida, os quais se mostraram mais claros do que os isolados protéicos obtidos pelos processos convencional e térmico (L'HOCINE et al., 2006).

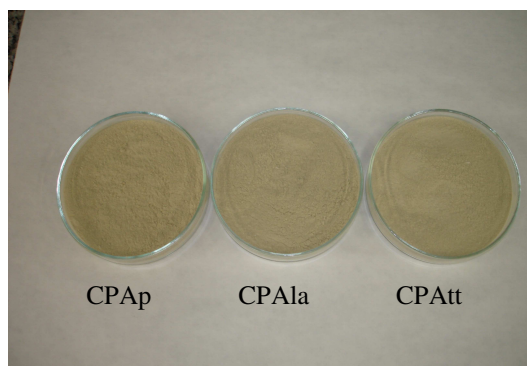


Figura 4. Fotografia dos CPAs.

CPAp: concentrado protéico padrão, CPAIa: concentrado protéico lavagem ácida e CPAtt: concentrado protéico tratado termicamente.

3.2 Eletroforese SDS-PAGE

O perfil eletroforético (SDS-PAGE) dos CPAs e soros protéicos é apresentado na Figura 5.

Os perfis dos concentrados CPAIa e CPAtt foram semelhantes ao do CPAp, porém uma banda com massa molar acima de 97 kDa foi observada no CPAtt indicando agregação devido ao tratamento térmico. Foram observadas frações na faixa de 15 a 64 kDa (15,3; 18,4; 21,4; 24,9; 39,7; 46,1; 58,8; 64,5 kDa). A fração com 64,5 kDa é uma globulina (MORA-ESCOBEDO, 1990; BARBA DE LA ROSA et al., 1992; MARCONE e YADA, 1992; SEGURA-NIETO et al., 1994; GORINSTEIN et al., 1996), enquanto bandas com massa molar abaixo de 30 kDa correspondem a albumina-1 (MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996). As bandas de massa molar superior a 30 kDa correspondem aos componentes das frações albumina-2, globulinas e glutelinas (KONISHI et al., 1991; SEGURA-NIETO et al., 1994; MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996). O CPAIa apresentou maior intensidade relativa de suas bandas correspondentes a 39,7 e 64,5 kDa. Essa maior intensidade das bandas também foi

observada no CPAtt, além da presença de um agregado de alta massa molar (> 97 kDa) e uma diminuição de intensidade da banda de 15,3 kDa (Figura 5A, coluna 3), indicando diferenças nas frações protéicas presentes em função dos tratamentos realizados.

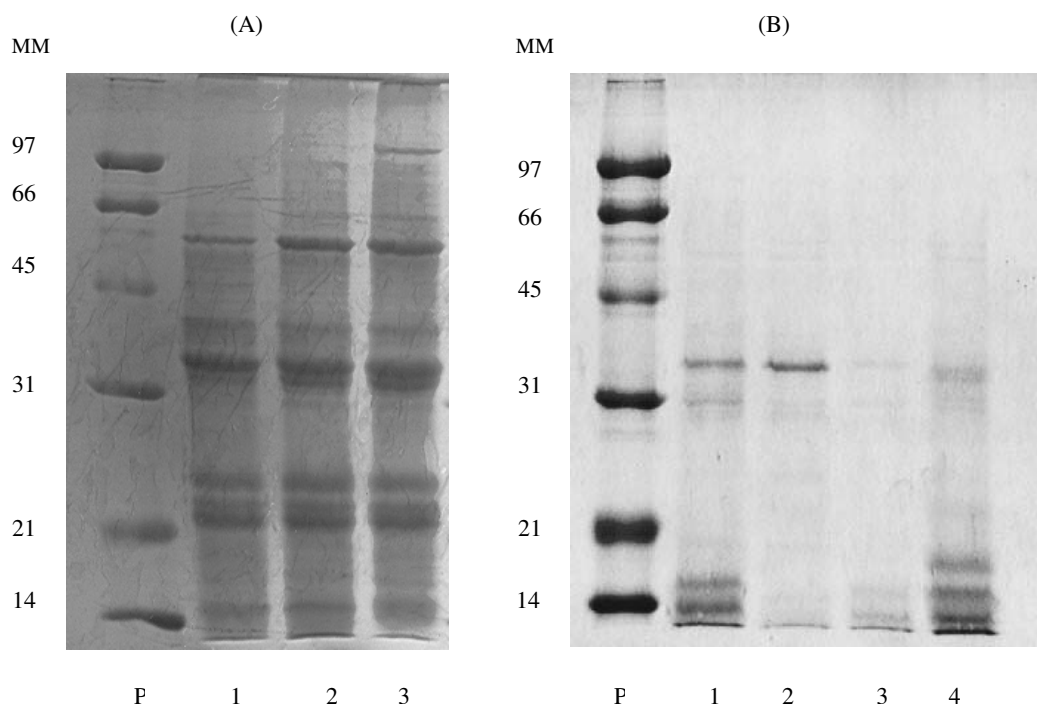


Figura 5. Perfil eletroforético SDS-PAGE dos CPAs (A) e soros protéicos (B) de *A. cruentus*. Coluna P – padrões; coluna 1A e coluna 1B (soro após precipitação isoelétrica) – processo convencional; coluna 2A, coluna 2B (soro após lavagem ácida) e coluna 3B (soro após precipitação isoelétrica) – processo lavagem ácida; coluna 3A e coluna 4B (soro após precipitação isoelétrica) – processo térmico.

3.3 Grupos sulfidrila livres

Os valores dos grupos sulfidrila livres dos CPAs são mostrados na Figura 6. Os processos de lavagem ácida e térmico diminuíram os grupos SH livres totais e reativos do CPA_{la} e CPA_{att} em relação ao processo convencional, possivelmente devido à perda de frações protéicas de baixa massa molar cuja presença foi constatada no perfil eletroforético dos soros protéicos. Porém a exposição dos grupos sulfidrila livres aumentou em 10%, possivelmente como resultado da desnaturação proteica. Estes valores são semelhantes aos

relatados na literatura para isolado de globulina P do amaranto, 3,4 $\mu\text{mol/g}$ em tampão Tris e 10,2 $\mu\text{mol/g}$ após desnaturação com uréia (CASTELLANI et al., 1999).

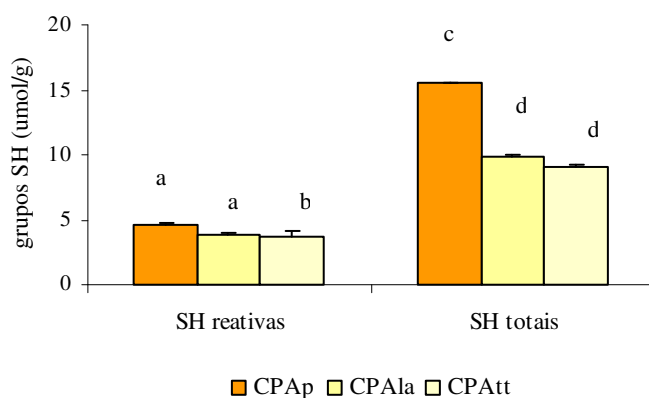


Figura 6. Grupos sulfidrila livres dos CPAs. Valores das colunas dentro da série com diferentes letras diferem significativamente ($p < 0,05$) de acordo a o teste de comparação de médias de Tukey. CPAp: concentrado protéico padrão, CPAla: concentrado protéico com lavagem ácida, CPAtt: concentrado protéico tratado termicamente.

3.4 Calorimetria diferencial de varredura

Os termogramas obtidos para CPAp e CPAtt foram semelhantes e caracterizados por 2 picos endotérmicos, enquanto o tratamento ácido apresentou 3 picos endotérmicos (Figura 7). A temperatura de desnaturação (T_d) do primeiro pico, 69,8°C, para todos os processos, corresponde, possivelmente, às frações albumina-1, glutelinas e aos menores componentes das globulinas (MARTÍNEZ et al., 1996; GORINSTEIN et al., 1996; CHEN e PAREDES-LÓPEZ, 1997). Porém, a T_d desse mesmo pico também pode corresponder à gelatinização do amido. Os CPAs, com 73,6 a 77,8% de proteína, apresentam em sua composição outros componentes não protéicos que incluem o amido. Pereira (2004) e Tapia-Blácido (2006), que estudaram sistemas de *A. cruentus* contendo 5 e 4% de amido, respectivamente, concentração de amido equivalente ao teor de amido presente nas suspensões dos CPAs, relataram intervalos de temperatura de gelatinização de 67,7 a 77,4 °C e 68,4 a 72,1 °C, respectivamente. O segundo pico endotérmico do CPAtt e CPAp (101,9 e 101,6 °C respectivamente) e o terceiro pico (103,7 °C) do CPAla correspondem,

possivelmente, às frações protéicas albumina-2 e globulinas-11S, de acordo com relatos de Martínez e Añón (1996) e Avanza e Añón (2007) que estudaram isolados protéicos de *A. hypochondriacus* obtidos por processos semelhantes ao convencional e térmico, respectivamente, utilizados no presente trabalho.

No termograma do CPA_{la}, o segundo pico endotérmico, T_d 78,8 °C e ΔH_t 4,6 J/g de proteína, sugere a presença de compostos fenólicos formando complexos com proteínas de baixa massa molar, que apresentam maior estabilidade térmica que as proteínas. Por outro lado o CPA_{tt} apresentou menor ΔH_t que o CPA_p, indicando moderada desnaturação das frações protéicas devido ao aquecimento na fase de extração alcalina.

Os valores de entalpia de desnaturação total ($\Delta H_t = \Delta H_1 + \Delta H_2 + \Delta H_3$), apresentados na Tabela 5, estão dentro da faixa relatada por Salcedo-Chávez et al. (2002), de 1,55 a 6,85 J/g de proteína, para isolados protéicos de *A. cruentus* obtidos pela extração de proteína na faixa de pH 7,8 a 9,2, seguido pela precipitação isoelétrica na faixa de pH 4,3 a 5,7.

Tabela 5. Valores de entalpia e temperatura de desnaturação dos concentrados protéicos

CPAs	ΔH (J/g de proteína) *			ΔH_t (J/g de Proteína) *	T_d (°C) *		
	Picos				Picos		
	Primeiro	Segundo	Terceiro		Primeiro	Segundo	Terceiro
CPAp	0,3 ± 0,5	3,6 ± 0,1	-	3,9 ± 0,2	69,8 ± 0,1	101,9 ± 0,3	-
CPAla	3,1 ± 0,2 **		1,5 ± 0,1	4,6 ± 0,1	69,8 ± 0,1	78,8 ± 0,5	103,7 ± 0,1
CPAtt	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,7	-	1,9 ± 0,3	69,8 ± 0,1	101,6 ± 0,1	-

* Valores representam média ± desvio padrão

** Somatória dos picos

ΔH : entalpia de desnaturação, T_d : temperatura de desnaturação, ΔH_t : entalpia de desnaturação total

CPAs: concentrados protéicos de amaranto, CPA_p: concentrado protéico padrão, CPA_{la}: concentrado protéico lavagem ácida, CPA_{tt}: concentrado protéico tratado termicamente

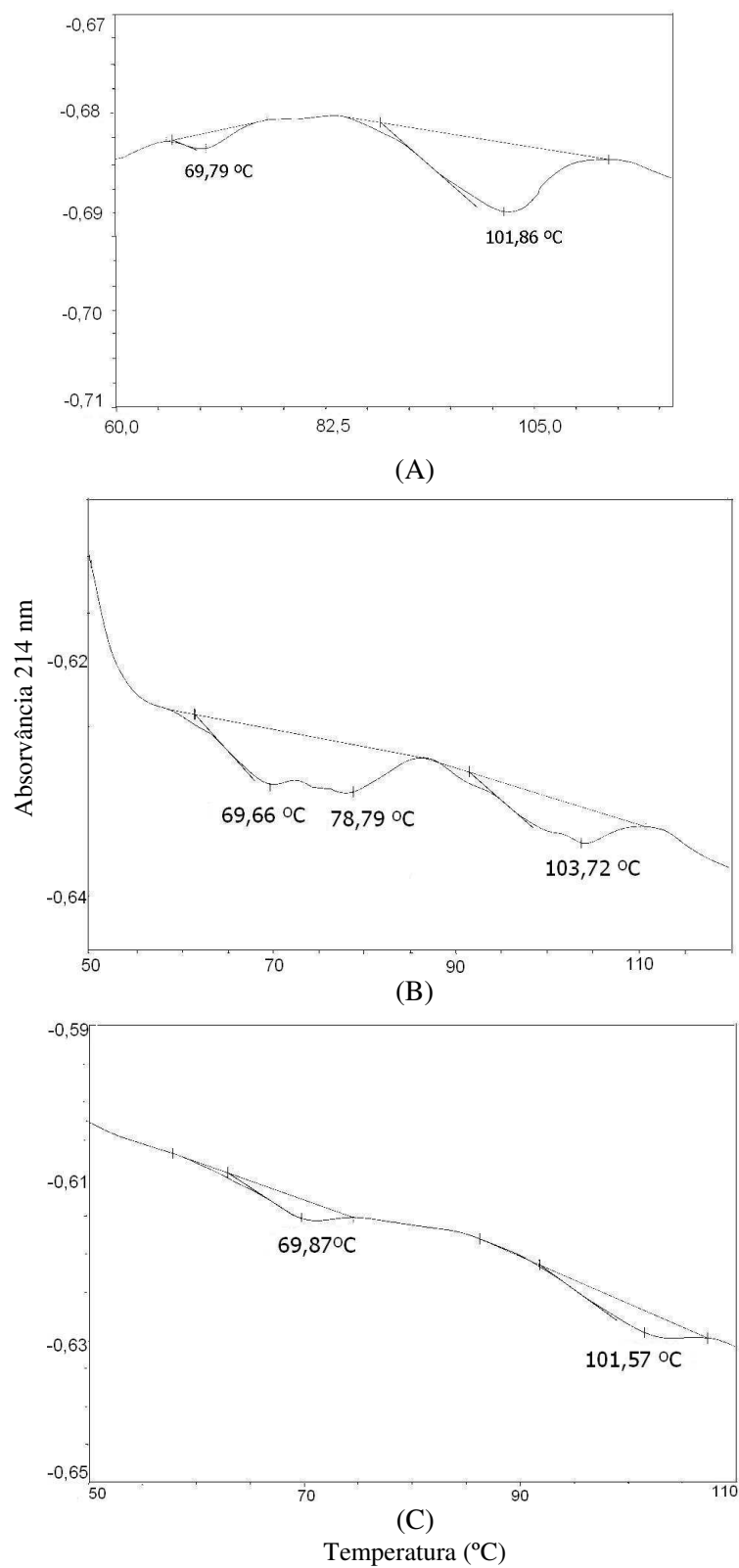


Figura 7. Termogramas dos CPAs obtidos por processo convencional (A), processo de lavagem ácida (B) e processo térmico (C).

T_d: valores de temperatura de desnaturação.

3.5 Cromatografia por exclusão molecular

Os cromatogramas dos CPAs são mostrados na Figura 8. Os concentrados obtidos apresentaram perfis diferentes, indicando associações moleculares diversas. O CPAp apresentou maior número de picos, com massa molar variando de 754,7 a 1,3 kDa (Figura 8A). O pico **O**, com massa molar aparente de 754,7 kDa, indica presença de agregados solúveis de alta massa molar. Osuna-Castro et al. (2000) e Cordero-de-los-Santos et al. (2005) observaram no isolado protéico de *A. hypochondriacus* um pico de massa molar aparente ainda mais elevada, 1380 kDa (elução em tampão Tris-HCl, 0,1 mol/L + NaCl 0,3 mol/L, pH 8,0), atribuído à associação de unidades moleculares de amarantina, com massas molares entre 300 e 350 kDa. Os picos **A** e **B**, com massas molares aparentes de 430 e 260 kDa, respectivamente, correspondem possivelmente às globulinas, de acordo com o relatado por Mora-Escabedo et al. (1990), que trabalharam com isolados de *A. hypochondriacus*. Trabalho de Konishi et al. (1985) com isolado de globulina de *A. hypochondriacus* mostrou que 81% da globulina total eluída em tampão fosfato de potássio correspondeu ao pico de massa molar aparente de 440 kDa. Os picos **C** e **D**, de massa molar < 5 kDa, possivelmente correspondem às proteínas de baixa massa molar (LQARI et al., 2002), enquanto os picos **E** e **F**, compostos secundários, tais como fenóis que foram parcialmente eliminados com os processos de lavagem ácida e térmico (GONZÁLES-PÉREZ et al., 2002) e portanto não aparecem nos cromatogramas do CPAIa e CPAtt (Figuras 8B e 8C, respectivamente). Picos com massas molares semelhantes foram observadas em outros trabalhos para extratos de globulina (picos de 260 e 17 kDa) e albumina (picos de 81 e 12 kDa) de *A. hypochondriacus* (MORA-ESCOBEDO et al., 1990).

Nos cromatogramas do CPAIa (Figura 8B) e do CPAtt (Figura 8C) observou-se a junção de picos, indicando agregação das frações tanto na região de alta como de baixa massa molar. O pico **B** (149 kDa) aparece com menor área no CPAtt que no CPAIa, indicando que houve insolubilização dos agregados de maior massa molecular devido ao tratamento térmico, enquanto os de menor massa molar (pico **D**) continuaram solúveis. Por outro lado o pico **D** do CPAtt apresentou massa molar próxima ao pico **E** do CPAp, isto indicaria possível interação de fenólicos com proteínas de baixa massa molar, como resultado do processo térmico. Os perfis cromatográficos apresentados correspondem apenas ao material solúvel no tampão fosfato (0,05 mol/L, pH 6,8) utilizado como eluente.

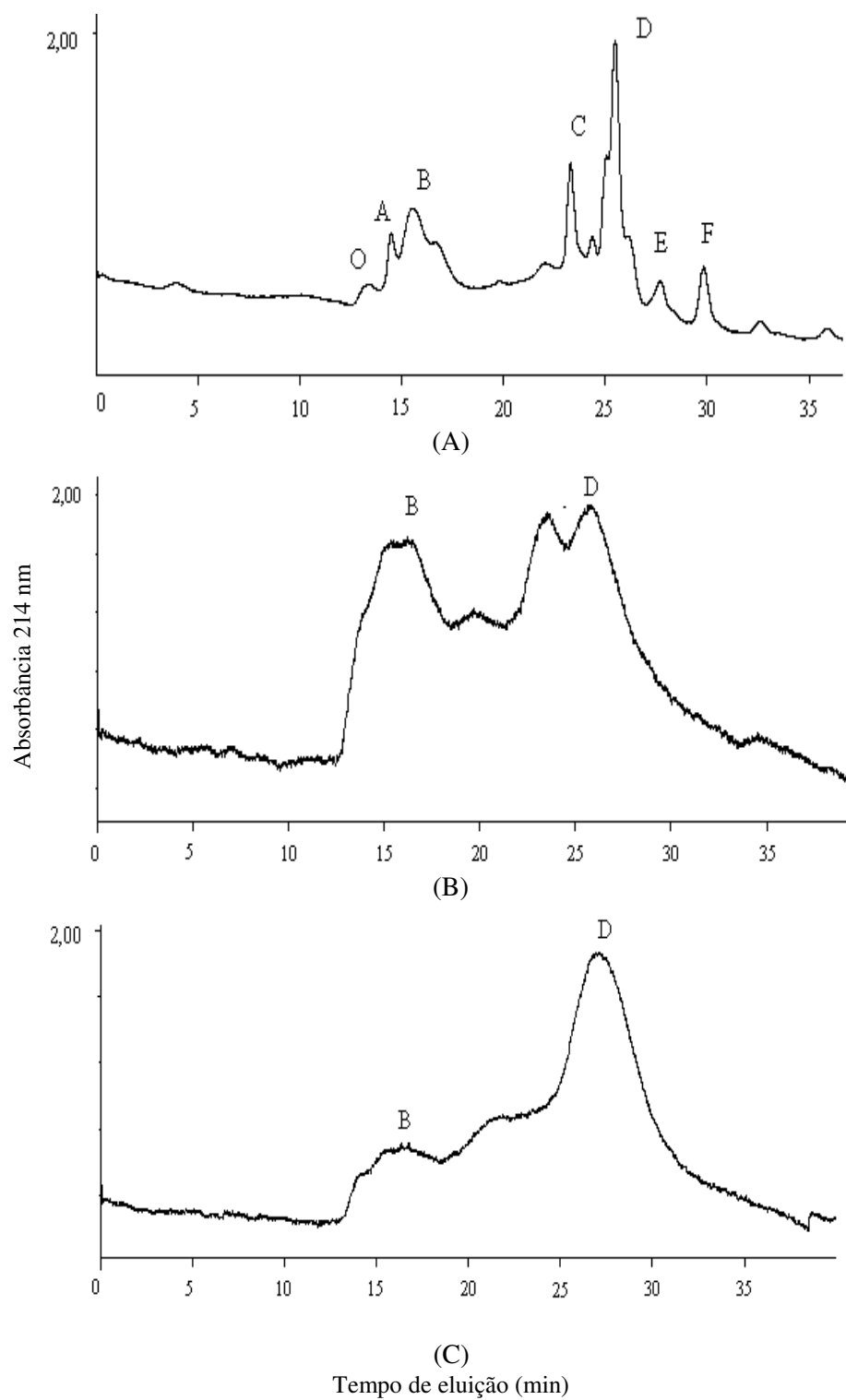


Figura 8. Perfil cromatográfico (CLAE-EM) dos concentrados protéicos. CPAp (A), CPAIa (B) e CPAIt (C).

3.6 Solubilidade dos CPAs

A solubilidade protéica dos CPAs em água e solução NaCl (0,05 mol/L), avaliada em diferentes valores de pH, está apresentada na Tabela 6. Os CPAs obtidos pelos diferentes processos foram mais solúveis ($p < 0,05$) em água (pH 3,0 e 7,0) do que em 0,05 mol/L NaCl, indicando efeito *salting out*. Em água (pH 3,0), o CPA_{la} apresentou solubilidade 17% maior que o CPA_p ($p < 0,05$) e 23% maior que o CPA_{tt}. No entanto, quando a solubilidade do CPA_{tt} é comparado com o CPA_p para o mesmo solvente, observa-se diminuição da solubilidade em 7 e 17% em pH 3,0 e 7,0, respectivamente, e em pH 4,5, a diminuição foi mais acentuada, 58%.

Os valores de solubilidade em água do CPA_p em pH 3,0 e 7,0 foram maiores do que a solubilidade dos concentrados protéicos de 5 variedades de *A. cruentus* nos mesmos pH (10 a 45% e 20 a 58%, respectivamente), obtidos por Bejosano e Corke (1998), seguindo o processo de moagem úmida alcalina.

Houve diferenças significativas de solubilidade em NaCl 0,05 mol/L entre os CPAs em todos os pH avaliados. Foi observado o mesmo comportamento de solubilidade em água nos três pH, maior solubilidade para o CPA_{la} seguido do CPA_p e CPA_{tt}. A solubilidade dos concentrados em NaCl 0,05 mol/L nos pH 3,0 e 7,0, quando comparada com a solubilidade em água, diminuiu mais que 30% e, em pH 4,5, manteve valores próximos.

O comportamento de solubilidade do CPA_{tt} tanto em água como em NaCl 0,05 mol/L confirmou os resultados obtidos no perfil cromatográfico que indicaram agregação das proteínas pelo tratamento térmico e portanto menor solubilidade.

Tabela 6. Solubilidade protéica (%) dos concentrados protéicos de amaranto (CPAs) avaliada em água e em solução 0.05 mol/L NaCl.

pH	Água		
	CPAp	CPAla	CPAtt
3,0	52,3 ± 2,8 ^a	62,7 ± 3,5 ^b	48,5 ± 2,9 ^a
4,5	6,4 ± 0,6 ^c	5,7 ± 0,5 ^c	3,8 ± 1,1 ^d
7,0	43,2, ± 2,4 ^e	52,2 ± 1,3 ^e	39,6 ± 1,9 ^e
0,05 mol/L NaCl			
3,0	32,1 ± 1,3 ^j	40,7 ± 0,6 ^k	28,9 ± 1,2 ^c
4,5	5,5 ± 0,2 ^d	6,4 ± 0,3 ^l	3,3 ± 0,1 ^f
7,0	29,2 ± 1,2 ^g	36,0 ± 1,0 ^h	25,1 ± 0,9 ⁱ

Valores representam média ± desvio padrão, n = 3.

Valores da mesma coluna, para cada solvente (água ou solução de NaCl), com letras diferentes diferem significativamente (p<0,05,) de acordo ao teste de comparação de médias de Tukey

CPAs: concentrados protéicos de amaranto, CPAp: concentrado protéico de amaranto padrão, CPAla: concentrado protéico de amaranto lavagem ácida, CPAtt: concentrado protéico de amaranto tratado termicamente

4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo, perfil eletroforético e cromatográfico, propriedades térmicas e solubilidade, confirmaram outros relatos da literatura, que diferentes condições de processo na obtenção de isolados e concentrados protéicos de outras fontes vegetais, afetam a estrutura molecular das proteínas e podem resultar em alterações, desejáveis ou indesejáveis, de suas propriedades funcionais (WAGNER et al., 1996; NIELSON, 1997; L'HOCINE et al., 2006). Outra consideração importante é o papel dos compostos fenólicos na extração e propriedades funcionais das proteínas. A interação proteína-fenol, além de ter efeitos na desnaturação térmica e solubilidade das proteínas, pode afetar a digestibilidade e outras propriedades funcionais da proteína (RUBINO et al., 1996; BEJOSANO e CORKE, 1998; GONZÁLES-PÉREZ et al., 2002).

O teor e tipo dos compostos fenólicos também têm influência tanto na cor como nas propriedades funcionais dos produtos (XU e DIOSADY, 2000). A cor de produtos protéicos derivados de vegetais tem relação com as interações proteína-fenol, que podem formar polímeros com maior pigmentação (MARCONE e KAKUDA, 1999; TIAN et al., 1999; XU e DIOSADY, 2002). A cor mais clara do CPAla (com menor teor de fenólicos)

em relação ao CPAtt, e mais acentuadamente, em relação ao CPAp, foi observada tanto visualmente como pelo índice de claridade. No processo de lavagem ácida, a eliminação de alguns compostos fenólicos, como taninos do tegumento do amaranto e seus produtos de oxidação (MARCONE e KAKUDA, 1999), pode ter contribuído para diminuir a formação de compostos pigmentados na etapa de extração em pH 9,0, pois compostos fenólicos sob condições alcalinas podem sofrer oxidação, formando quinonas que posteriormente reagem com as proteínas (XU e DIOSADY, 2002). Por outro lado, a lavagem ácida pode reduzir o tamanho dos compostos fenólicos, formando pequenas quantidades de proantocianidinas, caracterizados por não apresentar cor (HOSENEY, 1981; FRANCIS, 1995), o que pode ter levado a menor pigmentação do CPAIa. O CPAtt apresentou cor mais clara do que o CPAp e um pouco mais intensa do que o CPAIa. Isto possivelmente deve-se à pré-gelatinização do amido durante o aquecimento no processo de obtenção do CPAtt, que dificultou a interação proteína-fenólicos.

O CPAp, obtido em condições moderadas, levou à desnaturação parcial das proteínas, resultando em maiores teores de proteína e maior solubilidade protéica, em relação aos concentrados protéicos de amaranto obtidos por moagem úmida alcalina, onde as condições na etapa de extração protéica (NaOH 0,25%, por 24 h), como no processo de secagem (70 °C por 12 h), foram extremas, levando à desnaturação total das proteínas e diminuição da solubilidade (BEJOSANO e CORKE, 1998).

Em relação ao rendimento da extração de proteínas, embora pequena, as diferenças foram significativas, resultando das alterações estruturais que ocorrem nos processos. O processo de lavagem ácida resultou em CPA com maior teor de proteína, embora o rendimento de extração de proteína tenha sido menor que nos demais tratamentos, devido às perdas de proteína ocorridas nos soros das etapas de lavagem ácida e de precipitação no pI, que também apresentaram alta concentração de compostos fenólicos. O maior teor de proteínas do CPAIa deve-se à diminuição de componentes não protéicos devido à lavagem ácida, ou ainda, à maior solubilização das proteínas na etapa de extração alcalina, que pode ser explicada pelo desdobramento parcial, aumentando sua solubilidade em pH 9,0. Estes efeitos foram comparáveis aos relatados por L'Hocine et al. (2006), que trabalharam com isolados protéicos de soja obtidos por processos semelhantes aos utilizados no presente trabalho. Não houve diferenças significativas entre rendimento e teor de proteína entre o

processo convencional e o térmico, embora tenha sido constatado que apresentam características estruturais e funcionais diferenciadas.

Entalpia de desnaturação das proteínas (ΔH) é resultado da combinação de reações endotérmicas, tais como a ruptura de ligações de hidrogênio, e reações exotérmicas, incluindo agregação da proteína e quebra de interações hidrofóbicas (PRIVALOV e KHECHINASHVILI, 1974, *apud* MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996). Os baixos valores de ΔH_t obtidos para os CPAs em relação aos encontrados na literatura para proteínas de amaranto podem ser relacionados às interações hidrofóbicas e agregação como resultado da desnaturação parcial da proteína por efeitos do processo de obtenção dos CPAs (SALCEDO-CHÁVEZ et al., 2002). O CPA_{la} apresentou três picos endotérmicos e maior ΔH_t que o CPA_p e CPA_{tt}, que apresentaram apenas dois picos endotérmicos. A separação e o alargamento dos picos observados para o CPA_{la} sugere que houve perda de cooperatividade no decorrer da desnaturação, indicando alteração estrutural das proteínas (L'HOCINE et al., 2006), que pode ter ocorrido pela formação de complexos proteína-compostos fenólicos, que têm maior estabilidade térmica (XU e DIOSADY, 2000; GONZÁLES-PÉREZ et al., 2002; PI-JEN e CHEN-HUE, 2006). Durante o tratamento ácido as proteínas são desdobradas, expondo grupos hidrofóbicos que posteriormente podem se associar aos compostos fenólicos durante o processo, formando complexos proteína-fenol via ligações não covalentes. Os anéis polares da estrutura dos compostos fenólicos têm potencial de interagir com a proteína através de associações hidrofóbicas (RUBINO et al., 1996; PRIGENT et al., 2003). Taninos, tanto os hidrolisáveis como os condensados, podem ser quebrados em ambientes ácidos, alterando, então, sua capacidade de interagir e precipitar proteínas (HOSENEY et al., 1981). Por outro lado, o maior valor de entalpia pode também indicar a influência de maior força iônica (como resultado da adição de HCl e NaOH em função dos ajustes de pH realizado nas diversas etapas do processo) ou ainda a formação de agregados observados na cromatografia de exclusão (Figura 8b) com pequena participação de interações hidrofóbicas. O menor valor de ΔH_t do CPA_{tt} em relação ao CPA_p pode ser resultado da formação de agregados entre proteínas e proteína-amido via interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (TOLSTOGUZOV, 1997).

É interessante notar que a solubilidade do CPAla foi maior que a do CPAp e CPAtt tanto em meio neutro como ácido (em água ou NaCl 0,05 mol/L), indicando que houve diminuição de interações proteína-proteína, devido à alteração estrutural evidenciada pela calorimetria. A extração protéica com aquecimento a 50 °C/2 h, embora a temperatura abaixo da desnaturação, levou ao desdobramento da proteína e formação de agregados insolúveis, possivelmente estabilizados por ligações dissulfeto, como indica o menor teor de grupos SH livres reativos observado para o CPAtt. Na cromatografia de exclusão molecular também verificou-se o desaparecimento dos picos de maior massa molecular, indicando insolubilização. Avanza e Añón (2007) relataram diminuição da solubilidade de isolados protéicos de amarantho aquecidos a 70 e 90 °C, por 30 min, devido à formação de agregados protéicos insolúveis, formados principalmente por polipeptídeos de 52 e 56 kDa estabilizados por ligações dissulfeto. Por outro lado, a pré-gelatinização do amido também teve participação na diminuição da solubilidade do CPAtt, devido à complexação com as proteínas, possivelmente via interações não covalentes (TOLSTOGUZOV, 1997).

5. CONCLUSÕES

A modificação das condições de processo afetou as propriedades físico-químicas e funcionais das proteínas presentes nos concentrados protéicos. Essas mudanças podem ter sido influenciadas também pelo tipo e características das frações protéicas e componentes não protéicos presentes em cada concentrado. O processo de lavagem ácida levou para a redução de compostos fenólicos e amido com formação de agregados solúveis, mostrando-se adequado quanto ao teor de proteína, parâmetros de cor e perfil de solubilidade. O processo térmico também promoveu efeitos positivos nas características do teor protéico e parâmetros de cor, porém afetou a solubilidade como resultado da formação de agregados insolúveis de maior massa molecular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLFO LUTZ. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3. Ed. São Paulo, 1985.

AOAC. Association of official methods analytical chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18th. Edition. Washington, DC., 2005.

AVANZA, M.V. e AÑÓN, M.C. Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. **Journal of the Science of Food and agriculture**, v. 87, p. 616-623, 2007.

BARBA DE LA ROSA, A.; PAREDEZ-LÓPEZ, O.; GUEGUEN, J. Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 937-940, 1992.

BEJOSANO, F.P. e CORKE, H. Properties of protein concentrates and hydrolysates from *Amaranthus* and Buckwheat. **Industrial Crops and Products**, v. 10, p. 175-183, 1999.

BEJOSANO, F.P. E CORKE, H. Protein quality evaluation of *Amaranthus* whole meal flours and protein concentrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 100-106, 1998.

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

CASTELLANI, O. F.; MARTÍNEZ, E. N.; AÑON, C. M. Role of disulfide bonds upon the structural stability of an amaranth globulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3001-3008, 1999.

CHEN, S.; PAREDES-LÓPEZ, O. Isolation and chaacterization of the 11S globulin from amaranth seed. **Journal of Food Biochemistry**, v. 21, p. 53-65, 1997.

CORDERO-DE-LOS-SANTOS, M.; OSUNA-CASTRO, J.; BORODANENKO, A.; PAREDES-LÓPEZ. Physicochemical and functional characterization of amaranthus (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. **Food Science Technolgy International**, v. 11, n. 4, p. 269-280, 2005.

COSTA, A.; BORGES, A. Avaliação da produção agrícola do amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). **Holos**, v. 21, p. 97-111, 2005.

ESCUADERO, N.L.; DE ARELLANO, M.L.; LUCO, J.M.; GIMÉNEZ, M.S.; MUCCIARELLI, S.I. Comparison of the chemical composition and nutricional value of

Amaranthus cruentus flour and its protein concentrate. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 15-21, 2004.

FINOT, P.K. Effect of processing and storage on the nutritional value of food proteins. In: **Food Proteins and their Applications**; Damodaram, S., Paraf, A., Eds.; Dekker: New York, 1997; p 551-577.

FRANCIS, F. J. Pigmentos y otros colorantes. In: **Química de los alimentos**, Fennema, O. R. Marcel Dekker, Inc. New York, 1996. cap. 8, p. 615-701.

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

GONZÁLES-PÉREZ, S.; MERCK, K.B.; VEREIJKEN, J.M. Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1713-1719, 2002.

GORINSTEIN, S.; ZEMSER, M.; FRIEDMAN, M.; VASCO-MÉNDEZ, N.; PARÉDES-LÓPEZ, O. Denaturant-induced conformations of globulins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 93-99, 1996.

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, p. 5595-5601, 2001.

HOSENEY, R. C.; VARRIANO-MARSTON, E.; DENSY, D. A. V. Sorghum and millet. In: **Advances in cereal science and technology**. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, 1981. v. 4, p. 71.

KÄHKÖNEN, M.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3954-3962, 1999.

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, p. 195-199, 2006.

KLIMCZAK, I.; MALECKA, M. PACHOLEK, B. Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. **Nahrung/Food**, v. 46, p. 184-186, 2002.

KONISHI, Y.; FUMITA, Y.; IKEDA, K.; KAZUTOSHI, O.; FUWA, H. Isolation of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. **Agricultural And Biological Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 1453-1459, 1985.

KONISHI, Y.; YORIKAWA, K.; OKU, Y.; AZUMAYA, J.; NAKATANI, N. Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physiochemical properties and the putative localization in the grains. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1745-1750, 1991.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 27, p. 680-685, 1970.

L'HOCINE, L.; BOYE, Y.I.; ARCAND, Y. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 3, p. C137-C145, 2006.

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

LQARI, H.; VIOQUE, J.; PEDROCHE, J.; MILLÁN, F. *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. **Food Chemistry**, v. 76, p. 349-356, 2002.

LUQUEZ, N.; FERNÁNDEZ, S.; DE ARELLANO, M.; DE MUCCIARELLI, S. Concentrado protéico de *Amaranthus mantegazzianus*. Caracterización físico-químico-biológica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 47, n. 4, p. 359-361, 1997.

LUQUEZ, N.; FERNÁNDEZ, S.; MUCCIARELLI, S. Concentrado protéico de *Amaranthus cruentus* Propriedades funcionales. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 46, n. 2, p.143-145, 1997.

MAHAJAN, A. e DUA, S. Salts and pH induced changes in functional properties of amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) seed meal. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 834-837, 2002.

MARCONE, M.F. e KAKUDA, Y. A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. **Nahrung**, v. 43, n.6, p. 368-373, 1999.

MARCONE, M.F.; YADA, R.Y. Study of the charge profile and covalent subunit association of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 385-389, 1992.

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

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

MORA-ESCOBEDO, R.; PAREDES-LÓPEZ, O.; ORDORICA-FALOMI, C. Characterization of albumins and globulins from amaranth. **LWT-Food Science and Technology** v. 23, p. 484-487, 1990.

NIELSON, P. M. Functionality of protein hydrolysates. In: Damodaran S. Paraf A, editors. **Food proteins and their applications**. 1st ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1997. p. 443-472.

MORR, C.V.; GERMAN, J.E.; KINSELLA, J.M.; REGENSTEIN, J.P.; VAN BUREN, J.P.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 1715-1718, 1985.

NIELSON, P. M. Functionality of protein hydrolysates. In: Damodaran, S.; Paraf, A. ed. **Food proteins applications**. New York, Marcel Dekker Inc. p. 443-472, 1997.

OSUNA-CASTRO, J.; RASCÓN-CRUZ, Q.; NAPIER, J.; FIDO, R.J.; SHEWRY, P.R.; PAREDES-LÓPEZ. Overexpression, purification and in vitro refolding of the 11S globulin from amaranth seed in *Escherichia coli*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5249-5255, 2000.

PEREIRA, L.B. **Caracterização de suspensões e géis de amido de amaranto: efeito da adição de sacarose e NaCl nas propriedades reológicas e térmicas**. 2004. 141 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

PI-JEN, T. e CHEN-HUE, S. Significance of phenol-protein interactions in modifying the antioxidant capacity of peas. **Journal of Agricultural and Chemistry**, v. 54, p. 8491-8494, 2006.

PRIGENT, S.V.; GRUPPEN, H.; VISSER, A.J.W.G.; KONINGSVELD, G.; JONG, G.A.H.; VORAGEN, A.G.J. Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (Chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. **Journal of Agricultural and Chemistry**, v. 51, p. 5088-5095, 2003.

RUBINO, M.I.; ARNTFIELD, S.D.; NADON, C.A.; BERNATSKY, A. Phenolic protein interactions in relation to the gelation properties of canola protein. **Food research International**, vol. 29, p. 653-659, 1996.

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.

SEGURA-NIETO, M.; BARBA DE LA ROSA, A.P.; PAREDES-LÓPEZ, O. Biochemistry of amaranth proteins. In: **Amaranth: Biology Chemistry and Technology**. CRC Press: Boca Raton, FL, 1994. cap. 5, p. 75-106.

SHAMANTHAKA, M. C. e NARASINGA, M. S. Binding of chlorogenic acid by the isolated polyphenol-free 11S protein of sunflower (*Helianthus annuus*) seed. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 38, p. 2104-2110, 1990.

TAPIA-BLACIDO, D. R. **Filmes a base de derivados do amaranto para uso em alimentos**. 2006. 351 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

TIAN, S.; KYLE, W. S.A.; SMALL, D. M. Pilot scale isolation of proteins from field peas (*Pisum sativum L.*) for use as food ingredients. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 34, p. 33-39, 1999.

TOLSTOGUZOV, V.B. Protein-polysaccharide interactions. In: Damodaram, S; Paraf, A. **Food Proteins and their applications**. Marcel Dekker, Inc. New York, 1997. p. 171-198.

TSALIKI, E.; LAGOURI, V.; DOSASTAXIS, G. Evaluation of yhe antioxidant activity of lupin seed flour and derivaties (*Lupinus albus ssp. Graecus*). **Food Chemistry**, v. 65, p. 71-75, 1999.

WAGNER, J. R.; SORGENTINI, D.A.; AÑON, M. C. **Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity, and some functional properties of acid-treated soy isolates**. J. Agric. Food Chem, v. 44, p. 1881-1889, 1996.

XU, L.; DIOSADY, L. L. Interactions between canola proteins and phenolic compounds in aqueous media. **Food Research International**, v. 33, p. 725-731, 2000.

XU, L. e DIOSADY, L.L. Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates. **Food Research International**, v. 35, p. 23-30, 2002.

Capítulo 4

Características estruturais e reológicas dos géis de concentrados protéicos de amaranto obtidos por diferentes processos

RESUMO

A propriedade de gelificação de concentrados protéicos de amaranto obtidos por processo convencional para obtenção de isolados protéicos, utilizando pH 9,0 e temperatura ambiente na extração (CPAp), por lavagem ácida prévia à extração protéica (CPAla) e extração protéica com aquecimento (CPAtt) foi estudada. Os géis foram avaliados por ensaios reológicos a altas (propriedades de textura e fratura) e baixas (varreduras de temperatura e tempo) deformações. O módulo de elasticidade dos géis (E), avaliado por compressão, no intervalo de 70 a 90 °C, e por cisalhamento (G') de 55 a 90 °C, aumentou com o aumento da temperatura em todos os processos. O comportamento da transição conformacional, variação do módulo de armazenamento (G') em função da temperatura ($dG'/dT \geq 0,1 \text{ Pa/}^\circ\text{C}$) para 55 a 90 °C, mostrou duas temperaturas de início de gelificação para os géis do CPAp e do CPAtt, no entanto, na gelificação do CPAla foi observada apenas uma temperatura. Géis dos três CPAs (73,6; 75,2 e 77,8% de proteína) foram obtidos de dispersões de 12% de proteína a 70, 80 e 90 °C. Os géis do CPAtt apresentaram os maiores valores dos parâmetros de textura instrumental fraturabilidade, dureza e adesividade, seguidos pelos géis do CPAp e do CPAla ($p < 0,05$). As propriedades de fratura dos géis aumentaram com o aumento da temperatura de obtenção dos géis e foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os diferentes CPAs. A capacidade de retenção de água (CRA) dos géis aumentou ($p < 0,05$) com a temperatura de gelificação e foi influenciada pelos processos de obtenção dos CPAs. Os géis obtidos a 70 °C formaram uma rede mais desordenada e menos estruturada, e com menor CRA. Em contraste, os géis obtidos a 80 e 90 °C apresentaram rede mais estruturada e com maior capacidade de retenção de água. Os géis obtidos do CPAtt mostraram CRA superior quando comparados com o CPAp. O processo de lavagem ácida reduziu a CRA do gel do CPAla, provocando sinérese. Os resultados sugerem que diferentes processos de obtenção de CPAs podem levar a diferentes graus de desnaturação e agregação das proteínas, com influência nas

propriedades de gelificação. Assim a propriedade de gelificação e de retenção de água dos CPAs foi melhorada pelo tratamento térmico e prejudicada pelo tratamento ácido.

Structural and rheological characteristics of gels from amaranth protein concentrates obtained by different processes

ABSTRACT

The gelification property of amaranth protein concentrates obtained by the conventional process, using pH 9.0 and ambient temperature for extration (APCst), by acid washing previously to protein extraction (APCaw) and by protein extraction with heating at 50 °C (APCtt) was studied. The gels were evaluated through rheological essays at high (texture and fracture properties) and low (time and temperature scannings) deformations. The elasticity modulus (E) of the gels, evaluated through compression (E), in the interval from 70 to 90 °C, and through shear (G') from 55 to 90°C, increased with the increase of the gelification temperature in all processes. The behavior of the conformational transition, variation of the storage modulus (G') as a function of temperature ($dG'/dT \geq 0.1$), showed two onset temperatures for the gelification of APCst and APCtt gels, however, the gelification of APCaw was determined by only one temperature. Gels of the three APCs (67.9; 70.1 and 72.5% protein) were obtained from 12% protein dispersions at 70, 80 and 90 °C. APCtt gels presented the highest values for the instrumental texture parameters fracturability, firmness and adhesiveness, followed by APCst and APCaw gels ($p < 0.05$). Fracture properties of the gels increased with the increase of the temperature used to produce the gels and were significantly different ($p < 0.05$) among the different APCs. The water retention capacity (WRC) of the gels increased ($p < 0.05$) with the gelification temperature and was influenced by the APC production processes. The gels produced at 70°C formed a more disordered and less structured network, with a lower WRC. In contrast, the gels produced at 80 and 90 °C presented more structured networks, with higher water retention capacities. The gels obtained from APCtt presented higher WRC when compared to APCst. The acid washing process reduced the WRC of the APCaw gel, causing syneresis. The results suggest that the alternative processes for the production of APCs can lead to different degrees of protein denaturation and aggregation, influencing gelification

properties. Thus, the gelification property of the APCs was improved by thermal treatment and impaired by acid treatment.

1. INTRODUÇÃO

As proteínas de amaranto são fontes alternativas e complementares às dos grãos convencionais e com potencial para uso como ingrediente alimentar em produtos nos quais a formação de gel é desejável (MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996; AVANZA et al., 2005a; AVANZA et al., 2005b; AVANZA e AÑÓN, 2007).

A gelificação é uma das propriedades funcionais mais importantes das proteínas, pois afeta a textura e estrutura dos alimentos. A gelificação de proteínas globulares induzida pelo aquecimento leva ao desdobramento das proteínas, expondo grupos sulfidrilas e regiões internas não polares, seguida pela formação de agregados via interações intermoleculares, tais como interações hidrofóbicas e eletrostáticas ou pontes de hidrogênio e ligações dissulfeto (IKEDA e NISHINARI, 2001; CLARK et al., 2001; TOTOSAUS et al., 2002; VLIET et al., 2002). Além da desnaturação parcial das proteínas, fatores como o pH, força iônica, temperatura e presença de componentes não protéicos influenciam no processo de gelificação (RUBINO et al., 1996; MOURE et al., 2006; MAURI e AÑÓN, 2006; AVANZA e AÑÓN, 2007).

Medidas reológicas a baixas e altas deformações são comumente empregadas para avaliar as propriedades de gelificação (IKEDA e NISHINARI, 2001; COMFORT e HOWELL, 2002; RENKEMA e *van* VLIET, 2004; AVANZA et al., 2005b).

A gelificação das proteínas do amaranto induzida pelo aquecimento foi objeto de poucos estudos (AVANZA et al., 2005a; AVANZA et al., 2005b). Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar as propriedades de gelificação, relacionadas à textura e viscoelasticidade, dos concentrados protéicos de amaranto obtidos por processos alternativos e a influência da temperatura e componentes não protéicos, tais como os fenólicos, na gelificação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

Foram utilizadas sementes de amaranto (*Amaranthus cruentus*, variedade BR Alegria), doadas pela EMBRAPA Cerrados – Planaltina - DF.

2.2 Obtenção dos concentrados protéicos de amaranto (CPAs)

A farinha integral de amaranto (FIA) foi obtida por moagem em moinho de facas (modelo MA630, Marconi, Piracicaba-SP, Brasil) e peneirada até obter-se farinha com granulometria $\leq 425 \mu\text{m}$. Para obtenção da farinha desengordurada (FDA), a FIA foi tratada com hexano 1:6 (p/v), por 24 h, a temperatura ambiente. O solvente foi removido por centrifugação a $9000 \times g/30 \text{ min}$ a 4°C , em uma centrífuga (modelo RC5C, Sorvall® Instruments Dupont, Wilmington, Alemanha). A farinha permaneceu em capela de exaustão, a temperatura ambiente, por 48 h para completa evaporação do solvente e foi posteriormente armazenada a 4°C até seu uso.

Três processos foram usados para obtenção dos concentrados protéicos: (1) processo convencional para obtenção de isolados protéicos (SALCEDO-CHÁVEZ et al., 2002), apresentado na Figura 1, o CPA resultante deste processo foi denominado concentrado protéico padrão (CPAp); (2) concentrado protéico obtido pela lavagem ácida prévia à extração protéica (Figura 2), com objetivo da obtenção de um concentrado com baixo teor de compostos fenólicos (L'HOCINE et al., 2006); o CPA foi denominado CPA_{la}. O processo seguiu as mesmas etapas do processo convencional (1), porém a FDA foi dispersa (1:10) em água a pH 4,5, agitada por 30 min a temperatura ambiente, e centrifugada. O precipitado foi, então, levado para extração protéica alcalina, conforme descrito para o CPAp; (3) processo térmico (Figura 3), que teve por finalidade o desdobramento da proteína em condições de extração protéica alcalina realizada a pH 9,0 e 50°C . O CPA obtido por este processo foi denominado CPA_{tt}.

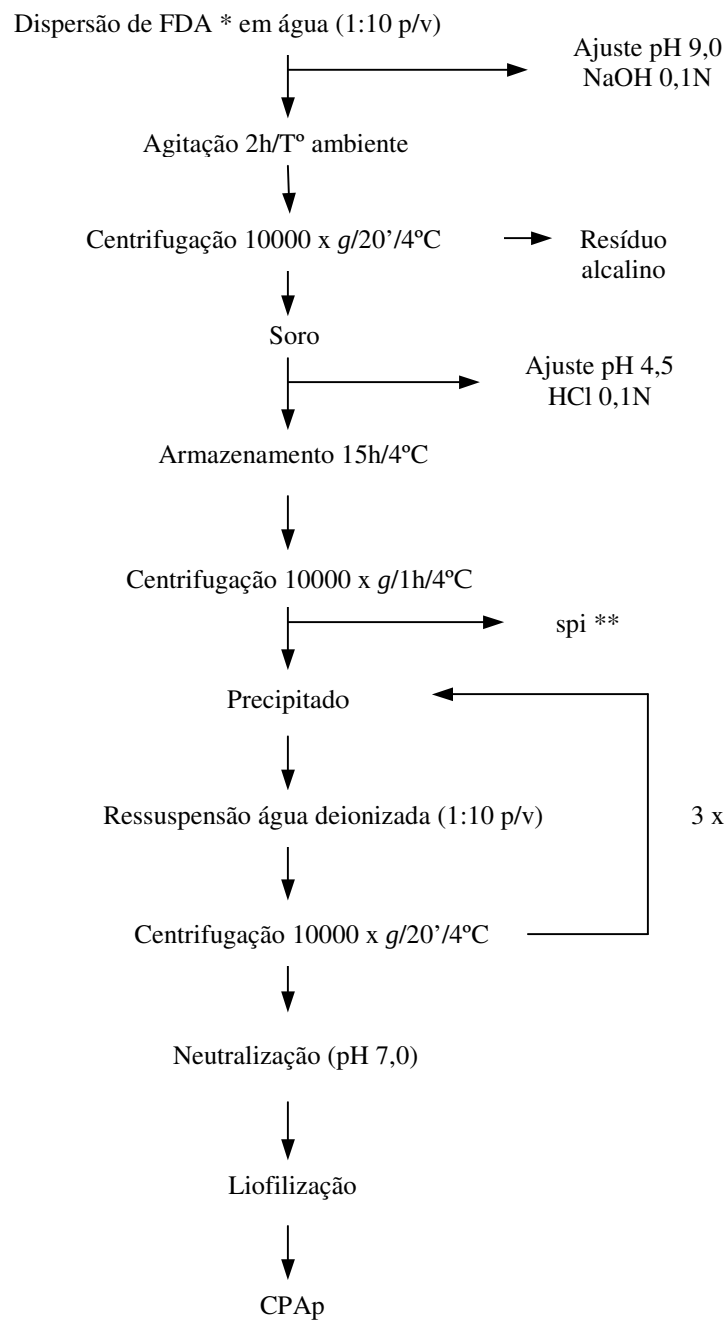


Figura 1. Obtenção do concentrado protéico de amaranto padrão (CPAp) baseado no processo convencional para obtenção de isolados protéicos.

*FDA: farinha desengordurada de amaranto, **spi: soro após precipitação isoelétrica.

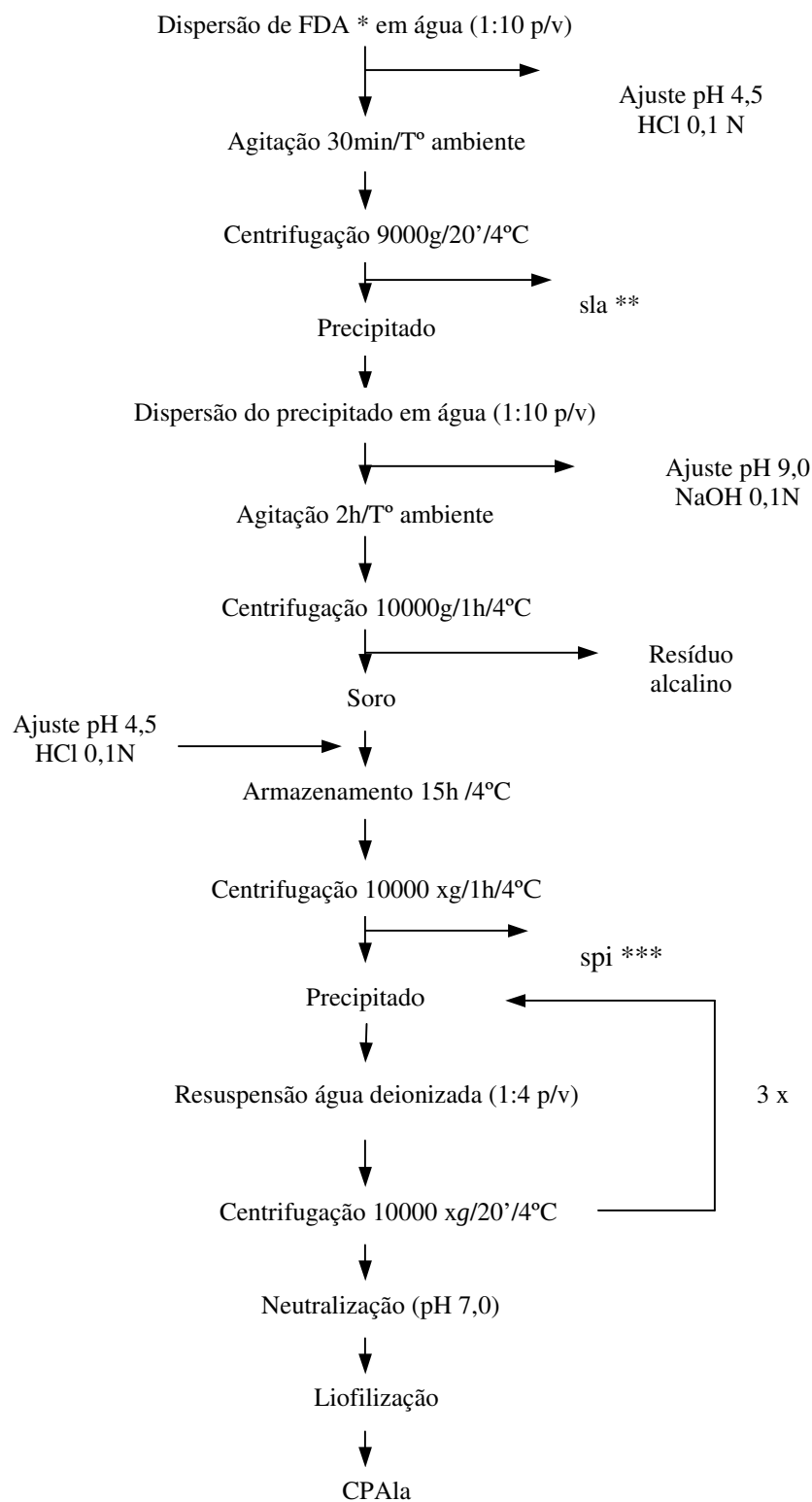


Figura 2. Obtenção do concentrado protéico de amaranto pelo processo de lavagem ácida (CPAla).

*FDA: farinha desengordurada de amaranto, **sla: soro após lavagem ácida, ***spi: soro após precipitação isoeletrica.

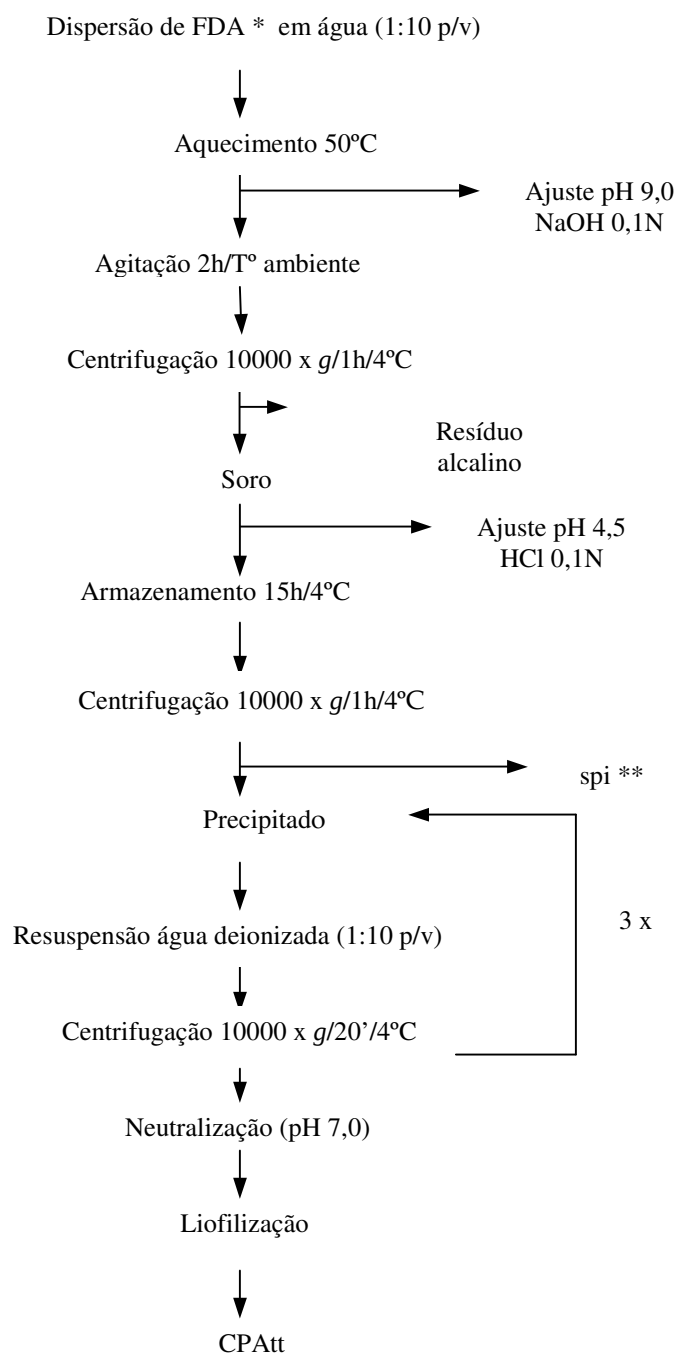


Figura 3. Obtenção do concentrado protéico de amaranto pelo processo térmico a 50°C (CPAtt).

*FDA: farinha desengordurada de amaranto, **spi: soro após precipitação isoelétrica (spi).

2.3 Composição centesimal das farinhas e CPAs

Os teores de proteína nas farinhas (FIA, FDA) e dos CPAs foram determinados pelo método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 2005), utilizando o fator de conversão 5,85 (MARTÍNEZ e AÑÓN, 1996). Os teores de cinzas e de umidade foram determinados de acordo com a AOAC (2005), e os lipídios totais foram determinados pelo método de BLIGH e DYER (1959). As determinações foram realizadas em triplicata.

2.4 Preparação das amostras

Dispersões dos CPAs, com 12% de proteína (p/v), foram preparadas em água destilada e agitadas com o auxílio de um agitador magnético, por 30 min, a temperatura ambiente, e centrifugadas a 120 x *g*, por 2 min, na mesma temperatura. As dispersões foram utilizadas para avaliação dos géis por ensaios reológicos oscilatórios a baixas deformações em reômetro de tensão controlada e a altas deformações por compressão uniaxial em texturômetro.

2.5 Ensaios reológicos a altas deformações

2.5.1 Análise de perfil de textura (TPA)

Para obtenção dos géis, as dispersões foram transferidas para tubos de cobre (2 cm diâmetro x 4 cm altura) e submetidas ao tratamento térmico em banho de água a diferentes temperaturas (70, 80 e 90 °C), por 30 min. Imediatamente após o tratamento térmico, os tubos foram resfriados em banho de gelo e armazenados a 10 °C por 15 h antes da análise dos géis.

Para avaliação reológica, os géis (2 cm de diâmetro e 2 cm de altura) dos CPAs foram comprimidos a 50% de sua altura original em um analisador de textura TA-XT2 (Stable Microsystems Ltd., Surrey, Inglaterra) equipado com *probe* cilíndrico (SMSP/55) de 5,5 cm de diâmetro. A compressão foi realizada a velocidade constante de 1 mm/s e a textura dos géis foi analisada por compressão uniaxial de dois ciclos, com tempo de 20 s entre ciclos, de acordo com Steffe (1996). Das curvas de força *versus* tempo foram obtidos os parâmetros fraturabilidade, dureza, adesividade, coesividade e elasticidade. Para cada

determinação, quatro amostras de géis foram usadas e os valores médios e desvio padrão calculados.

2.5.2 Propriedades mecânicas ou propriedades de fratura

As propriedades mecânicas dos géis obtidos a diferentes temperaturas (70, 80 e 90 °C) por 30 min foram determinadas por ensaios em compressão uniaxial de um ciclo, usando um analisador de textura TA-XT2 equipado com *probe* cilíndrico (SMSP/55) de 5,5 cm de diâmetro. Para o teste de ruptura, os géis (2 cm de diâmetro e 2 cm de altura), equilibrados previamente a 10 °C, foram comprimidos para 80% de sua altura original usando velocidade constante de 1 mm/s. Dos valores de força e altura foram obtidas as curvas de tensão (σ_H) e deformação de Hencky (ϵ_H) (STEFFE, 1996). A tensão e deformação de ruptura foram obtidas do ponto máximo da curva tensão-deformação, o trabalho de fratura (W_f) foi calculado pela integração da área sob a curva tensão-deformação e o módulo de elasticidade (E) determinado a partir da tangente da região linear inicial da curva. As determinações foram realizadas em triplicata.

2.6 Ensaios reológicos oscilatórios a baixas deformações

Os ensaios reológicos a baixas deformações foram realizados em um reômetro de tensão controlada (modelo Carri-Med CSL² 500, TA Instruments, New Castle, Inglaterra) com controle de temperatura pelo sistema Peltier instalado na placa inferior. Uma geometria de cone e placa de aço inoxidável de 6 cm de diâmetro foi usada. Para prevenir a desidratação da amostra, a extremidade das placas foi coberta com silicone de baixa viscosidade.

A natureza do gel foi determinada por varreduras de temperatura e tempo. Para determinação do intervalo de viscoelasticidade linear das dispersões protéicas, inicialmente foi realizada uma varredura de temperatura em condições de aquecimento: 55 a 90 °C, 2 °C/min, frequência constante de 1 Hz e deformação de 1%. Em seguida, realizou-se uma varredura de tempo, sendo que as dispersões aquecidas foram mantidas a 90 °C por 20 min, para analisar se o sistema encontrava-se em equilíbrio. Foram obtidos os valores do módulo de armazenamento ou elástico (G'), módulo de dissipação ou viscoso (G'') e tangente de

perda ($\tan \delta$). O ponto de gel das amostras foi determinado pela variação diferencial do módulo de armazenamento (G') em função da temperatura ($dG'/dT > 0,1 \text{ Pa}^\circ\text{C}$). Os ensaios foram realizados em triplicata

2.7 Capacidade de retenção de água (CRA)

A CRA foi determinada segundo Puppo et al. (1995). Amostras de géis (0,8 a 1,3 g), cortadas na forma de disco, foram envolvidas em papel de filtro Whatman nº 1 e acondicionadas na posição média de um tubo de centrífuga de 50 mL. A perda de água foi determinada pelo peso do gel antes e após a centrifugação a $120 \times g$ por 5 min a 15°C em uma centrífuga (modelo RC5C, Sorvall® Instruments Dupont, Wilmington, Alemanha). A CRA foi expressa como a porcentagem da água inicial que permaneceu no gel após a centrifugação. Cada valor representou a média de 5 determinações.

2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras dos géis ($2,5 \times 2,5 \times 5 \text{ mm}$) foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, tamponadas com fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,2, à temperatura ambiente, por 7 h. As amostras foram, então, lavadas duas vezes em tampão fosfato, seguido pela pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 12 h. Em seguida, os géis foram novamente lavados em tampão fosfato 0,1 mol/L e desidratados em etanol, usando concentração crescente. As amostras foram secas no ponto crítico em um equipamento Balzers, modelo CPD30 (Liechtenstein, Australia). As amostras foram fraturadas e os fragmentos fixados com cola de prata em suportes de alumínio. Em seguida, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro (210 s/40 mA) em um evaporador Balzers, modelo SCD50 (Liechtenstein, Australia). A observação das amostras foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM-5800 (Tóquio, Japão), sob voltagem de aceleração de 15 kV, com aumento de 3000x (HADDAD et al., 1978).

2.9 Análise estatística

Os resultados do teor protéico, propriedades de textura e ruptura, propriedades dinâmicas e capacidade de retenção de água foram avaliados estatisticamente pela média

dos valores, análise de variância, e teste de Tukey a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), através do software STATISTICA (Tulsa, OK, U.S.A., 1995), version 6,0.

3. RESULTADOS

Os teores de proteína na FIA e FDA foram 14,9 e 16,5%, respectivamente. Os concentrados apresentaram teores de proteína de 73,6% para o CPAp, 75,2% para o CPAtt e 77,8% para o CPAIa. O CPAIa diferiu significativamente do CPAp ($p < 0,05$), não havendo diferenças significativas entre o CPAp e o CPAtt. Os CPAs em estudo apresentaram teores semelhantes de cinzas, 3,5%, diferindo nos teores de amido, 4,9; 3,3 e 6,4% e de carboidratos totais, 19,6; 15,7% e 17,6%, para o CPAp, CPAIa e CPAtt, respectivamente.

3.1 Perfil de textura

Os perfis de textura dos géis de CPA obtidos a diferentes temperaturas estão apresentados na Figura 4. O primeiro pico representa a fraturabilidade (I) e o segundo a dureza (II). Todos os géis estudados apresentaram fraturabilidade nas condições do ensaio. Os perfis de textura se mostraram diferentes, tanto em função do tipo de concentrado, como da temperatura de obtenção dos géis. Na Figura 5, observa-se a variação dos parâmetros de textura com a temperatura de obtenção dos géis. A dureza e fraturabilidade dos géis (Figura 5a e 5b) do CPAIa foram inferiores às do CPAp, enquanto o CPAtt apresentou os maiores valores para todas as temperaturas. A dureza e fraturabilidade dos géis de CPAp e CPAIa apresentaram apenas pequeno aumento com o aumento da temperatura de gelificação, enquanto os géis de CPAtt apresentaram aumento de 3 vezes para ambos os parâmetros quando a temperatura aumentou de 80 para 90 °C. Quando obtidos a 90 °C, os géis de CPAtt apresentaram dureza de 4 e 7 vezes superiores aos dos géis de CPAp e CPAIa, respectivamente.

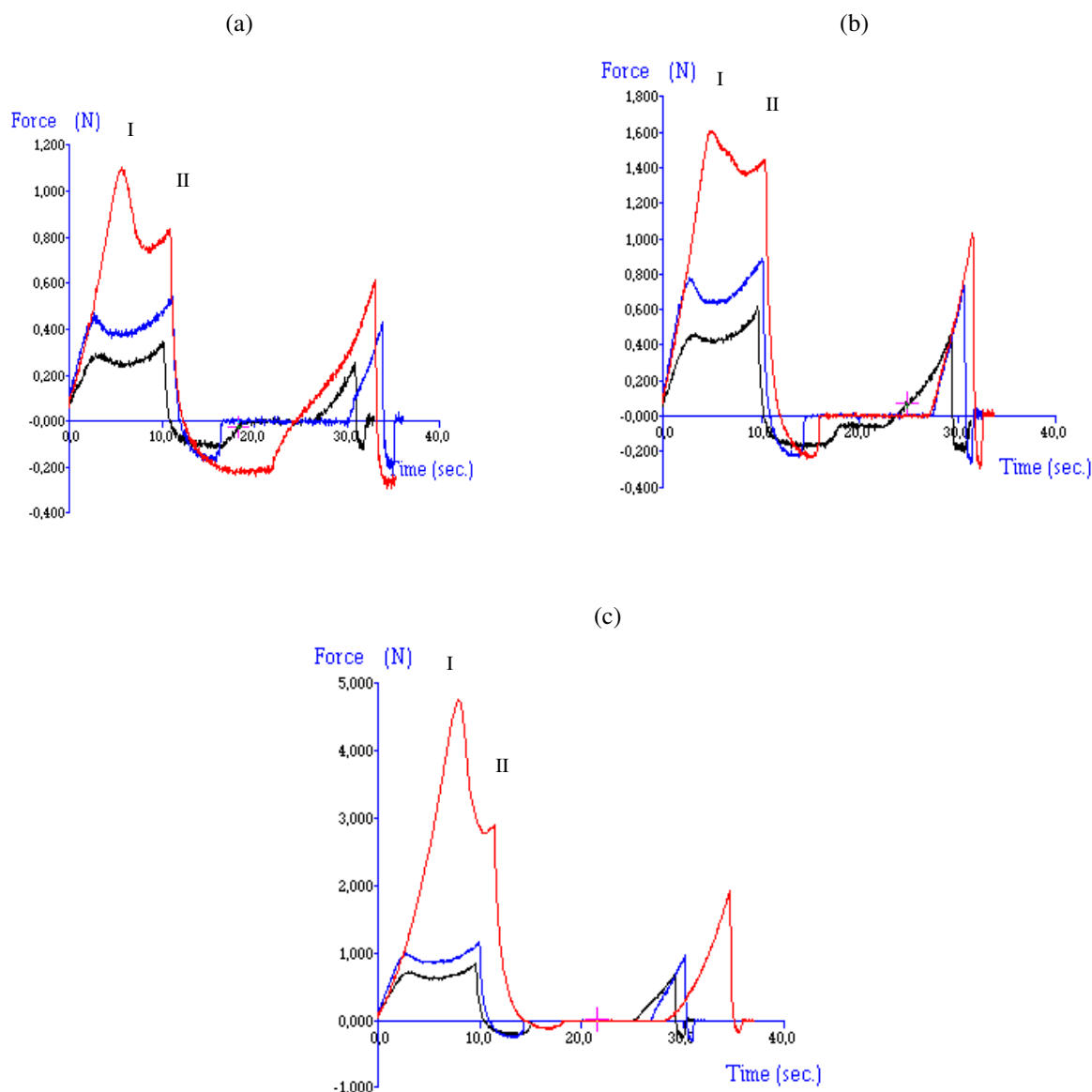


Figura 4. Curvas de força-tempo dos géis do CPAP (linha azul), CPAla (linha preta) e CPAtt (linha vermelha). Temperaturas de obtenção dos géis: (a) 70 °C, (b) 80 °C e (c) 90 °C.

De forma geral, a dureza dos géis dos concentrados obtidos nas diferentes temperaturas foi comparável à reportada por Avanza et al. (2005b) para géis de isolados protéicos de amaranto obtidos em condições semelhantes de temperatura e 15% (p/v) de proteína, concentração superior à utilizada no presente trabalho (12%). Os géis do CPAtt (Figura 5b) apresentaram maiores valores de dureza (0,9; 1,6 e 4,6 N) do que os isolados

protéicos do amaranto obtidos por Avanza et al. (2005b), que foram de 0,2; 0,8 e 3,3 N nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C, respectivamente.

A adesividade (Figura 5c) dos géis diminuiu ($p < 0,05$) com a temperatura de gelificação para todos os CPAs. Os géis do CPAtt apresentaram resultados estatisticamente significativos de maior adesividade quando obtidos a 70 °C e menor adesividade quando obtidos a 80 e 90 °C, do que os de CPAp e CPAIa. O parâmetro de coesividade não mostrou alteração, nem em função do tipo de concentrado, nem em função da temperatura de obtenção.

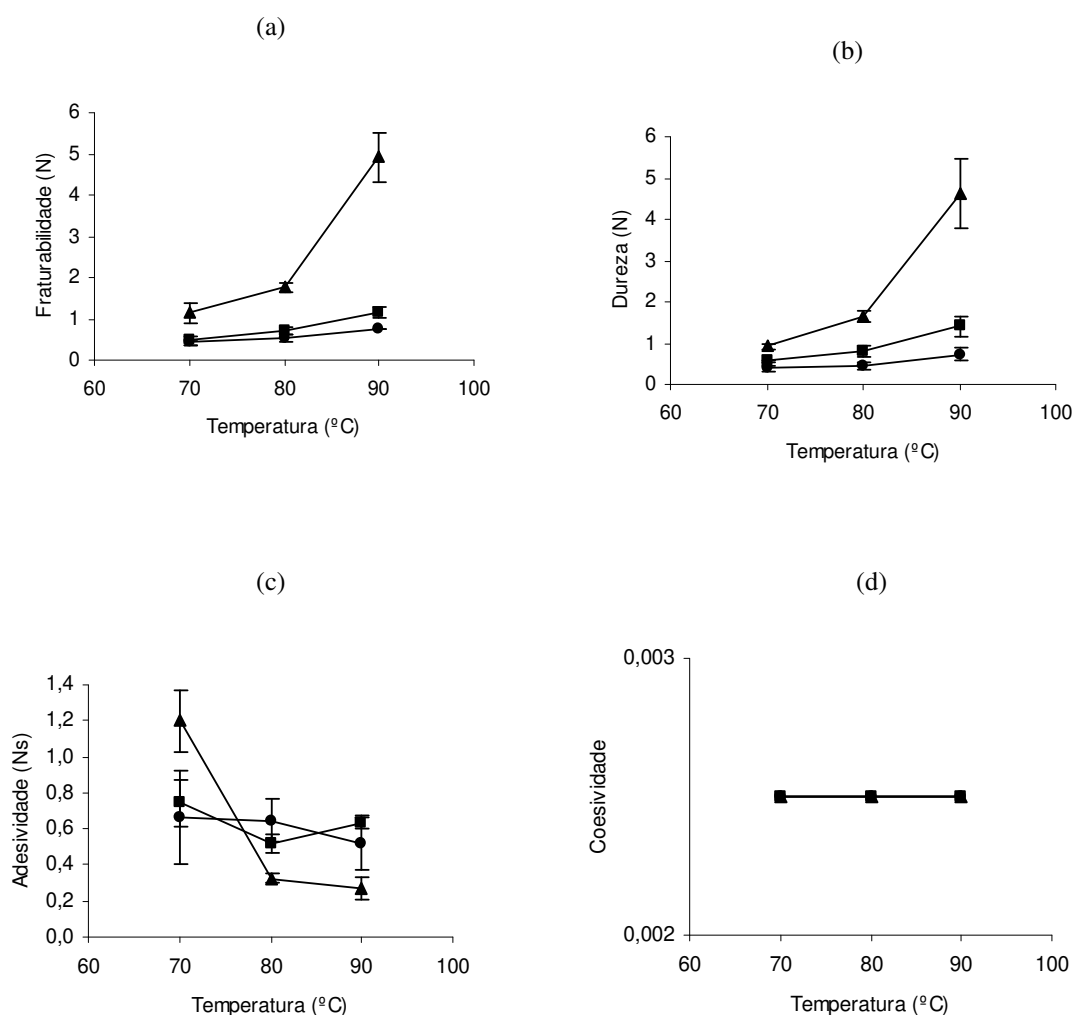


Figura 5. Parâmetros de textura dos géis protéicos de amaranto preparados a diferentes temperaturas. CPAp (■), CPAIa (●) e CPAtt (▲).

3.2 Propriedades mecânicas

O efeito dos diferentes CPAs e das temperaturas de formação do gel no comportamento de ruptura dos géis podem ser observados na Figura 6. A tensão de fratura (σ_f), deformação de fratura (ϵ_f), trabalho de fratura (W_f) e o módulo de Young ou de elasticidade (E) aumentaram com o aumento da temperatura e foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os tratamentos. A tensão de fratura (σ_f), propriedade que representa a dureza dos géis (FOEGEDING et al., 1995), indicou que o gel de CPAtt apresentou a maior dureza, enquanto, o de CPAla foi o mais frágil, para todas as temperaturas de gelificação. Este parâmetro apresentou maiores aumentos para o CPAtt, quando a temperatura aumentou de 80 para 90 °C ($p < 0,05$), comportamento semelhante ao observado para o TPA.

Os parâmetros deformação de fratura (ϵ_f) e trabalho de fratura (W_f) são indicadores da coesividade e da energia necessária para propagar a fratura dos géis, respectivamente (FOEGEDING et al., 1995). Os géis do CPAla e CPAp apresentaram menor coesividade que os de CPAtt ($p < 0,05$) quando obtidos a 80 e 90 °C. Por outro lado, a maior energia necessária para a fratura correspondeu à rede do gel de CPAtt, sendo observados aumentos diferenciados ($p < 0,05$) a 80 °C e 90 °C, ao redor de três vezes, quando comparados com o CPAp e o CPAla.

O módulo de Young (E) caracteriza a elasticidade e firmeza dos géis (MAKRI et al., 2006). A elasticidade dos géis de CPAp e de CPAla obtidos a 70 e 80 °C foi semelhante e inferior à dos géis de CPAtt, que, ao contrário dos demais, apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) com o aumento da temperatura de gelificação de 70 para 80 °C. Quando obtidos a 90 °C, os géis de CPAp apresentaram maior valor de E do que os obtidos nas temperaturas mais baixas, alcançando valores próximos aos dos géis de CPAtt, na mesma temperatura. Os géis de CPAtt apresentaram maior dureza, coesividade, elasticidade e energia elástica estocada do que os géis de CPAp e de CPAla para todas as temperaturas de gelificação estudadas. Os resultados obtidos no ponto de fratura mostraram o mesmo comportamento do TPA: géis mais fortes foram obtidos com o CPAtt do que com o CPAp e o CPAla, sob as mesmas condições de gelificação.

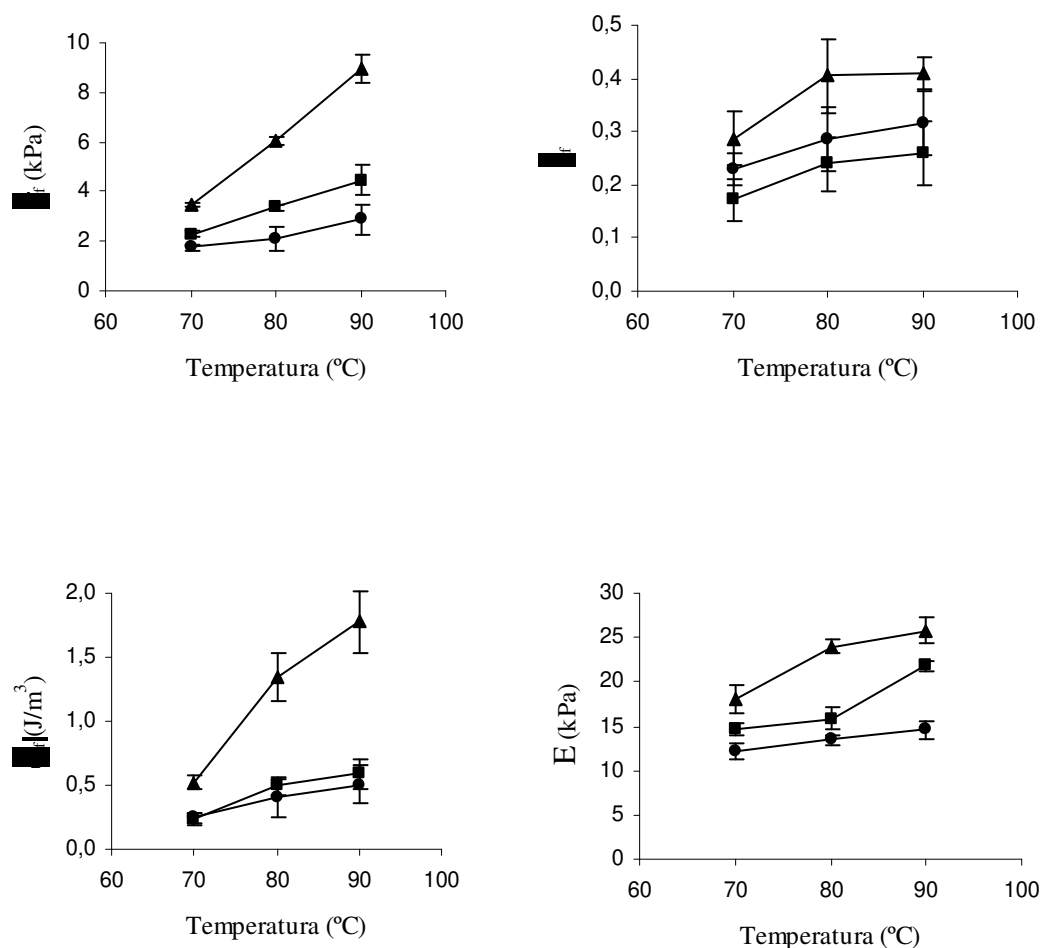


Figura 6. Propriedades mecânicas dos géis a diferentes temperaturas. CPAp (■), CPAla (●) e CPAtt (▲). Tensão de fratura (σ_f), deformação de fratura (ϵ_f), trabalho de fratura (ω_f) e módulo de Young (E).

3.3 Medidas reológicas oscilatórias a baixas deformações

O efeito da temperatura de gelificação sobre as características viscoelásticas dos géis obtidos dos diferentes concentrados protéicos é mostrado nas Figuras 7, 8 e 9. O aumento da temperatura resultou em aumento dos módulos elástico e viscoso (Figura 7) com diferenças significativas entre os CPAs ($p < 0,05$). Foi observado aumento praticamente linear de G' na faixa de temperatura de 70 a 90 °C e de maior intensidade que as menores temperaturas. Os géis protéicos obtidos do CPAp e CPAtt apresentaram maiores valores de G' do que os géis do CPAla, e os maiores valores de G' foram obtidos em temperaturas ao

redor de 90 °C. O CPAtt apresentou maior elasticidade da rede e, em contraste, os géis de CPAIa a menor força do gel, refletido em baixo valor de G' .

A natureza dos géis formados sob as diferentes temperaturas pode ser analisada pelo valor de $\tan \delta$. A $\tan \delta$ é definida como a razão entre os módulos de dissipação e armazenamento (G''/G'), e mede o quão próximo o material está de um sólido ou líquido (MATSUMURA e MORI, 1996). Um sólido ideal apresenta $\tan \delta = 0$ e para um líquido ideal $\tan \delta$ se aproxima ao infinito (TANG et al., 2006). Os géis de todos os CPAs apresentaram $\tan \delta < 1$, mostrando que a característica destes sistemas é a tendência de comportamento de um sólido (ROSS-MURPHY, 1995). As dispersões protéicas dos CPAs se comportaram como soluções macromoleculares diluídas a 55 °C ($\tan \delta > 1$) e comportamento de géis fortes foi observado nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C ($\tan \delta < 1$). Géis fracos foram observados a 60 °C, com $\tan \delta < 1$. Comportamento tipo elástico, com $\tan \delta < 0,3$ foi observado a temperaturas maiores que 70 °C. A maior elasticidade foi observada nas dispersões protéicas aquecidas a 90 °C ($\tan \delta < 0,15$).

No presente trabalho, o ponto do gel, definido como o tempo no qual ocorre a interseção de G' e G'' (PILOSOFF, 2000), não aconteceu claramente durante o aquecimento das dispersões dos CPAs. Foi observada, no entanto, aproximação dos módulos a temperaturas menores de 70 °C (Figura 7) e tempo menor que 300 s (Figura 8), porém a interseção dos módulos não ocorreu. Outro dos critérios reológicos utilizados para a determinação do ponto do gel é a variação diferencial no módulo de armazenamento (G') em função da temperatura (dG'/dT) (GOSAL e ROSS-MURPHY, 2000) e este foi o critério adotado para melhor visualizar as mudanças nas propriedades reológicas durante os estágios iniciais de formação de gel e desenvolvimento da estrutura durante o aquecimento.

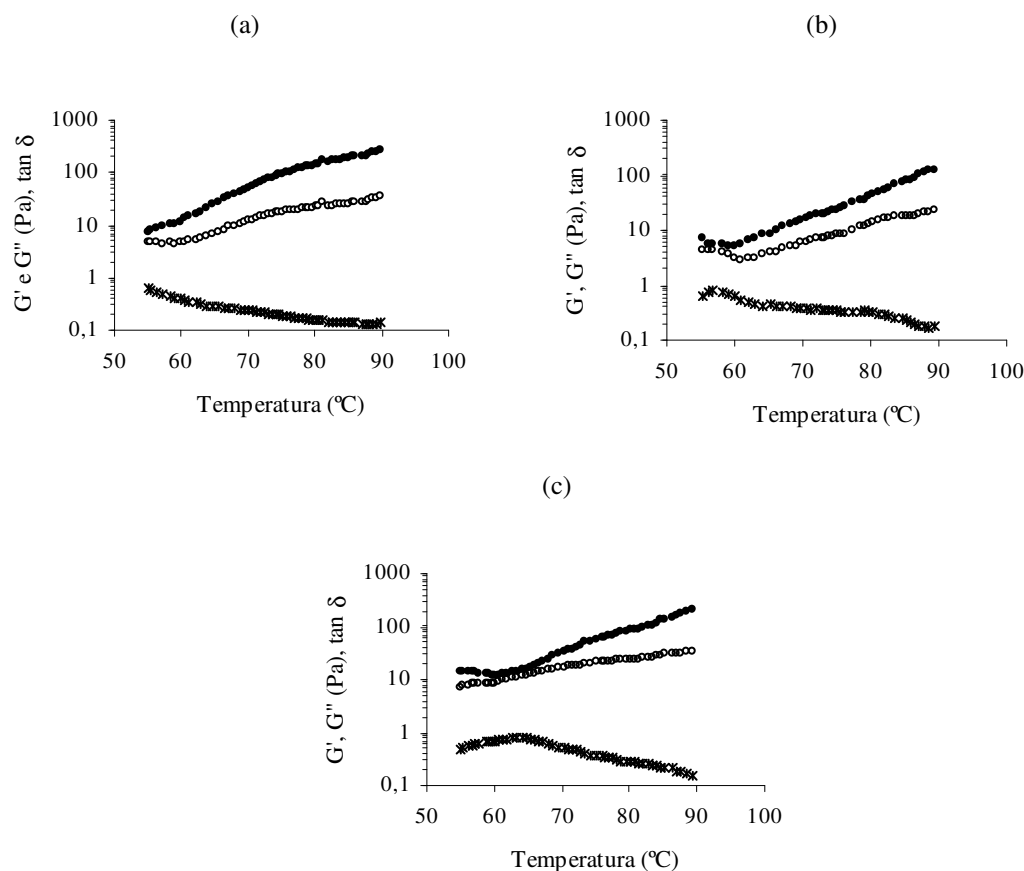


Figura 7. Varreduras de temperatura (G' , G'' e $\tan \delta$ versus temperatura) de dispersões protéicas dos CPAs aquecidas de 55 a 90 °C. (a) CPAP, (b) CPAla e (c) CPAtt. G' (●), G'' (○) e $\tan \delta$ (x).

De acordo com experimentos preliminares, concentração de 12% de proteína foi necessária para a formação de gel auto sustentável dos CPAs. Nessa concentração, G' e G'' se aproximaram a temperaturas menores que 70 °C, obtendo-se valores de G' de 7,5; 5,3 e 12,3 Pa com tempos de gelificação de 0,5; 2,1 e 3,7 minutos (Figura 8), e temperaturas de 55, 57 e 61 °C (Figura 7) para os CPAP, CPAla e CPAtt, respectivamente. A partir destes pontos, G' e G'' aumentaram com o aumento da temperatura de gelificação. As condições críticas de obtenção dos géis dos CPAs foram diferentes das relatadas por Avanza et al. (2005b) para isolado protéico de amarantho, que observaram interseção de G' com G'' na concentração de 7% e temperatura de 70 °C. Essas diferenças podem ser atribuídas ao menor teor de componentes não protéicos presentes nos isolados.

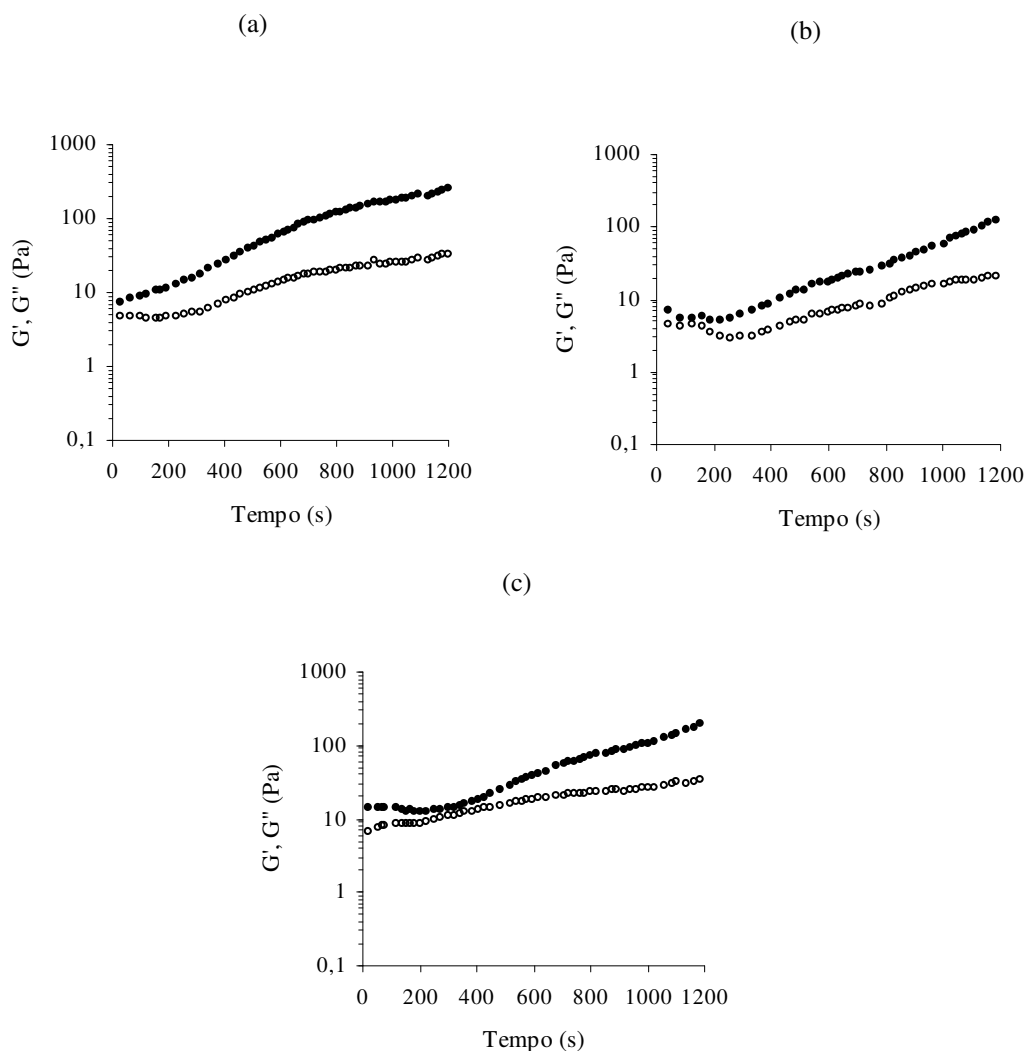


Figura 8. Ponto do gel determinado pela aproximação de G' e G'' a partir dos dados de varredura de temperatura (G' e G'' versus tempo) de 55 a 90 °C. (a) CPAP, (b) CPAla e (c) CPAtt. G' (●) e G'' (○).

Através da varredura de temperatura, observa-se a temperatura de início de gelificação dos sistemas, analisada pela variação de G' em função da temperatura (dG'/dT). Os parâmetros de agregação calculados a partir das curvas dG'/dT versus temperatura (Figura 9) são mostrados na Tabela 1. Para o CPAP e o CPAtt, foram observadas duas temperaturas de início de gelificação ($dG'/dT \geq 0,1 \text{ Pa/}^\circ\text{C}$), enquanto o processo de agregação para o CPAla foi determinado apenas por uma temperatura.

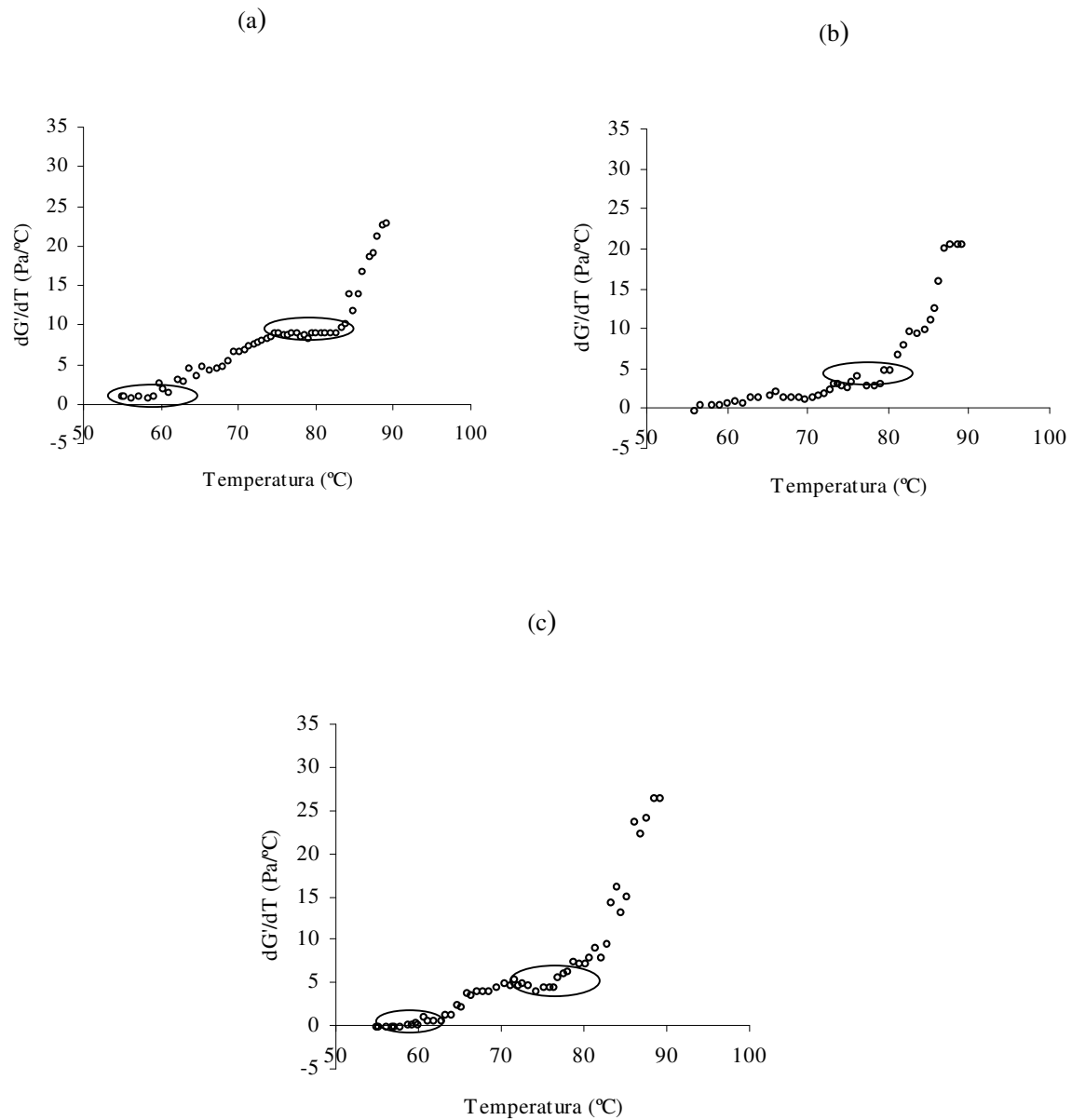


Figura 9. Transições no comportamento reológico dos CPAs como função da temperatura (55 a 90 °C), observadas a partir das alterações no ângulo dG'/dT (Pa/°C). (a) CPAp (b) CPAIa e (c) CPAtt.

Tabela 1. Ponto de gel determinado pela transição de dG'/dT em função da temperatura para as soluções dos CPAs

CPAs	T_i gelificação ($^{\circ}C$) *	G' (Pa) *	dG'/dT (Pa/ $^{\circ}C$) *
CPAp	$T_1 = 59,5 \pm 0,8^a$	$11,3 \pm 1,2^a$	$2,6 \pm 6,1^a$
	$T_2 = 81,0 \pm 5,6^b$	$147 \pm 3,9^b$	$8,9 \pm 5,3^b$
CPAla	$T_1 = 79,1 \pm 1,2^{bc}$	$36,1 \pm 3,7^c$	$2,9 \pm 3,7^{ac}$
CPAtt	$T_1 = 61,1 \pm 3,1^{ad}$	$14,6 \pm 0,7^{ad}$	$1,0 \pm 3,2^d$
	$T_2 = 79,1 \pm 2,5^{bc}$	$90,9 \pm 5,8^e$	$7,1 \pm 7,9^{be}$

* Valores representam a média $\pm$ desvio padrão; médias na mesma coluna com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo ao teste de comparação de médias de Tukey

T_i : temperatura inicial de gelificação, G' : módulo de armazenamento, dG'/dT : variação diferencial do módulo de armazenamento em função da temperatura

CPAs: concentrados protéicos de amarantho, CPAp: concentrado protéico padrão, CPAla: concentrado protéico lavagem ácida, CPAtt: concentrado protéico tratado termicamente

Os maiores valores de G' foram observadas para os géis do CPAp seguido pelo CPAtt. Esses resultados foram contrários aos obtidos no ensaio a altas deformações, em que os valores de G' (E) após o aquecimento e o resfriamento, foram significativamente mais altos ($p < 0,05$) para o CPAtt, o que indica que no equilíbrio haveria formação de maior número de interações. Além disso, as medidas de E e G' foram obtidas pela aplicação de forças diferentes, compressão e cisalhamento respectivamente, apresentando diferentes tendências.

Os valores das propriedades de equilíbrio a $90^{\circ}C$ foram calculados a partir das varreduras de tempo das dispersões protéicas, considerando-se os dez últimos pontos das curvas G' versus tempo (Figura 10) e são apresentados na Tabela 2. Os valores de G' para os géis obtidos dos CPAp e CPAtt aumentaram à medida que alcançaram o equilíbrio, avaliado em 20 min. Em contraste, o CPAla manteve os mesmos valores.

Tabela 2. Propriedades de equilíbrio alcançadas a 90 °C para as dispersões (12% de proteína) dos concentrados protéicos de amaranto

CPAs	T equilíbrio (s) *	G' (Pa) *
CPAp	$t_i = 843,8 \pm 8,1$	$845,1 \pm 4,5^a$
	$t_f = 1017,8 \pm 8,9$	$931,7 \pm 4,2^b$
CPAla	$t_i = 998 \pm 5,8$	$851,6 \pm 37,1^{ac}$
	$t_f = 1200 \pm 2,7$	$845,2 \pm 68,5^{ac}$
CPAtt	$t_i = 1071 \pm 1,5$	$674,6 \pm 3,7^d$
	$t_f = 1215,5 \pm 0,7$	$726,4 \pm 6,1^e$

* Valores representam a média $\pm$ desvio padrão; médias na mesma coluna com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo ao teste de comparação de médias de Tukey

t_i : tempo inicial de equilíbrio, t_f : tempo final de equilíbrio, G': módulo de armazenamento

CPAs: concentrados protéicos de amaranto, CPAp: concentrado protéico padrão, CPAla: concentrado protéico lavagem ácida, CPAtt: concentrado protéico tratado termicamente

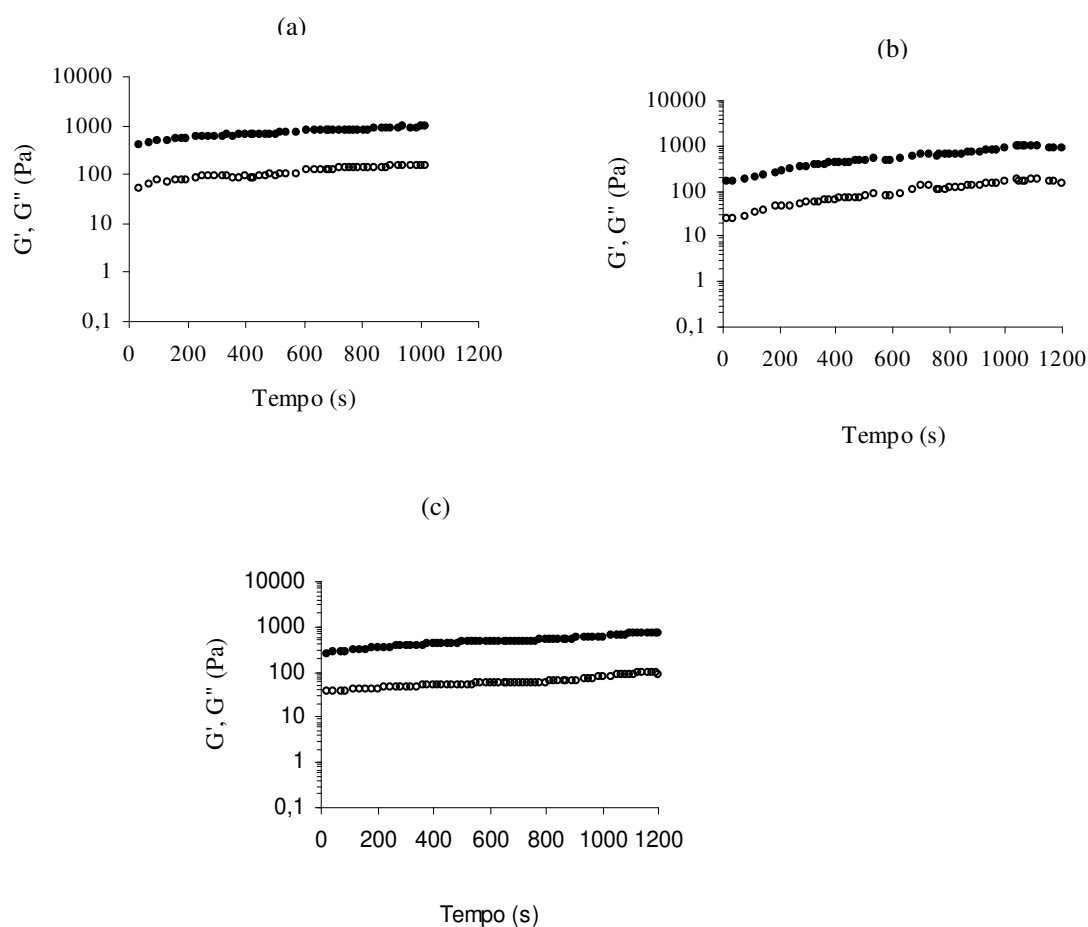


Figura 10. Propriedades de equilíbrio alcançadas a 90 °C em função do tempo, para as dispersões (12% de proteína) dos concentrados protéicos de amaranto. (a) concentrado protéico padrão, (b) concentrado protéico lavagem ácida e (c) concentrado protéico tratado térmicamente, G' (●) e G'' (○).

3.4 Capacidade de retenção de água (CRA)

A Figura 11 mostra que o aumento da temperatura de 70 a 90 °C produziu aumento na CRA dos géis ($p < 0,05$). Todos os géis dos CPAs apresentaram aumento da CRA, 1,2 vezes, em relação à cada temperatura. Os géis obtidos a 70 °C apresentaram menor CRA, o que sugere uma rede mais desordenada e menos estruturada, enquanto os géis obtidos a 80 e 90 °C, os quais apresentaram uma rede mais estruturada e com maior capacidade de retenção de água, como foi observado na microestrutura dos géis (Figura 12). A capacidade de retenção de água do CPAIa foi inferior ao do CPAp, enquanto o CPAtt apresentou maior CRA para todas as temperaturas. Maior CRA foi observada por Avanza et al. (2005a) para géis de isolados protéicos de amaranto, com 15% de proteína (p/v) e induzidos por aquecimento de 70 a 95 °C, que a observada para os géis de concentrados protéicos obtidos no presente estudo.

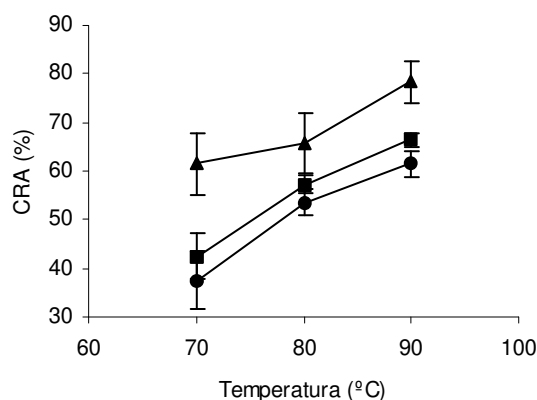


Figura 11. Efeito dos processos e da temperatura de aquecimento sobre a capacidade de retenção de água dos géis protéicos de amaranto. CPAp (■), CPAIa (●) e CPAtt (▲).

3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As microestruturas dos géis dos CPAs estão apresentadas na Figura 12. O aumento da temperatura de obtenção dos géis de 70 para 80 °C resultou na formação de uma matriz mais ordenada. Alterações da estrutura semelhantes foram observadas por Avanza et al. (2005a) para géis (15% de proteína) de isolados protéicos de amaranto, obtidos a 70, 80 e

95 °C. Os géis do CPAIa (Figura 12b) apresentaram estrutura porosa, grosseira e irregular, enquanto os de CPAtt (Figura 12c) apresentaram aglutinação das moléculas, possivelmente como resultado da formação de agregados no processo de obtenção do CPAtt.

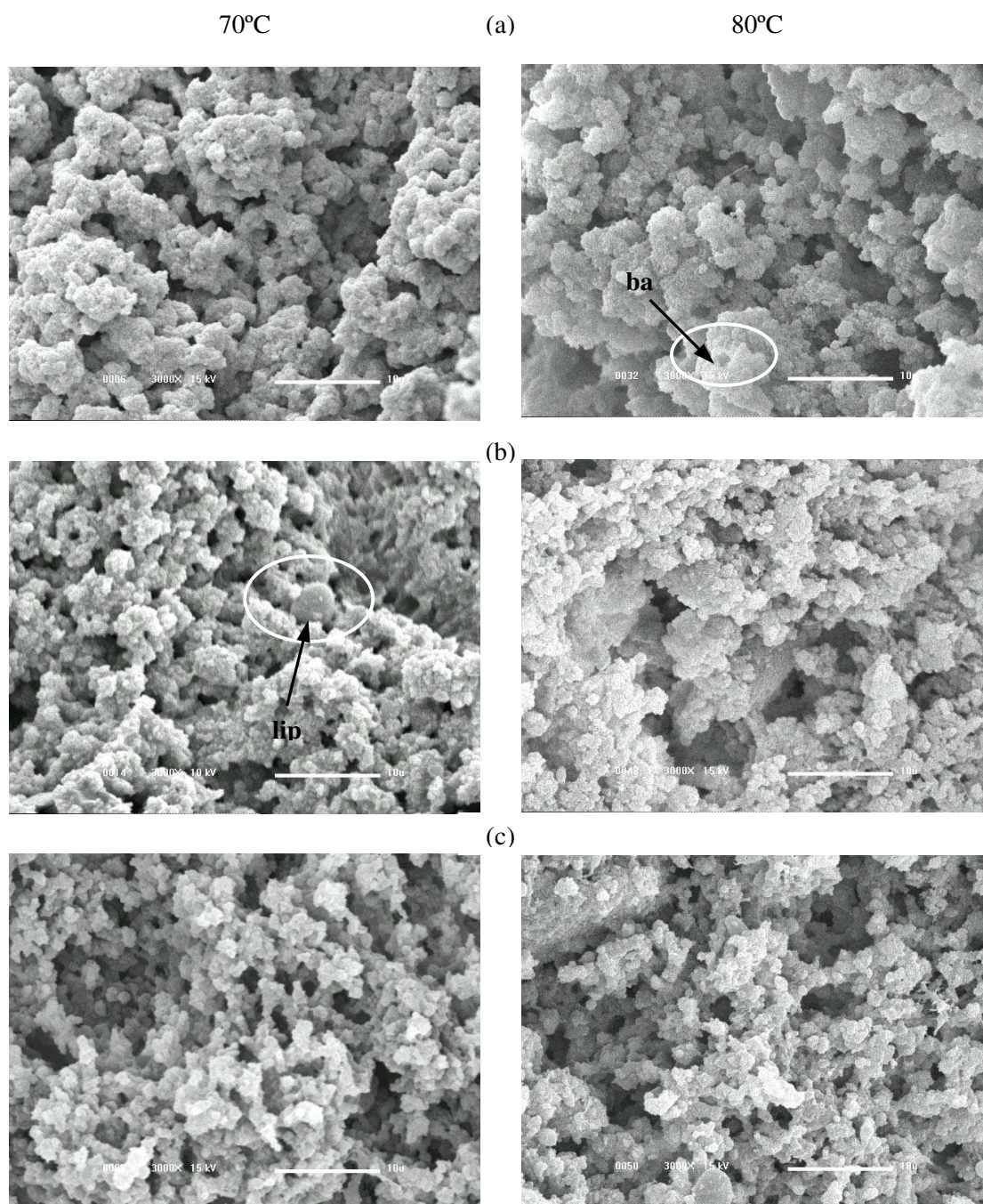


Figura 12. Efeito da temperatura sobre a microestrutura dos géis de amaranto determinado por MEV. (a) CPAp, (b) CPAIa, (c) CPAtt. ba = bolha de ar, lip = lipídio.

4. DISCUSSÃO

As diferenças na propriedade de gelificação podem ser atribuídas à presença de diferentes componentes, tais como proteínas, carboidratos e lipídios e à interação entre eles (MOURE et al., 2006). Outros componentes que têm papel importante na gelificação são os compostos fenólicos que podem interagir com as proteínas via ligações não covalentes (RUBINO et al., 1996). Por outro lado, a gelificação pode ser afetada pelas condições do meio: tempo, temperatura e pH (SHAND et al., 2007). A temperatura de aquecimento produz quebra das estruturas secundária e terciária da molécula nativa e, no processo de gelificação, as moléculas protéicas chegam a ser mais reativas para a formação da rede (CLARK et al., 2001).

Os resultados dos parâmetros de textura mostraram aumento de dureza para todos os géis com o aumento da temperatura de gelificação. Estes aumentos podem ser explicados pela desnaturação da fração globulina a temperaturas por volta de 90 °C, fração presente em maior proporção nos CPAs, conforme observado no perfil eletroforético (capítulo 3, Figura 4A), favorecendo, assim, a formação da rede tridimensional. A desnaturação da fração globulina favorece a formação de ligações dissulfeto, importantes para a manutenção e dureza dos géis (AVANZA et al., 2005b). No entanto, como a temperatura de desnaturação (T_d) desta fração protéica é maior que a utilizada para a formação dos géis, a maior dureza e resistência à fratura dos géis do CPA_{Att} obtido a 90 °C, que a dos géis de CPA_p e CPA_{Ala}, pode ser atribuída à desnaturação parcial da proteína pelo prévio aquecimento a 50 °C, realizado durante seu processo de obtenção, assim como à formação de ligações dissulfeto favorecidas pela desnaturação. Por outro lado, o tempo de aquecimento de duas horas a 50 °C pode ter levado ao rompimento das membranas protéicas (TOLSTOGUZOV, 1997) e das estruturas dos grânulos de amido (ROONEY e PFLUGFELDER, 1986 *apud* COSTA et al., 2002), seguido pela formação de agregados proteína-amido, aumentando os parâmetros de dureza e fraturabilidade.

Os géis do CPA_{Ala}, quando comparados com o CPA_p e CPA_{Att}, foram menos resistentes à fratura, o que pode ser atribuído à perda de carboidratos e proteínas de baixa massa molecular (globulina de 37,3 kDa e albumina-1 < 15 kDa) no soro da lavagem ácida prévia à extração protéica, conforme mostrado previamente no perfil eletroforético (capítulo 3, Figura 4B) e na composição centesimal do CPA_{Ala} (capítulo 3, Tabela 1).

Segundo Avanza, Puppo e Añón (2005a), os polipeptídeos de 35 kDa formam parte da matriz do gel, enquanto as espécies monoméricas de 14,4 kDa ocupam os espaços intersticiais da matriz e são responsáveis por estabilizar a estrutura do gel via interações não covalentes.

Por outro lado, a formação de complexos proteína-fenol, que possivelmente ocorre no processo de obtenção dos CPAs, pode refletir na formação da rede de gel, pois estes complexos podem interferir na capacidade de formação das interações hidrofóbicas entre proteínas, necessárias para a estruturação da rede. Segundo Prigent et al. (2003), a formação do complexo pode ser resultado da sobreposição de anéis não polares dos compostos fenólicos e resíduos de aminoácidos aromáticos das proteínas. O CPA_{Ala} foi o concentrado que aparentemente apresentou compostos fenólicos com maior disponibilidade de sítios reativos para ligar-se à proteína, resultando em maior estabilidade térmica, conforme observado nos resultados de calorimetria, com maior ΔH_t que o CPA_p e CPA_t (capítulo 3, Tabela 5) e conseqüentemente, diminuindo a dureza do gel.

A adesividade dos géis foi outro dos parâmetros afetados pelos processos de obtenção dos CPAs. De acordo com Molina et al. (2003), a adesividade do gel é principalmente devida à presença de globulina 11S, porém outros componentes da amostra podem afetar a adesividade do gel. Possivelmente, o processo térmico de obtenção do CPA_t resultou em pré-gelatinização do amido, favorecendo a adesividade do gel do CPA_t a 70°C, quando comparado com o CPA_p e CPA_{Ala}. Molina et al. (2003) também observaram que o prévio aquecimento (90°C por 15 min), seguido por tratamento com pressão a 300 MPa por 15 min, aumentou a adesividade dos géis de isolados protéicos de soja quando comparados com isolados de globulina, atribuindo essa diferença à presença de outros componentes no isolado protéico de soja. Diferenças entre os valores de adesividade obtidos para os concentrados no presente trabalho e os reportados por Avanza et al. (2005b) para isolados protéicos de amaranto podem ser atribuídas ao maior teor de carboidratos nos CPAs.

Assim como o perfil de textura (TPA), as propriedades mecânicas foram influenciadas pelas diferentes conformações de proteína e composição dos CPAs. Os géis do CPA_p apresentaram valores de E três vezes maior que os obtidos por Comfort e Howell (2002) para géis de isolado protéico de soja com 18% de proteína e aquecimento a 90 °C

por 20 min. Alting et al. (2004) mostraram que as ligações dissulfeto foram de grande importância nas propriedades mecânicas dos géis de proteínas globulares (ovalbumina e soro). Avanza et al. (2005a) também relataram a presença de ligações dissulfeto em maior proporção na matriz do gel protéico de amaranto. A formação de ligações dissulfeto nas proteínas globulares do tipo 11S pode ser influenciada por mudanças na estrutura secundária e terciária durante o tratamento térmico (AVANZA et al., 2005b). A maior dureza e elasticidade dos géis do CPAtt para todas as temperaturas de gelificação pode estar relacionada mais com a pre-gelatinização do amido do que com a formação de ligações dissulfeto, pois de acordo com os resultados de grupos sulfidrilas livres (capítulo 3, Figura 5), o CPAtt apresentou menor teor de SH livres em relação aos outros CPAs, o que indica que os grupos SH livres disponíveis não foram suficientes para a estabilidade da rede protéica. Por outro lado, o CPAtt apresentou maior teor de amido, possivelmente como resultado da maior solubilização devido ao tratamento a 50 °C.

O aumento da temperatura resultou em maiores valores de G' para todos os CPAs, indicando que a desnaturação seguida pela interação das diferentes frações protéicas foram fatores determinantes na cinética de gelificação dos CPAs. O valor de G' , maiores para o CPAp e CPAtt, e menor para o CPAla, foi resultado, possivelmente, das interações entre proteínas e da formação de complexo proteína-amido, ocorridos no processo de obtenção do CPAs. Por outro lado, a presença dos compostos fenólicos, seja na forma livre ou complexadas com as proteínas, pode ter interferido no desenvolvimento da rede tridimensional e na elasticidade do CPAla. Embora a quantidade de fenólicos determinados para o CPAla tenha sido menor em relação aos outros, as temperaturas de obtenção dos géis podem ter favorecido as interações proteína-fenol, pois devido à lavagem ácida os compostos fenólicos apresentam alteração de sua estrutura molecular, favorecendo sua capacidade de interagir e precipitar proteínas (HOSENEY et al., 1981).

Além disso, a perda de carboidratos durante a lavagem ácida pode ter resultado no enfraquecimento da rede, desta forma apresentando baixos valores de G' e aumento da $\tan \delta$. A presença de compostos fenólicos diminuiu a força do gel (baixo G') e a elasticidade (alta $\tan \delta$) de géis protéicos de canola pela formação de ligação dos ácidos fenólicos com proteínas via interações hidrofóbicas (ARNTFIELD, 1996; RUBINO et al., 1996).

A diminuição da $\tan \delta$ ($< 0,15$) a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ para todos os CPAs indica maior elasticidade dos géis, provavelmente pela maior prevalência de interações hidrofóbicas resultantes da desnaturação das globulinas 11S e P (AVANZA et al., 2005b).

As transições no comportamento reológico dos sistemas indicaram que a gelificação foi governada pela desnaturação das frações protéicas e componentes não protéicos de baixa estabilidade térmica presente nos CPAs. Foram observadas duas temperaturas de início de gelificação para o CPAp e o CPAtt: a primeira correspondeu possivelmente à temperatura de gelatinização do amido e a segunda correspondeu à desnaturação das frações glutelinas, albumina-1 e globulinas de baixa massa molecular, enquanto a gelificação do CPA_{la} ocorreu em uma única temperatura que foi determinada pela desnaturação das frações protéicas de baixa massa molecular.

As diferenças entre os valores de E (compressão) e G' (cisalhamento) obtidos por altas e baixas deformações podem ser atribuídas aos diferentes métodos de preparo do gel. Enquanto nos ensaios a altas deformações as dispersões protéicas foram aquecidas diretamente às temperaturas de 70 , 80 e $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, logo resfriadas e armazenadas a 5°C por 15 horas antes das avaliações por compressão, nos ensaios a baixas deformações as dispersões protéicas foram aquecidas de 55 a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, e as avaliações foram feitas durante o processo de aquecimento. Possivelmente, na segunda análise não houve tempo suficiente para que a rede de gel fosse formada, produzindo géis fracos, em especial para o CPAtt.

Os resultados dos ensaios de varredura de tempo, que permitem verificar o comportamento cinético dos sistemas em cisalhamento, dentro do intervalo de viscoelasticidade linear, mostraram que o CPA_{la} gelificou em tempo mais curto, indicando que os valores dos parâmetros reológicos (G' e G'') estavam próximos ao equilíbrio. O contrário ocorreu para os géis do CPAp e CPAtt, mostrando alteração dos módulos dinâmicos, possivelmente pelo fato que a formação da rede tridimensional promovida pela temperatura à qual se inicia o desenvolvimento da estrutura do CPAp e CPAtt foi dependente da taxa de aquecimento do sistema.

O aumento da temperatura de gelificação resultou em aumento da capacidade de retenção de água dos géis, possivelmente devido à maior associação e agregação das moléculas ocorrida com o aumento da temperatura de gelificação. Os menores valores de

CRA dos géis dos CPAs, que dos de géis de isolados protéicos de amaranto, obtidos por Avanza et al. (2005a), nas mesmas condições de temperatura e concentração de proteína, 15% (p/v), foram atribuídos à menor concentração de proteína (12%), utilizada nos géis dos CPAs, uma vez que, aumento na concentração de proteína resultou em maior interação proteína-proteína, via ligações dissulfeto, e conseqüentemente maior CRA nos isolados protéicos. Os processos de obtenção dos CPAs influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a CRA dos géis. Os géis obtidos do CPAtt mostraram CRA superior, 62 a 78%, quando comparados com o CPAp, possivelmente pela maior absorção de água pelo amido e/ou pela maior agregação proteína-proteína via ligações covalentes e não covalentes (AVANZA et al., 2005a; AVANZA e AÑÓN, 2007). Os géis de CPAIa apresentaram baixa CRA e presença de sinérese. Trabalhos têm apontado participação favorável do amido na CRA. Tjahjadi et al. (1988) atribuíram a maior CRA dos géis da fração albumina do feijão adzuki (*Vigna angularis* cv Takara) ao maior teor de carboidratos presente no isolado. Kilara e Humbert (1972) e Sathe et al. (1982) encontraram maior CRA para géis de farinhas de girassol e feijão *Great Northern* quando comparados com isolados protéicos de soja, resultado atribuído à absorção de água pelos carboidratos presentes nas farinhas.

O aquecimento dos CPAs a temperaturas próximas ou maiores que suas temperaturas de desnaturação resultou no desdobramento das moléculas protéicas e na interação entre cadeias, ocasionando a formação de um gel com matriz mais estruturada. Aparentemente, a aglutinação das moléculas protéicas do CPAtt foi refletida na formação de uma estrutura com rede relativamente ordenada e, a perda de proteínas e componentes não protéicos durante o processo de lavagem ácida, resultou na formação de géis do CPAIa com estrutura menos ordenada.

5. CONCLUSÃO

Diferentes condições de processo para obtenção dos concentrados protéicos de amaranto produziram alteração das características estruturais e reológicas dos géis. Essas alterações podem ter sido resultado dos componentes protéicos presentes em cada concentrado e da presença de componentes não protéicos como o amido. As avaliações reológicas em baixas deformações mostraram que o processo de gelificação foi governado pela desnaturação dos componentes de baixa estabilidade térmica. Os tratamentos podem

levar a diferentes graus de desnaturação e agregação das proteínas, com influência nas propriedades de gelificação. Assim a propriedade de gelificação dos CPAs foi melhorada pelo tratamento térmico e prejudicada pelo tratamento ácido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Association of official methods analytical chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18th. Edition. Washington, DC., 2005.

ALTING, A.C. WEIJERS, M.; DE HOOG, E.H.A.; VAN DE PIJPEKAMP, A.M.; COHEN STUART, M.A.; HAMER, R.J. Acid-induced cold gelation of globular proteins: effects of proteina aggregate characteristics and disulfide bonding on rheological properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 623-631, 2004.

ARNTFIELD, S.D. Effect of divalent cations, phytic acid, and phenolic compounds on the gelation of ovalbumin and canola protein. In: PARRIS, N.; KATO, A.; CREAMER, L.K.; PEARCE, J. **Macromolecular interactions in Food Technology**. Washington, 1996. p. 82-92.

AVANZA, V.; PUPPO, C.; AÑÓN, C. Rheological properties of amaranth protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 889-898, 2005b.

AVANZA, V.; PUPPO, C.; AÑÓN, C. Structural characterization of amaranth protein gels. **Journal of Food Science: Engineering and Physical properties**, v. 70, n. 3, p. E223-E229, 2005a

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

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

CLARK, A.H; KAVANAGH, G.M.; ROSS-MURPHY, S.B. Globular protein-gelation-theory and experiment. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 383-400, 2001.

COMFORT, S; HOWELL, N.K. Gelation properties of soya and whey protein isolate mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 661-672, 2002.

COSTA, C.; ARRIGONI, M.B.; SILVEIRA, A.C. Conservação de grãos úmidos de cereais para alimentação animal. In: **I conferência virtual global sobre produção orgânica de bovinos de corte**. Concórdia, Brasil, 2002. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congressovirtual/pdf/portugues/03pt06.pdf>>

FOEGEDING, E.A.; BOWLAND, E.L.; HARDIN, C.C. Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 9, n. 4, p. 237-249, 1995.

GOSAL, W.S.; ROSS-MURPHY, S.B. Globular protein gelation. **Current Opinion in colloid and Interface Science**, v. 5, p. 188-194, 2000.

HADDAD, A.; SESSO, A.; ATTIAS, M.; FARINA, M.; MEIRELLES, M.N.; SILVEIRA, M.; BENCHIMOL, M.; SOARES, M.J.; MONIKA, O.; MACHADO, R.D.; SOUTO-PADRÓN, T.; SOUZA, W. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. In: SILVEIRA, M. **Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura**. São Paulo-Brasil, 1998. p. 33-37.

HOSENEY, R. C.; VARRIANO-MARSTON, E.; DENSY, D.A.V. Sorghum and millet. In: **Advances in cereal science and technology**. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, vol. 4, p. 71, 1981.

IKEDA, S.; NISHINARI, K. On solid-like rheological behaviours of globular protein solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 401-406, 2001.

KILARA, A.; HUMBERT, E.S. Nitrogen extractability and moisture adsorption characteristics of sunflower seed products. **Journal of Food Science**, v. 37, p. 771, 1972.

L'HOCINE, L.; BOYE, Y.I.; ARCAND, Y. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 3, p. C137-C145, 2006.

MAKRI, E.A.; PAPAÇAMPROU, E.M.; DOXASTAKIS. Textural properties of legume protein isolate and polysaccharide gels. **Journal of the Science of Food and agriculture**, v. 86, p. 1855-1862, 2006.

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

MATSUMURA, Y.; MORI, T. Gelation. In: G.M. Hall. **Methods of testing protein functionality**. Ed. London:Blackie Academic and Professional, 1996. p. 76-106.

MAURI, A.N.; AÑÓN, M.C. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1064-1072, 2006.

MOLINA, E.; LEDWARD, D.A. Effects of combined high-pressure and heat treatment on the textural properties of soya gels. **Food Chemistry**, v. 80, p. 367-370, 2003.

MOURE, A.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Functionality of oilseed protein products: A review. **Food Research International**, v. 39, p. 945-963, 2006.

PILOSOF, A.M.R. Gelation. In: PILOSOF, A. M. R.; BARTHOLOMAI. **Caracterización funcional y estructural de proteínas**. Buenos Aires, 2000. p. 75-95.

PRIGENT, S.V.; GRUPPEN, H.; VISSER, A.J.W.G.; KONINGSVELD, G.; JONG, G.A.H.; VORAGEN, A.G.J. Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (Chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. **Journal of Agricultural and Chemistry**, v. 51, p. 5088-5095, 2003.

PUPPO, M.C.; LUPANO, C.E.; AÑÓN, M.C. Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2356-2361, 1995.

RENKEMA, J.M.S; VLIET, T. Concentration dependence of dynamic moduli of heat-induced soy protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 483-487, 2004.

ROSS-MURPHY, S.B. Rheology of biopolymer solutions and gels. In: E. DICKINSON **New physico-chemical techniques for the characterization of complex food systems**. Ed. Glaswov: Blackie Academic and Professional, 1995. p. 130-156.

RUBINO, M.I.; ARNTFIELD, S.D.; NADON, C.A.; BERNATSKY, A. Phenolic protein interactions in relation to the gelation properties of canola protein. **Food research International**, vol. 29, p. 653-659, 1996.

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.

SATHE, S.K.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, K. Functional properties of lupin seed (*Lupinus mutabilis*) proteins and protein concentrates. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 491-497, 1982.

STEFFE, J.F. Introduction to rheology. In: J.F. STEFFE. **Rheological methods in food process engineering**. USA: Freeman Press, 1996. p. 1-93.

SHAND, P.J.; YA, H.; PIETRASIK, Z.; WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1119—1130, 2007.

TJAHJADI, C.; SHAOWEN, L.; BREENE, W.M. Isolation and characterization of adzuki bean (*Vigna angularis* cv *Takara*) proteins. **Journal of Food Science**. v. 53, n. 5, 1438-1443, 1988.

TOTOSAUS, A.; MONTEJANO, J.G.; SALAZAR, J.A.; GUERRERO, I. A review of physical and chemical protein-gel induction. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 589-601, 2002.

TOLSTOGUZOV, V.B. Protein-polysaccharide interactions. In: Damodaram, S; Paraf, A. **Food Proteins and their applications**. Marcel Dekker, Inc. New York, 1997. p. 171-198.

VLIET, T. V.; MARTIN, A. H.; BOS, M. A. Gelation and interfacial behaviour of vegetable proteins. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 7, p. 462-468, 2002.

CONCLUSÕES GERAIS

A obtenção de concentrados protéicos de amaranto pelo processo convencional apresentou diferenças de composição e caracterização estrutural entre os concentrados protéicos das espécies *A. cruentus* e *A. caudatus*, influenciadas pelas frações protéicas e componentes não protéicos presentes em cada espécie. Com a diminuição da força iônica do meio, foi observada agregação das proteínas e perda de frações protéicas e componentes não protéicos de baixa massa molar, resultando em maior estabilidade térmica das proteínas e diminuição da solubilidade para ambas as espécies de amaranto.

O estudo do efeito de processos alternativos de obtenção de concentrados protéicos da espécie *A. cruentus* sobre as propriedades funcionais mostrou que a estrutura molecular e a funcionalidade da proteína foram modificadas como resultado das condições de processo. Desse modo, tratamentos como lavagem ácida prévia à extração protéica (pH 4,5) e extração alcalina com aquecimento (50°C) podem ser parâmetros importantes para melhorar determinadas propriedades físico-químicas dos concentrados protéicos. Assim, o tratamento ácido resultou em aumento da solubilidade do concentrado protéico derivado desse processo (CPAla), possivelmente como consequência da perda de componentes tais como carboidratos, polifenóis e fibras. Em contraste, o tratamento térmico alterou desfavoravelmente a estrutura molecular da proteína, com diminuição da solubilidade do concentrado protéico tratado termicamente (CPAtt).

No entanto, os resultados do estudo do comportamento reológico mostraram que o tratamento térmico, embora tenha sido desfavorável para a solubilidade protéica, contribuiu favoravelmente com as propriedades estruturais e reológicas dos géis dos concentrados obtidos, possivelmente como resultado da interação proteína-proteína e da interação da proteína com outros componentes não protéicos, tais como o amido. Por outro lado, componentes não protéicos como os compostos fenólicos podem ter sido responsáveis pelo enfraquecimento da rede do gel do CPAla.

É interessante notar a participação dos compostos fenólicos na extração e propriedades funcionais dos concentrados protéicos. Propriedades de cor, solubilidade, estabilidade térmica e gelificação foram influenciadas pela presença de compostos fenólicos. A eliminação de parte dos compostos fenólicos no processo de lavagem ácida

contribuiu para a diminuição de compostos pigmentados, resultando em cor mais clara para o CPAla em relação ao CPAtt e CPAp. Além disso, os compostos fenólicos possivelmente foram quebrados com a lavagem ácida, alterando sua capacidade de interagir e precipitar proteínas, resultando em maior solubilidade do CPAla, tanto em ambiente alcalino como ácido (em água ou NaCL 0,05 mol/L), entretanto, a maior estabilidade térmica e o enfraquecimento do gel do CPAla foram favorecidos pelas interações proteína-fenol.

Os concentrados protéicos de amarantho podem ter aplicação no desenvolvimento de futuros produtos em função de suas propriedades funcionais, sendo que as condições de processo podem ser otimizadas com a finalidade de fornecer uma característica específica no produto final. Assim, o CPAla pode ser desejável na preparação de produtos ligados a carne, onde proteínas altamente solúveis são requeridas para a estabilização de emulsões, e, o CPAtt pode ser apropriado na formulação de produtos de panificação, devido à alta capacidade de retenção de água de seus géis.